

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

**RAT AORTİK PRİMER VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE YÜKSEK GLUKOZLU ORTAMDA
ANJİYOTENSİN II UYARIMI İLE OLUŞAN HÜCRE
PROLİFERASYONU ÜZERİNE RESVERATROLÜN
ETKİLERİ**

Arzu ÇETİN

Doktora Tezi

Antalya, 2011

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

**RAT AORTİK PRİMER VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE YÜKSEK GLUKOZLU ORTAMDA
ANJİYOTENSİN II UYARIMI İLE OLUŞAN HÜCRE
PROLİFERASYONU ÜZERİNE RESVERATROLÜN
ETKİLERİ**

Arzu ÇETİN

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
(Proje No. 2009.03.0122.002)

Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir.

Antalya, 2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (orjinalleri ekte sunulmuştur).

1. Çetin A, Öztürk OH, Tokay A, Akçit F, Çağlar S, Yeşilkaya A. Angiotensin II Induced MAPK Phosphorylation Mediated By Ras and/or Phospholipase C Dependent Phosphorylations but not by Protein Kinase C Phosphorylation in Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. Pharmacology, 2007;79:27–33.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 27 /06 /2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA
Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



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



Üye : Prof. Dr. Gültekin SÜLEYMANLAR
Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Kadirhan SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Filiz GÜNDÜZ
Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



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

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Diabetes mellitus, kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olan, pankreasın insülin salgısının veya etkisinin yetersizliği ile oluşan endokrin metabolik bir hastalıktır. Hipergliseminin uyardığı aşırı hücre proliferasyonu, diyabetik hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynar. Ang II ve yüksek glukoz, vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyonu uyaran en önemli etmenlerdendir

Resveratrol, hücre proliferasyonunu inhibe edici etkisi olduğu düşünülen ve kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu olan polifenolik bir bileşiktir.

Bu çalışmada rat vasküler düz kas hücrelerinde, yüksek glukozlu ortamda, Ang II uyarımı ile artan hücre proliferasyonu üzerine resveratrolün etkileri ile bu proliferasyona aracılık ettiğini düşündüğümüz ERK1/2, Akt ve STAT3 protein fosforilasyonlarının inhibisyonu araştırılmıştır.

Sonuçlarımızda resveratrolün normal ve yüksek glukozlu ortamda Ang II uyarımlı vasküler düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Resveratrol özellikle yüksek glukozlu ortamda hücre proliferasyonuna aracılık eden Akt ve STAT3 protein fosforilasyonlarını da inhibe etmektedir. Bulgularımızda resveratrolün Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonu üzerine inhibisyon etkisi saptanmamıştır. Resveratrolün, Akt ve STAT3 protein fosforilasyonunu inhibe etmesinden dolayı, vasküler düz kas hücrelerinde yüksek glukozlu ortamda Ang II uyarımı ile artan hücre hücre proliferasyonunu baskılamada etkili olduğunu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Resveratrol, Anjiyotensin II, Vasküler Düz Kas Hücreleri

ABSTRACT

Diabetes mellitus is an endocrine metabolic disease which is associated with cardiovascular diseases and is related to the deficiency of pancreatic insulin secretion or its effects. Hyperglycemic-induced high cell proliferation has an important role in the pathogenesis of Diabetes mellitus. Ang II and high glucose are the most important factors that induce proliferation in vascular smooth muscle cell.

Resveratrol is a protective polyphenolic compound against cardiovascular diseases and is thought to inhibit cell proliferation.

In this study, we investigated the effects of resveratrol on increased cell proliferation by Ang II in high-glucose media, and the inhibition of ERK1/2, Akt and STAT3 proteins phosphorylation which we thought mediate cell proliferation in rat vascular smooth muscle cells.

Our results showed that resveratrol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by Ang II in normal and high-glucose media. Resveratrol especially inhibits Akt and STAT3 protein phosphorylation which mediate cell proliferation in high-glucose media. Resveratrol, on the other hand, has no inhibitor effect on ERK1/2 phosphorylation induced by Ang II. As a consequence, because resveratrol inhibits Akt and STAT3 protein phosphorylation, our findings indicate that resveratrol could be an effective agent to suppress vascular smooth muscle cell proliferation induced by Ang II in high-glucose media.

Key Words: Resveratrol, Angiotensin II, Vascular Smooth Muscle Cells

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması ve gerçekleştirilmesinde değerli zamanını ve yardımlarını esirgemeyen proje yürütücüm ve akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA başta olmak üzere tüm bölüm hocalarıma,

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesi sırasında değerli zamanlarını ve emeklerini harcayan Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA'nın danışmanlığı altındaki tüm ekip arkadaşlarıma,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Sınırsız desteği için Eşime ve sonsuz sevgileri için Aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Arzu ÇETİN

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xviii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Vasküler Duvar ve Anjiyotensin II	3
2.2. Anjiyotensin II	4
2.2.1. Anjiyotensin II'nin Yapısı ve Biyosentezi	4
2.2.2. Anjiyotensin II'nin Reseptörleri	5
2.2.3. Anjiyotensin II'nin Vasküler Etkileri	6
2.2.4. Anjiyotensin II'nin Kardiyovasküler Hastalıkların Gelişimindeki Rolü	6
2.2.5. Anjiyotensin II-Bağımlı Sinyal Yolları	8
2.2.5.1. Mitojen Aktive Edici Kinaz Sinyal İletim Yolu	8
2.2.5.2. Fosfotidilinositol 3-Kinaz (PI3K) ve AKT Sinyal İletim Yolu	9
2.2.5.3. Janus Ailesi Kinazlar ve STAT Sinyal Yolu	10
2.3. Hiperglisemi ve Ang II Uyarımlı Sinyalizasyon	12
2.4. Resveratrol	14
2.4.1. Sentezi	14
2.4.2. Emilimi	15
2.4.3. Resveratrolün Dokulara Taşınması	16
2.4.4. Resveratrolün Hücre İçi Reseptörlere Bağlanması	16
2.4.5. Resveratrolün Atılımı	16
2.4.6. Resveratrolün Sinyal İletim Yolları ve Kardiyoprotektif Etkileri	16

MATERYAL ve METOD

3.1.	Materyal ve Kimyasal Malzemeler	18
3.2.	Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler	18
3.3.	Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu	19
3.3.1.	Kullanılan Solüsyonlar	19
3.3.2.	Metod	21
3.4.	Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin Kültürü	21
3.4.1.	Kullanılan Solüsyonlar	21
3.4.2.	Metod	22
3.5.	Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu	23
3.5.1.	Hücrelerin İmmünohistokimya Preparatları Haline Getirilmesi	23
3.5.2.	Kullanılan Solüsyonlar	23
3.5.3.	Metod	24
3.6.	VDKH Kültürlerinin Western Blot Analizi için Lizatlarının Hazırlanması	24
3.6.1.	Kullanılan Solüsyonlar	24
3.6.2.	Kullanılan Aktivatör ve İnhibitörler	25
3.6.3.	Metod	25
3.7.	Protein Miktarının Tayin Edilmesi	26
3.7.1.	Mikro BCA Deney Kitinin Prensibi	26
3.7.2.	Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafiğin Hazırlanması	26
3.7.3.	Numunelerin Protein Miktar Tayini	27
3.8.	SDS-PAGE ve Western İmmünoiblot Analizi	27
3.8.1.	Elektroforez Jelinin Hazırlanması	27
3.8.2.	Elektroforez İşlemi	30
3.8.3.	Elektroforez Jelinin Membrana Aktarılması	31
3.8.4.	Membranların Antikor ile İşaretlenmesi	31
3.8.5.	Membrandaki Sinyallerin Filme Aktarılması	33
3.8.6.	Sinyallerin Grafik Haline Dönüştürülmesi ve Değerlendirilmesi	34
3.9.	VDKH'lerinde Hücre Proliferasyonları Ölçümleri	34
3.9.1.	WST-1 Deneyinin Prensibi	34
3.9.2.	WST-1'in Deney Prosedürü	35
3.9.3.	WST-1'in Deneyinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizi	36

BULGULAR

4.1.	Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu	37
4.2.	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Normal Glukoz (NG) ve Yüksek Glukoz (YG) Altında Ang II Uyarımıyla Aktive olan Sinyal Yolakları	38
4.2.1.	VDKH Kültürlerinde NG ve YG'lu Ortamda Ang II'nin ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	39
4.2.2.	VDKH Kültürlerinde NG ve YG'lu Ortamda Ang II'nin Akt Fosforilasyonuna Etkileri	40
4.2.3.	Primer VDKH kültürlerinde NG ve YG'lu Ortamda Ang II Uyarımının STAT3 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	41
4.3.	VDKH Kültürlerinde Normal Glukoz ve Yüksek Glukoz Altında Ang II Uyarımıyla Aktive olan Sinyal Yolaklarında AT1 ve EGFR Reseptörünün Etkileri	43
4.3.1.	VDK Hücrelerinde NG ve YG'lu Ortamda Reseptör İnhibitörlerinin Ang II Uyarımlı ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	43
4.3.2.	VDK Hücrelerinde NG ve YG'lu Ortamda Ang II'nin Uyarımı Altında Reseptör İnhibitörlerinin pAkt Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	45
4.3.3.	VDK Hücrelerinde NG ve YG Ortamında Ang II'nin Uyarımı Altında Reseptör İnhibitörlerinin pSTAT3 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	46
4.4.	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Normal Glukoz ve Yüksek Glukoz Altında Ang II Uyarımıyla Aktive olan Sinyal Yolaklarına Resveratrolün Etkileri	48
4.4.1.	VDK Hücrelerinde NG ve YG'lu Ortamda, Ang II Uyarımı Altında, Resveratrolün ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	48
4.4.2.	VDK Hücrelerinde NG ve YG Ortamda Ang II Uyarımı Altında Resveratrolün Akt Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	49
4.4.3.	VDK Hücrelerinde NG ve YG Ortamda Ang II Uyarımı Altında Resveratrolün STAT3 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	51
4.5.	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Yüksek Glukozun Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri	52
4.6.	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Normal Glukoz ve Yüksek Glukozun Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri	53
4.7.	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Normal Glukoz ve Yüksek Glukozlu Ortamda Reseptör İnhibitörlerinin Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri	54

4.8.	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Normal Glukozlu Ortamda Resveratrolün Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri	56
4.9.	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Yüksek Glukozlu Ortamda Resveratrolün Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri	57
TARTIŞMA		59
SONUÇLAR		69
KAYNAKLAR		72
ÖZGEÇMİŞ		80
EKLER		81

EK-1 : “Angiotensin II Induced MAPK Phosphorylation Mediated By Ras and/or Phospholipase C Dependent Phosphorylations but not by Protein Kinase C Phosphorylation in Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells”

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	: Angiotensin Converting Enzim
AEC	: Amino Etil Karbizol
AhR	: Aril hidrokarbon Reseptörü
Ang I	: Anjiyotensin I
Ang II	: Anjiyotensin II
Ang III	: Anjiyotensin III
Ang IV	: Anjiyotensin IV
APS	: Amonyum Persülfat
AT1R	: Anjiyotensin Tip 1 Reseptörü
BCA	: Bisinkoninikasit
bFGF	: Temel fibroblast büyüme faktörü (basic Fibroblast Growth Factor)
BMK	: Büyük MAP kinaz (Big MAP kinase)
BSA	: Bovine Serum Albumin
[Ca⁺²]_i	: Hücre içi Kalsiyum Konsantrasyonu
Ca⁺²	: Kalsiyum
CBG	: Sitozolik-β-Glukozidaz
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
DAG	: Diaçil Gliserol
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EAS	: Enzim Ayrışma Solüsyonu
ECL	: Enhanced Chemiluminescence
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK 1/2	: Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz 1/2 (Extracelluler Signal Regulated Kinase 1/2)
ERT	: Elektroforez Çalışma Tamponu

ET-1	: Endotelin 1
FBS	: Fetal Bovine Serum
GDP	: Guanozin difosfat
GRK	: G protein Reseptör Tirozin Kinaz
GTP	: Guanozin Trifosfat
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution
HRP	: Horse - Radish Peroksidaz
IGF-1	: İnsülin-benzeri büyüme faktörü-1 (Insulin-like Growth Factor-1)
IL-6	: İnterlökün 6 (interleukin 6)
IP3	: İnositol Trifosfat
JNK	: c- Jun N-terminal Kinazlar
LPH	: Lactase Phlorizin Hydrolase
MAP2	: Mikrotübül-ilışkili protein-2 (Microtübül-Associated Protein 2)
MAPK	: Mitojen Aktive edici Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)
MBP	: Miyelin Temel Protein (Miyelin Basic Protein)
MCP-1	: Makrofaj Kemoatraktant Protein 1 (Macrophage Chemoattractant Protein 1)
MKK	: MAPK Kinazlar, MEK
MKKK	: MAPK Kinaz Kinaz, MEKK
MKP-1	: MAPK Fosfataz-1 (MAP Kinase Phosphatase-1)
MRP2	: Multi-drug Resistans Protein 2.
NR	: Normal Glukoz
oxLDL	: Okside düşük yoğunluklu Lipoprotein (Oxide Low Density Lipoprotein)
PDGF	: Trombosit-türevli büyüme faktörü (Platelet-Derived Growth Factor)
pH_i	: Hücre içi pH
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PI-PLC	: Fosfatidil İnoзит- Fosfolipaz C
PKB	: Protein Kinaz B
PKC	: Protein Kinaz C

PKD	: Protein Kinaz D
PLA₂	: Fosfolipaz A ₂
PLC	: Fosfolipaz C
PLD	: Fosfolipaz D
PMSF	: Fenilmetansulfonilflorid
PtdIns	: Fosfotidil İnozitol
PTPaz	: Protein Tirozin Fosfotaz
PYK2	: Prolinden zengin tirozin kinaz 2
RAS	: Renin Anjiyotensin Sistemi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
RS	: Mitokondriyal Süksinat Tetrazolium Redüktaz Sistem
RV	: Resveratrol
SAPK	: Stres Aktive edici Protein Kinazlar (Stress- Activated Protein Kinase)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SFM	: Serum İçermeyen (serum Free) Medyum
SGLT 1	: Sodium-Dependent Glucose Transporter1
Sos	: Son-of-sevenless
STİ	: Soya Tripsin İnhibitör
TBS	: Tris Buffer Salin
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü β (Transforming Growth Factor β)
VDKH	: Vasküler Düz Kas Hücresi
VSMC	: Vascular Smooth Muscle Cell
WR	: Working Reagent
YG	: Yüksek Glukoz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Arteriyal Duvarın Segmentleri	3
2.2. Klasik Renin-Anjiyotensin Sistem Şeması	4
2.3. Doku Renin-Anjiyotensin Sistem Şeması	5
2.4. VSMC’de Ang II aracılı ERK1/2 Aktivasyonu	9
2.5. VDKH’lerinde Ang II Uyarımı ile Aktifleşen Tirozin Kinaz Yolları ve Akt’nin Aktivasyonu	10
2.6. Jak-STAT Sinyal Yolu	11
2.7. Diyabet İlişkili Vasküler Hastalıklara Neden Olabilecek Ana Basamaklar	13
2.8. Resveratrolün Sentezi	14
2.9. Resveratrolün Emilimi	15
3.1. Protein Standart Grafiği	27
3.2. WST-1’in Prensibi	34
4.1. Vasküler Düz Kas Hücre Kültürlerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu	38
4.2. VDKH’lerinde NG ve YG ortamında Ang II’nin pERK1/2 Üzerine Etkisi	39
4.3. VDKH’lerinde NG ve YG ortamında Ang II’nin pERK1/2 Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	40

4.4.	VDKH'lerinde NG ve YG Ortamında Ang II'nin pAkt Üzerine Etkisi	41
4.5.	VDKH'lerinde NG ve YG Ortamda Ang II'nin pAkt Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	41
4.6.	VDKH'lerinde NG ve YG Ortamında Ang II'nin pSTAT3 Üzerine Etkisi	42
4.7.	VDKH'lerinde NG ve YG Ortamda Ang II'nin pSTAT3 Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	42
4.8.	VDKH'lerinde NG ve YG'lu Ortamda Reseptör İnhibitörlerinin Ang II Uyarımlı ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi	44
4.9.	VDKH'lerinde NG ve YG'lu Ortamda Reseptör İnhibitörlerinin Ang II Uyarımlı ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	44
4.10.	VDKH'lerinde NG ve YG'lu Ortamda Reseptör İnhibitörlerinin Ang II Uyarımlı Akt Fosforilasyonu Üzerine Etkisi	45
4.11.	VDKH'lerinde NG Ve YG'lu Ortamda Reseptör İnhibitörlerinin Ang II Uyarımlı Akt Fosforilasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	46
4.12.	VDKH'lerinde NG Ve YG'lu Ortamda Reseptör İnhibitörlerinin Ang II Uyarımlı STAT3 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi	47
4.13.	VDKH'lerinde NG Ve YG'lu Ortamda Reseptör İnhibitörlerinin Ang II Uyarımlı STAT3 Fosforilasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	47
4.14.	VDKH'lerinde NG Ve YG'lu Ortamda Resveratrolün Ang II Uyarımlı ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi	49
4.15.	VDKH'lerinde NG Ve YG'lu Ortamda Resveratrolün Ang II Uyarımlı ERK Fosforilasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	49
4.16.	VDKH'lerinde NG Ve YG'lu Ortamda Resveratrolün Ang II Uyarımlı Akt Fosforilasyonu Üzerine Etkisi	50
4.17.	VDKH'lerinde NG Ve YG'lu Ortamda Resveratrolün Ang II Uyarımlı Akt Fosforilasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	50
4.18.	VDKH'lerinde NG Ve YG'lu Ortamda Resveratrolün Ang II Uyarımlı STAT3 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi	51

4.19.	VDKH'lerinde NG Ve YG'lu Ortamda Resveratrolün Ang II Uyarımlı STAT3 Fosforilasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	52
4.20.	VDKH'lerinde YG'un Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	53
4.21.	VDKH'lerinde NG Ve YG'un Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	54
4.22.	VDKH'lerinde NG'lu Ortamda Reseptör İnhibitörlerinin Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	55
4.23.	VDKH'lerinde YG'lu Ortamda Reseptör İnhibitörlerinin Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	55
4.24.	VDK Hücrelerinde NG'lu Ortamda 24 Saatlik Resveratrol Ön İnkübasyonun Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	56
4.25.	VDK Hücrelerinde NG'lu Ortamda 48 Saatlik Resveratrol Ön İnkübasyonun Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	57
4.26.	VDK Hücrelerinde YG'lu Ortamda 24 Saatlik Resveratrol Ön İnkübasyonun Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	58
4.27.	VDK Hücrelerinde YG'lu Ortamda 48 Saatlik Resveratrol Ön İnkübasyonun Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Grafikselsel Gösterimi	58

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
3.1. Enzim Ayrışma Solüsyonu Bileşenleri ve Miktarları	21
3.2. Ayrışma jeli tamponu ve miktarları	28
3.3. Yükleme jeli tamponu ve miktarları	29

GİRİŞ ve AMAÇ

Diyabetes mellitus, pankreasın insülin salgısının veya etkisinin yetersizliği ile oluşan endokrin metabolik bir hastalıktır (1) ve hipertansiyon, aterosklerozis gibi kardiyovasküler komplikasyonlarla yüksek oranda ilişkilidir. Diyabetik hasta ölümlerinin en temel nedeni aterosklerotik vasküler hastalıklardır. VDKH kültürlerinde yapılan çalışmalarda diyabetik aterosklerozisin altında yatan temel nedenlerden birinin hipergliseminin indüklediği hücre proliferasyonları olduğu bilinmektedir (2) (3).

VDKH'lerinde vazomotor tonusu düzenleyen, hücre büyümesi ve apoptozisi dengeleyen, büyüme faktörlerinin salınımını uyaran en önemli etmen Ang II'dir. Dolayısıyla Ang II' nin damar duvarı üzerindeki etkilerinin anlaşılması, yüksek glukoz altındaki hücre proliferasyon yollarının belirlenmesi, kan basıncının düzenlenmesi ve kardiyovasküler hastalıkların altında yatan patolojilerin anlaşılması için temel teşkil etmektedir.

Yapılan çalışmalarda, Ang II'nin AT1 reseptörü üzerinden birçok sinyal iletim yolunu uyardığı ve aktiveşen bu sinyaller üzerinden hücre büyümesini, hücresel farklılaşmayı ve vasküler kontraksiyonları gerçekleştirdiği gösterilmiştir (4) (5) (6).

Vasküler hastalıklarda artan VDK hücre proliferasyonunda ERK1/2 sinyal iletim yolunun anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Ang II uyarımlı MAPK aktivasyonu, hiperglisemik koşullar altında yapılan düz kas hücre kültürlerinde artmış olarak bulunmuştur (3). Hiperglisemiye cevaben ROS ürünlerinin oluşumu, protein tirozin fosfotaz (PTPaz) aktivitesini üzerinden düzenlemektedir (7). Hücresel PTPaz'ın inhibisyonu fosforilasyon-defosforilasyon dengesini fosforilasyona doğru kaydırmaktadır. Bu durumda reseptör ve non-reseptör tirozin kinazların bazal aktivitelerinin artması, ilgili substrat proteinlerin tirozil fosforilasyonunu artırmaktadır. Dolayısı ile MAPK yolu ve transkripsiyon faktörlerin aktivasyonuna yol açmaktadır (8).

Ang II ile uyarılan vasküler düz kas hücre proliferasyonu ile ilişkili diğer bir yol, Jak-STAT sinyal yoludur (9). Marrero ve arkadaşlarının 1999'da rat aortik düz kas hücrelerinde yaptıkları çalışmada, yüksek glukoz konsantrasyonu ile 24 saat

muamele edilen hücre kültürlerinde, normoglisemik kültürlerle göre, Ang II uyarımlı Jak ve STAT fosforilasyonunun artışı görülmüştür. Araştırmalarda hipergliseminin potansiyel etkileri sonucu tespit edilen bu artışların mekanizmasından tam olarak bahsedilmemiştir (10).

Diyabetik komplikasyonlarda VDKH'lerindeki hücre proliferasyonları çalışılırken Ang II uyarımlı Akt/PKB sinyal yolları çalışılmış ve 27,5 mM yüksek glukoz şartlarında Akt aktivasyonunda artış saptanmıştır (11). Akt aktivasyonlarındaki bu artışın AT1 reseptörleri ve EGF reseptörleri üzerinden olduğu öne sürülmüştür. Normal glukoz şartları altında yapılan diğer çalışmalarda ise VDKH'lerinde Ang II uyarımı sonrasında aktiveşen Akt'nin vasküler hipertrofide önemli olduğu belirtilmiştir (12) (13) (14).

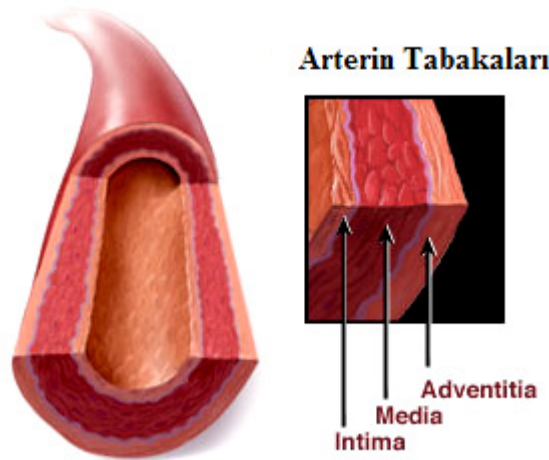
Son dönemlerde VDKH kültürlerinde Ang II' nin neden olduğu hücre proliferasyonu ve hücrel hipertrofiyi önleyebilmek için yeni strateji ve moleküller hedeflenmiştir. Haider ve ark. 2002, 2003 ve 2005 yılında yaptıkları çalışmalarda, polifenolik bir bileşik olan resveratrolün hücrel hipertrofi üzerine etkisini araştırmışlardır (15) (16). VDKH' lerinde resveratrolün hipertrofi üzerine etkilerinin araştırılmasına öncülük etmiş bu grubun çalışmalarında, resveratrolün hücrel proliferasyonu baskıladığı ve bu baskılanmadaki temel yolağın Akt proliferasyonu olduğu öne sürülmüştür. Resveratrolün farklı hücre gruplarında ERK1/2 aktivasyonunu baskıladığı da gösterilmiştir (17). VDK hücrelerinde Ang II uyarımı sonrasında hücreyi proliferasyona yönlendiren ERK1/2, Akt ve STAT3 sinyal yolları üzerine resveratrolün etkilerini gösteren çalışmalar yetersizdir. Yüksek glukoz koşullarında ise resveratrolün VDKH'lerindeki etkileri henüz anlaşılamamıştır.

Bu çalışmada rat aortalarından izole edilen vasküler düz kas hücrelerinde, normal ve yüksek glukozlu ortamda, resveratrolün Ang II uyarımı sonrasında aktiveşen ERK1/2, Akt ve STAT3 aktivasyonları üzerine olan etkileri ile resveratrolün hücre proliferasyonu üzerine olan etkileri ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda normal ve yüksek glukozlu ortamda Ang II uyarımı sonrasında aktiveşen ERK1/2, Akt ve STAT3 sinyal yolları ve bu sinyal yollarıyla ilişkili olan AT1R ile EGF reseptörleri western blot yöntemiyle çalışılmıştır. Resveratrolün bu sinyal iletim yolları üzerine olan etkileri, NG ve YG ortamlarda western blot yöntemiyle ayrı ayrı incelenmiştir. Son olarak ise, resveratrolün hücre proliferasyonu üzerine olan etkileri NG ve YG ortamda, farklı süre ve konsantrasyonlarda araştırılmış ve elde edilen bilgiler literatür yardımıyla değerlendirilip yorumlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1.Vasküler Duvar ve Anjiyotensin II

Vasküler duvar, esnek ve aktif bir organdır. Vasküler yapılar, hücre (endotelial hücreler, vasküler düz kas hücreleri, fibroblastlar) ve hücre (ekstraselüler matriks) komponentlerin birleşmesiyle oluşmuştur (Şekil 2.1). Arteriyal tabaka ise temelde içten dışa doğru intima, media ve adventitia tabakalarından meydana gelmiştir. Bu organ statik değildir, fizyolojik ve patofizyolojik uyarılara cevap olarak komponentleri artma ve azalma şeklinde değişikliğe veya yeniden yapılanmaya uğrarlar. İntakt Arteriyal media (düz kas hücreleri) ve matriks, aterosklerozis, restenoz ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde, damar duvarının kasılma-gevşeme, büyüme, gelişme, yeniden düzenlenme ve onarımını içeren birçok yapısal ve fonksiyonel özelliklerinden sorumludur (18).



Şekil 2.1. Arteriyal Duvarın Segmentleri. Arteriyal segmentler içten dışa doğru tek katlı epitelyum tabakası (intima), düz kas hücre tabakası (media), fibroblast ve elastik fiberlerin (adventisya) oluşturduğu yapılardan meydana gelmiştir.

Ang II, vasküler düz kas hücreleri (VDKH; vascular smooth muscle cell; VSMC) üzerinde birçok etkileri olan multifonksiyonel bir peptiddir. Ang II, vasküler motor tonusu, hücre büyümesi ve apoptosizi düzenleyen; hücre göçü ve ekstraselüler matriks deposizyonunda etkili olan proinflatuvar bir peptiddir. Ayrıca Ang II,

büyüme faktörleri (platelet türevli büyüme faktörleri gibi) ve vazokonstriktörleri (ET 1) uyaran bir peptiddir (4).

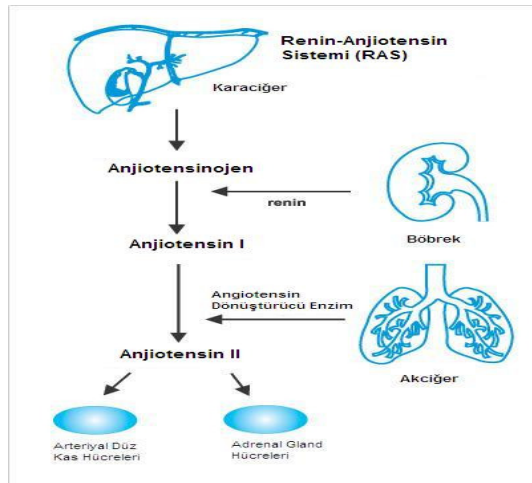
Ang II, damar duvarın yapısal ve fonksiyonel bütünlüğün kontrolünde temel rol oynamaktadır ve vasküler hastalıkların altında yatan patolojik mekanizmalar ile damar basıncının fizyolojik düzenlenmesinde önemli bir rol üstlenmektedir. Ang II'nin çok yönlü etkileri spesifik reseptörler aracılığıyla olmaktadır. Son derece karmaşık hücre içi sinyal yolları, peptidin hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasına takiben uyarılmaktadır (4).

2.2. Anjiyotensin II

2.2.1 Anjiyotensin II'nin Yapısı ve Biyosentezi

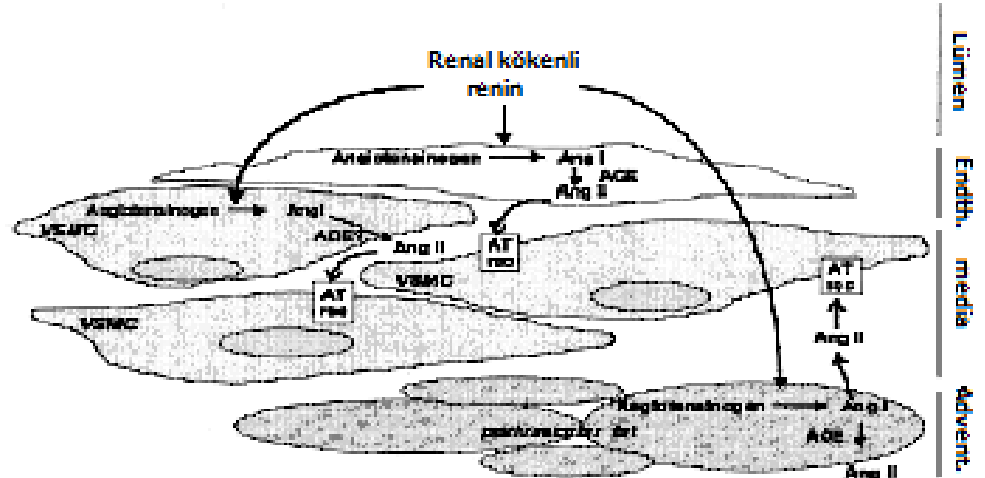
Bir oktapeptid olan Ang II, renin Anjiyotensin sisteminin (RAS) aktif bir bileşenidir. Ang II, kan basıncını aldosteron aracılığıyla sodyum salınımı ile plazma hacmini ve susama cevabını düzenlemektedir. Aynı zamanda Ang II, miyokardiyal enfarktüs sonrası miyokardiyal yeniden düzenlenme "remodeling" ve hipertansiyonun vasküler yeniden düzenlenmesinde temel rol oynamaktadır (4).

Ang II sistemik olarak klasik renal renin-anjiyotensin sistemi (RAS) ve lokal olarak da doku RAS aracılığıyla üretilmektedir. Klasik RAS'ta dolaşımda bulunan renal kaynaklı renin, dekaeptid olan anjiyotensin I (Ang I)'i oluşturmak için hepatik kaynaklı anjiyotensinojeni N-terminalinden keser. Anjiyotensin I, akciğerde dipeptidil karboksipeptidaz olan anjiyotensin-konvertir enzim (Angiotensin-converting enzyme; ACE) tarafından aktif olan Ang II'ye dönüştürülür. Ang II aminopeptidazlar tarafından Ang III ve Ang IV'e yıkılır (Şekil 2.2) (4)



Şekil 2.2. Klasik Renin-Anjiyotensin Sistem Şeması. Dolaşımdaki renal kökenli renin, hepatik kökenli anjiotensinojeni parçalar ve bir dekaeptit olan anjiotensin I (AngI)'i oluşturur. Akciğerdeki ve dokulardaki ACE Ang I'i Ang II'ye dönüştürür. Ang II, Ang III ve Ang IV ve Ang II'ye metabolize edilir.

RAS ilk keşfedildiği dönemlerde dolaşım sisteminin bir komponenti olarak düşünülmüştür. Ancak RAS' ın birçok bileşeninin dokularda da (lokal doku RAS) varlığı saptanmıştır (19) (20). Plazmada dolaşım enzimi olarak bulunan ACE aynı zamanda intertisyumda da bulunmaktadır. Doku ACE, bütün major organlarda (kalp, beyin, adrenal bez, böbrekler, karaciğer, üreme organları ve kan damarlarında) bulunmaktadır (21). Doku ACE aktivitesi, major organ gelişim sırasında yüksek oranda bulunmakta ve daha sonra bu aktivite azalmaktadır (22). Renin hariç, RAS' ın tüm bileşenlerinin damarsal yapılarda üretildiği gösterilmiştir. ACE, kültüre edilmiş vasküler düz kas hücreleri ve endotel hücreler de olduğu kadar adventisyada da bulunmaktadır (Şekil 2.3) (23).



Şekil 2.3. Doku Renin-Anjiyotensin Sistem Şeması. Anjiyotensinojen, ACE ve anjiyotensin reseptörlerinin endotel, vasküler düz kas hücreleri ve perivasküler tabakada gösterimi. Dolaşımdan adsorbe edilen doku kaynaklı anjiyotensinojen renal kaynaklı renin tarafından Ang I'e dönüştürülür. Ang I, doku ACE tarafından Ang II'ye yıkılır (4)

2.2.2. Anjiyotensin II'nin Reseptörleri

Ang II, memeli hücrelerinde en az iki yüksek afiniteli plazma membran reseptörleri aracılığıyla etkilerini gösterebilmektedir (AT1 ve AT2). İki reseptör tipide klonlanmış ve farmakolojik olarak karakterize edilmiştir (24) (25). Diğer iki Ang reseptörleri AT3 ve AT4 alt tipleri de tanımlanmıştır. AT3 reseptörü, peptide spesifik olarak en çok Ang II'yi tanımakta iken losartan gibi non peptid ligandı (selektif AT1 reseptör antagonisti) ve PD123319'u (selektif AT2 reseptör antagonisti) tanımamaktadır. Bu reseptör alt tipi sadece hücre dizilerinde gözlenmiştir (26). AT4 reseptörü kalp, akciğer, böbrek, beyin ve karaciğerde dağılmış olarak bulunmaktadır. Ang IV, AT4 reseptör tipine bağlanmaktadır ve AT4 reseptörü losartan ve PD123319'u tanımamaktadır (27). AT3 ve AT4 reseptörleri tam olarak karakterize edilememesinden dolayı bu reseptör tipleri memeli Ang II reseptörlerinin sınıflandırmasına girmemiştir (28).

AT1 reseptörü, G proteinine bağılı reseptörler arasında olup 7 transmembran heliksinden oluşur (4). Reseptör fosforilasyonunu içeren G proteine bağımlı reseptörlerin internalizasyonu, olasılıkla caveola aracılığı ile meydana gelmektedir. G protein bağımlı reseptörlerin intrinsek tirozin kinaz aktiviteleri olmamasına rağmen serin ve treonin birimlerinden G protein reseptör kinaz (GRK) ailesi aracılığı ile fosforillenmektedir (29).

Bu zamana kadar AT1 reseptörünün Ang II'nin birçok fizyolojik etkilerine aracılık ettiği, Ang II uyarımlı vasküler fonksiyonların kontrolünde baskın rol oynadığı gösterilmiştir (30). AT1 reseptörleri düz kas hücrelerinde yüksek oranda, adventisyada düz kasa oranla düşük seviyede ve endotelde saptanamayacak oranda azdır (31) (32).

Ang reseptörünün ikinci major izoformu olan AT2, fetal dokularda yüksek seviyelerde ifade edilmektedir ve doğum sonrası bu ifade hızla azalmaktadır (33). Yetişkinlerde AT2 reseptörü vasküler yapıların adventisya tabakasında baskın olarak bulunmakta iken media tabakasında saptanabilir orandadır. Ang II'nin AT2 reseptörü ile meydana getirdiği sinyal iletim yolları ve fonksiyonel rolleri tam olarak bilinmemesine rağmen bu reseptörlerin, intraselüler katyonların düzenlenmesi (özellikle sodyum) ve olasılıkla hücre büyümesinin inhibisyonu, vazodilatasyon ve apoptozisin uyarılması ile AT1 aracılı fizyolojik etkilerini antagonize ettiği düşünülmektedir (4)

2.2.3. Anjiyotensin II'nin Vasküler Etkileri

Ang II, doğrudan vasküler hücrelerde bulunan Ang II reseptörlerine, dolaylı yoldan diğer faktörlerin salınımı ile ve olasılıkla diğer vazoaktif ajanların ve büyüme faktörlerin hücre içi sinyal yolları ile etkilerini arttırmaktadır. Düz kas hücrelerinin birincil fonksiyonu vazokonstriksiyon olmasına rağmen, son kanıtlar vasküler yeniden düzenlenmede vasküler düz kas hücrelerinin sentez özelliklerinin de olduğunu göstermiştir (34). Ang II, bu gelişim süreci boyunca AT1 ve AT2 reseptörü aracılığı ile rol oynamaktadır. (35) (36). Ang II, AT1 reseptörü aracılığı ile vazokonstriksiyon, büyüme, migrasyon, ekstraselüler matriks komponentlerinin üretimi ve inflamasyonu uyarırken, AT2 reseptörü aracılığı ile apoptoz, proliferasyon ve hipertrofinin inhibisyonuna katkıda bulunmaktadır (32, 37).

2.2.4. Anjiyotensin II'nin Kardiyovasküler Hastalıkların Gelişimindeki Rolü

Aterosklerozisin, endotel disfonksiyon ve lipid yüklü makrofajların birikmesi ile oluşan kronik inflamatuvar bir hastalık olduğu düşünülmektedir (38). İlginçtir ki, Ang II aterosklerozun bir çok özelliğini taklit edebilir ve inflamasyon ve oksidatif stresi tetikleyebilir (39). Ang II, damar duvarında oksidatif stresten sorumlu olan

reaktif oksijen türlerinin (Reactive-oxygen spesies; ROS) oluşumuna katılabilir. Damar duvarındaki ROS'un en önemli kaynağı ilk kez lökositlerde keşfedilmiş olan NAD(P)H oksidaz olup enzim vasküler hücrelerde eksprese edilmektedir. Vasküler sistemlerdeki diğer potansiyel ROS kaynakları ksantin oksidaz, lipooksijenazlar, sitokrom P₄₅₀ monooksijenazlar ve miyeloperoksidazlardır (40).

ROS oluşumunun artışı Ang II tarafından, endotel disfonksiyon ve LDL'nin oksidasyonuna bağlı olarak tetiklenir. Okside LDL'nin (oxLDL) vasküler hücrelerdeki aktivasyonu inflamasyonu tetikler ve T-lenfositleri ile monositler bu bölgeye hareket ederler. Aslında damar duvarındaki bu birikimin aterosklorozun erken evrelerindeki bir çok olayı tetiklediği düşünülür (41). oxLDL ve doku makrofajlarının birikmesi köpük hücre oluşumuna sebep olur ve aterosklerotik plaklar oluşur. Ayrıca Ang II, endotel hücreler ve vasküler düz kas hücrelerinde hücre adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırarak, damar duvarının lökosit infiltrasyonunu arttırır (42). Endotel hücrelerde Ang II, apoptozisi tetikleyebilir ve tek tabaka endotel hücrelerdeki hasara sebep olabilir (42).

Ang, VDKH kültürlerinde hücresel hipertrofinin sebep olduğu protein sentezini uyarır (43). Diğer büyüme faktörleri gibi Ang II, VDKH kültürlerinde hiperplaziyi indükleyebilir ve Ang II'nin uzun süreli infüzyonu normal ve karotid balon yaralı ratlarda VSMC proliferasyonunu arttırır (44). Ek olarak Ang II'nin VSMC hücre geçişini aktive ettiği gösterilmiştir (45).

Ang II çeşitli büyüme faktörü ürünlerini, sitokinleri ve kemokinleri, makrofaj kemoatraktant protein 1 (macrophage chemoattractant protein 1; MCP-1), interlökin 6 (interleukin 6; IL-6), transforme edici büyüme faktörü β (transforming growth factor β ; TGF- β), trombosit-türevli büyüme faktörü (platelet-derived growth factor; PDGF), insülin-benzeri büyüme faktörü-1 (insulin-like growth factor; IGF-1), temel fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor; bFGF) ve epidermal büyüme faktörü ailesi (epidermal growth factor; EGF) üyelerini indükler (42).

IL-6 matriks metalloproteinazların aktivasyonu ile ilişkili olmasına karşın (46), VDKH'lerinde matriks proteinazlar üzerinde Ang II'nin direkt etkileri rapor edilmiştir (42).

Bunun dışında, Ang II ekstraselüler matriks (ECM) kompozisyonundaki değişiklikleri tetikler. ECM'nin kontraktıl düz kas hücre sentezi az miktardadır fakat vasküler yeniden düzenlenme esnasında elastin, kollajen ve fibronektin sentezi önemli bir miktarda artmaktadır. İlginçtir ki ekstraselüler ortamdaki bu değişiklikler VDKH'de proliferasyonu ve migrasyonu desteklemektedir (42).

2.2.5. Anjiyotensin II-Bağımlı Sinyal Yolları

Ang II, VDK hücrelerinde birçok sinyal iletim yolunu aktive edebilmektedir. Ang II'nin bu aktivatör etkisi, hücreyi büyüme ve çoğalma yönünde uyaran sinyal yollarından mitojen aktive edici kinazlar (ERK1/2) başta olmak üzere, STAT ve Akt fosforilasyonlarında da etkilidir.

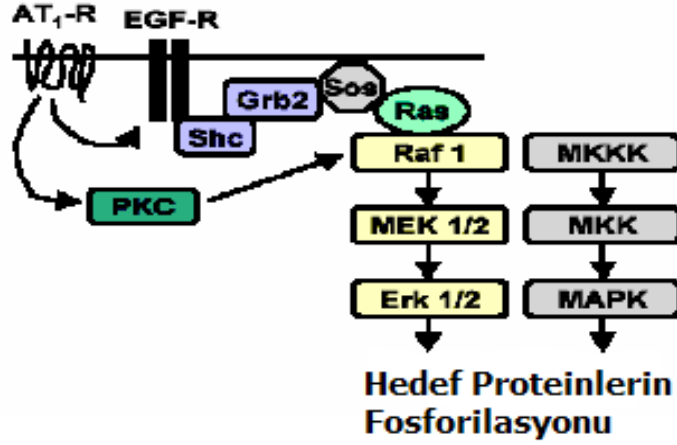
2.2.5.1.Mitojen Aktive Edici Kinaz Sinyal İletim Yolu

Mitojen aktive edici kinazlar (Mitogen-activated protein kinase; MAPK) serin/treonin protein kinazların bir ailesidir ve hücre içi protein fosforilasyonları ile hücre dışı sinyallerin nukleusa iletimine aracılık ederler. Bu yolla transkripsiyonel faktörler aktive olarak gen ekspresyonları artır ve hücrel cevap oluşur. Memeli MAP Kinazları 6 ana alt ailede toplanır (47);

- 1) ERK1/2 (sırasıyla p42-kDa MAPK ve p44-kDa MAPK olarak da bilinir)
- 2) c-Jun N-terminal kinazlar (JNK) 1, 2, 3 ve Stres Aktive edici Protein Kinazlar (SAPK),
- 3) p38 MAPK,
- 4) ERK6, p38 benzeri MAPK,
- 5) ERK3 ve
- 6) ERK5 (Big MAPK 1 olarakta adlandırılır)

MAPK bağımlı sinyal yolları hücre büyümesi, apoptosiz, hücrel farklılaşma, transformasyon ve vasküler kontraksiyondan sorumludur. ERK1/2 büyüme ve farklılaşma uyarılarına cevap verirken, JNK ve p38 MAPK genellikle sitokinlere ve hücrel strese cevap verir (18). Kültüre VDKH'lerinde Ang II, MAPK ailesinden ERK1/2, JNK'lar ve p38'i aktive etmektedir (19,20). MAPK aktivasyonun uyarımı tipik olarak MAPK kinaz'ın (MEK olarak da bilinir) fosforilasyonunu içermektedir. MEK, Raf-1 içeren diğer MEK kinaz tarafından düzenlenir. Ang II ile aktive olan MAPK'ların sinyalizasyon yolları birbirinden farklıdır. En iyi karakterize edilen MAPK kaskadı Raf-Ras-MEK-ERK1/2'dir (Şekil 2.4) (4).

ERK'ler bir kez fosforile edildiğinde nukleusa transloke olurlar, transkripsiyon faktörleri fosforlanır ve gelen sinyalle, ilgili hücre döngüsüyle ilişkili proteinlerin gen ifadeleri düzenlenir (48). VDKH'lerinde ERK'lerin alt basamak hedefleri S6 ribozomal proteini fosforlayan serin/treonin protein kinaz pp90^{rsk} olup protein sentezini uyarır (29).



Şekil 2.4. VSMC’de Ang II aracılı ERK1/2 (MAPK) Aktivasyonu (49)

Ang II, ERK’lere ek olarak, JNK/SAPK’leri de aktive etmektedir. JNK/SAPK’lar VDKH’lerinin büyümesini, büyümeyi inhibe ederek veya apoptozisi uyarak düzenlemektedir (50). VDKH’lerinde Ang II, ERK1/2 ve JNK/SAPK’leri farklı sinyalizasyon yollarından uarmaktadır.

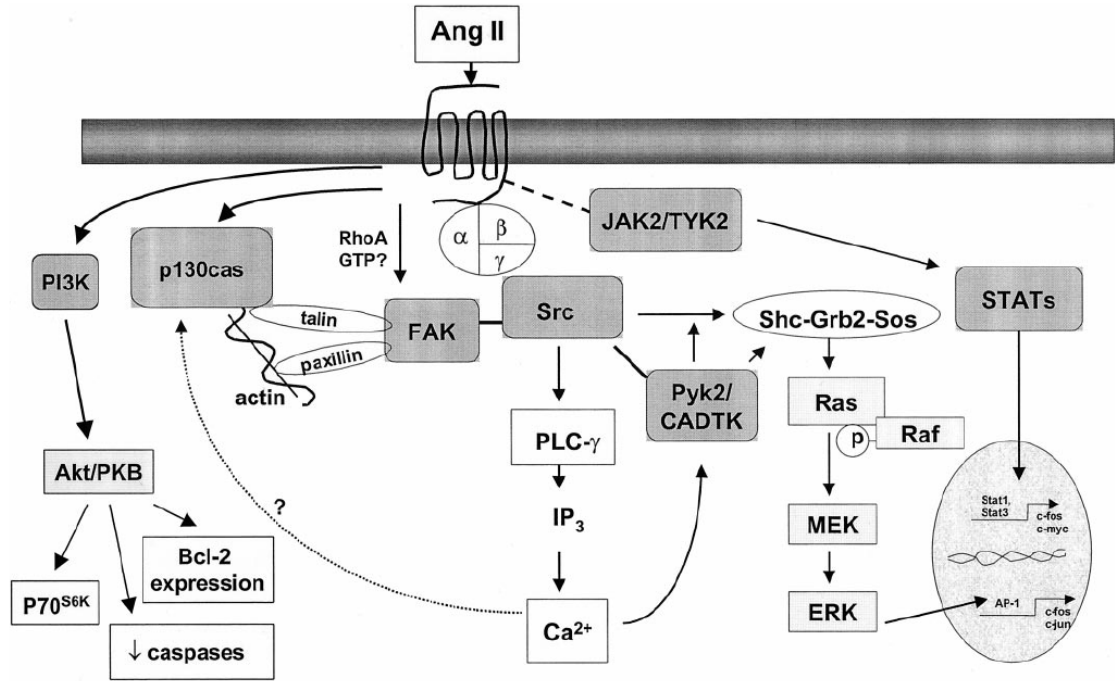
ERK fosforilasyonu hem Ca^{2+} bağımlı hem de c-Src’yi içeren Ca^{2+} bağımsız yollardan ve atipik PKC izoformu PKC- ξ tarafından aktive olmakta iken JNK/SAPK’lar klasik PKC izoformunu ve Src’den farklı tirozin kinazı içeren Ca^{2+} bağımlı yollardan aktive olmaktadır (51). Ang II her iki yoluda aktive etmektedir, ancak zıt büyüme etkilerine sahiptir. ERK’ler kolaylaştırıcı, JNK/SAPK’lar ise inhibe edici etkileri söz konusudur (52).

Ang II aynı zamanda vasküler p38 MAPK’da fosforile etmektedir. p38 MAPK, inflamatuvar cevapta, apoptozisde ve hücre büyümesinin inhibisyonunda önemli rol oynamaktadır. p38 MAPK, kardiyak hipertrofi, iskemi/reperfüzyon hasarı, ateroskleroz, hipertansiyonda arteriyal remodeling gibi bir çok patolojilerle ilişkilidir. VDKH’lerinde Ang II uyarımlı p38 MAPK, redoks duyarlı sinyalizasyon yollarının temel bir komponenti olarak ilişki halindedir (53).

2.2.5.2. Fosfotidilinositol 3-Kinaz (PI3K) ve AKT Sinyal İletim Yolu

PI3K, p85 adaptör ve p110 katalitik alt ünitelerden oluşan heterodimerik bir enzimdir. PI3K’in major ürünleri apoptozisin regülasyonunu, farklılaşmayı, membran değişimlerini ve hücre iskeletinin organizasyonunu etkilemektedir. Ayrıca PI3K, VDKH’lerin büyümesinin düzenlenmesinde de önemli rol oynamaktadır. Karakteristik olarak reseptör tirozin kinazlarla ilişkili olan PI3K, aynı zamanda AT1 reseptörü ile de aktive olabilmektedir. VDKH’lerinde Ang II, PI3K’in aktivitesini, fosforilasyonunu ve migrasyonunu stimüle etmektedir. Kültüre edilmiş rat

hücrelerinde PI3K'in inhibitörleri, Ang II'nin uyardığı hiperplaziye engellemiştir (54). Bu durum PI3K'in VDKH büyümesinde non-reseptör kinazları düzenlenmesinde önemli rolü olduğunu desteklemektedir. PI3K için bir çok moleküler hedef bulunmuştur. PI3K'in VDKH'lerinde Ang II'nin aktive ettiği en önemli aşağı iletim yolu Akt/PKB'dir. Akt, p70-s6 kinazı aktive ederek protein sentezini düzenlemektedir (Şekil 2.5). Aortik hücrelerde Akt, Ca^{2+} kanal akımlarını uyarak Ang II aracılı Ca^{2+} cevaplarını düzenlemektedir. Akt, c-Myc'nin ekspresyonu arttırıp ve kaspazların inhibe ederek VDKH'lerini apoptozisden koruyup hücrelerin hayatta kalımını (survival) arttırmaktadır. VDKH'lerinin Ang II sinyalizasyonda PI3K'in gerçek rolü tam anlaşılamamasına rağmen PI3K, mitogenez ve apoptozis dengesinin kontrolünde önemli ve kompleks bir yoldur (54) (12).



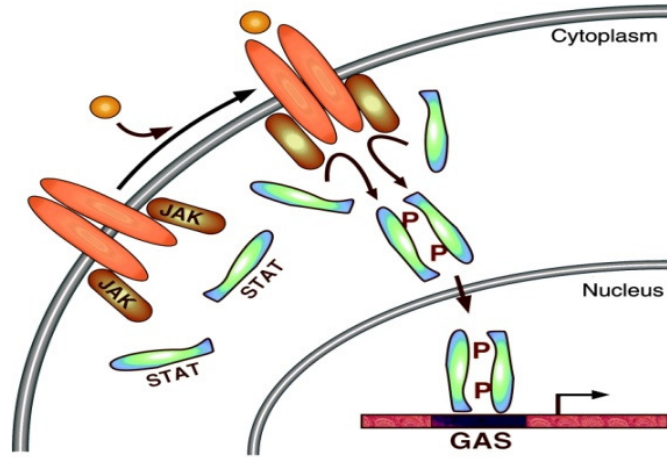
Şekil 2.5. VDKH'lerinde Ang II ile Aktifleşen Tirozin Kinaz Yolları ve Akt'nin aktivasyonu (4).

2.2.5.3. Janus Ailesi Kinazlar ve STAT Sinyal Yolu

IFN- α 'nın genleri hızlıca indüklenme özelliği Jak-STAT (Janus kinases-Signal transducers and activators of transcription) yolunun keşfine yol açmıştır. Sitosolik tirozin kinazların janus kinaz (JAK) ailesi, ki bunlar geleneksel olarak interlökinler ve interferonlar için sitokin reseptörleri ile eşleşmiş oldukları düşünülmektedir. Bunlar 120-130 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip dört üyeden oluşmaktadır; JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2 (55). JAK proteinleri mRNA ekspresyonunun anahtar mediyatörleridir ve "erken büyüme cevap genleri" olarak karakterize edilmiştir. Ligandlar (Örneğin hematopoetinler, Ang II, interferonlar), dimerik reseptörlerine bağlandığı zaman reseptörler ilişkili Jak'lara uygun konformasyonel değişikliğe

uğrarlar. Takiben Jak'lar spesifik tirozin motiflerinden fosforlanarak aktive olurlar. Bu motifleri tipik SH2 birimlerinden tanıyan STAT'lar ve diğer sinyal iletim proteinleri, reseptörleri tarafından tanınırlar ve Jak-bağımlı tirozin fosforilasyonu ile aktive olurlar. STAT proteinleri, spesifik biyolojik cevabın belirlenmesinde kritik basamağı oluşturur. STAT'lar aktive oldukları zaman reseptörlerinden ayrılırlar ve karşılıklı olarak SH2 birimlerinin fosfotirozini ile etkileşerek dimerize olurlar. Klasik olarak sadece aktive ve dimerize STAT'lar DNA'ya bağlanabilme ve hızlı nükleer transkripsiyona neden olabilmektedir (Şekil 2.6) (56, 57). Jak-STAT yolağı hücre yüzey reseptörleri ile hücre büyümesine yol açan nükleer transkripsiyonel olaylar arasında önemli bir bağlantıdır. Saatler içinde ligandların stimüle ettiği sinyaller azalır ve STAT'lar tekrar sitoplazmaya döner. Bu taşıma crm1/ran-GTPaz'ın aracılığı ile ve STAT defosforilasyonunu gerektiren bir mekanizma ile gerçekleştirilir (58).

Klasik sitokin reseptörlerinde olduğu gibi AT1 reseptörü de JAK ailesi üyelerinden JAK2 ve TYK2'yi stimüle etmektedir (59). AT1 reseptörü aracılı JAK aktivasyonu, STAT proteinleri p91/p84 (STAT1 α/β), p113 (STAT2) ve p92 (STAT3)'ün fosforilasyonunu stimüle etmektedir.



Şekil 2.6. Jak-STAT Sinyal Yolu: Ligandlar, dimerik reseptörlerine bağlandığı zaman ilişkili Jak'lar uygun konformasyonel değişikliğe uğrarlar. Takiben Jak'lar spesifik tirozin motiflerinden fosforlanarak aktive olurlar. Bu motifleri tanıyan STAT'lar, Jak-bağımlı tirozin fosforilasyonu ile aktive olurlar. STAT'lar aktive oldukları zaman reseptörlerinden ayrılırlar ve karşılıklı olarak etkileşerek dimerize olurlar. Nukleusda bir çok STAT dimeri, artırıcı DNA bölgelerinden (enhancer) GAS (gama-activated site) ailesi üyelerini tanır ve onlara bağlanır (56).

2.3. Hiperglisemi ve Ang II Uyarımlı Sinyalizasyon

Diyabet, hipertansiyon ve aterosklerozis gibi kardiyovasküler komplikasyonlarla yüksek oranda ilişkilidir ancak mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. VDKH kültürlerinde yapılan çalışmalarda diyabetik aterosklerozisin altında yatan temel nedenlerden birinin hipergliseminin indüklediği hücre proliferasyonları olduğu bilinmektedir (2) (3). Yüksek glukoz koşullarında (25 mmol/L) üretilen VDKH kültürlerinin normal glukoz koşullardaki (5 mmol/L) kültürlerle göre daha hızlı proliferere oldukları gözlenmiştir (9). Bununla birlikte VDKH kültürlerinde hiperglisemik şartlar altındaki spesifik sinyal aktivasyonları henüz tam olarak tanımlanamamıştır. Bunun en temel nedeni hücre proliferasyonunda birçok aracı sinyal molekülünün var olması ve bunların birbirleri ile olan etkileşimlerinin tam olarak belirlenememesidir. Aşağıdaki paragraflarda hücre proliferasyonuna aracılık eden sinyal yolları ve bunların hiperglisemik koşullar altındaki çalışmalarına değinilmiştir.

Ang II uyarımı altında aktiveleşen ERK1/2 sinyal iletim yolu VDKH proliferasyonuna ve hipertrofisine neden olduğu için vasküler hastalıklarda anahtar rolü oynamaktadır (3). Ang II uyarımlı MAPK aktivasyonu, hiperglisemik koşullar altında yapılan düz kas hücre kültürlerinde artmış olarak bulunmuştur. Yüksek glukozu cevaben MAPK yolunun aktivasyonu VDKH'lerin proliferasyonunu, gen ekspresyonunu ve büyümesini arttırabildiği Natarajan ve arkadaşları tarafından öne sürülmüştür (3).

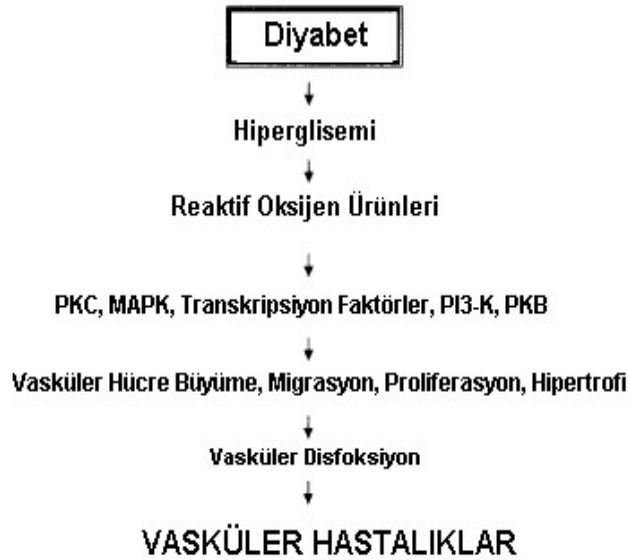
Moleküler düzeyde bir çok sinyal iletim yolu oksidatif stres ile aktive olmakta, böylece hücre proliferasyonuna ve büyümesine katkıda bulunmaktadır (60) (61) (62). VDKH'lerinde bu yolların bazıları hiperglisemiye cevaben uyarılmaktadır. VDKH'lerinde hipergliseminin indüklediği, Ang II uyarımlı ERK1/2, p38 MAPK ve Jak/STAT aktivasyonu, normoglisemik hücrelere göre artmış olarak bulunmuştur. VDKH'lerinde hücre proliferasyonuna aracılık eden proteinler, hiperglisemiye cevaben oluşan ROS ürünlerinin, protein tirozin fosfotaz (PTPaz) aktivitesini inhibe ederek düzenlemektedir (7). Hücresel PTPaz'ın inhibisyonu fosforilasyon-defosforilasyon dengesini fosforilasyona doğru kaydırmaktadır. Bu durumda reseptör ve non-reseptör tirozin kinazların bazal aktivitelerinin artması, ilgili substrat proteinlerin tirozil fosforilasyonunu artırmaktadır. Dolayısı ile MAPK yolu ve transkripsiyon faktörlerin aktivasyonuna yol açmaktadır (60).

Vasküler düz kas hücre proliferasyonunun Ang II ile indüksiyonunu içeren diğer bir yol, Jak-STAT'dır. Marrero ve arkadaşlarının 1999'da rat aortik düz kas hücrelerinde yaptıkları çalışmada, hipergliseminin Ang II ile indüklenmiş Jak-STAT sinyalizasyonu üzerine olan etkileri araştırılmıştır (9). Yüksek glukoz konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen hücre kültürlerinde, normoglisemik

kültürlere göre, Ang II uyarımlı Jak ve STAT fosforilasyonunun artışı görülmüştür. Hiperglisemik koşullarda özellikle Jak2'nin, hem fosforilasyonunda hem de AT1 reseptörü ile kompleks oluşumunda artış gözlenmiştir. Araştırmalarda hipergliseminin potansiyel etkileri sonucu tespit edilen bu artışların mekanizmasından bahsedilmemiştir (10). VDKH'lerinde hiperglisemi ile artan Ang II uyarımlı Jak-STAT sinyalizasyonun hangi mekanizma üzerinden gerçekleştiği konusunda bulgular yetersizdir.

Diyabetik komplikasyonlarda VDKH'lerindeki hücre proliferasyonları çalışılırken Ang II uyarımlı Akt/PKB sinyal yolları çalışılmış ve 27,5 mM yüksek glukoz şartlarında Akt aktivasyonunda artış saptanmıştır (11). Akt aktivasyonlarındaki bu artışın AT1 reseptörleri ve EGF reseptörleri üzerinden olduğu öne sürülmüştür. Normal glukoz şartları altında yapılan diğer çalışmalarda ise VDKH'lerinde Ang II uyarımı sonrasında aktifleşen Akt'nin vasküler hipertrofiye önemli olduğu belirtilmiştir (12-14).

VDKH'lerinde birçok sinyal iletim yolu hiperglisemiye cevaben aktive olmaktadır. Bu yollar uygun bir şekilde düzenlenmezse, VDKH'lerinin anormal büyümesine, migrasyona ve proliferasyona neden olabilecek potansiyeldedir. Böylelikle diyabette vasküler disfonksiyona neden olabilmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Diyabet ilişkili vasküler hastalıklara neden olabilecek ana basamaklar (4).

Son dönemlerde VDKH kültürlerinde Ang II'nin neden olduğu hücre proliferasyonu ve hücresel hipertrofiyi önleyebilmek için yeni strateji ve moleküller hedeflenmiştir. Haider ve ark. 2002, 2003 ve 2005 yılında yaptıkları çalışmalarda

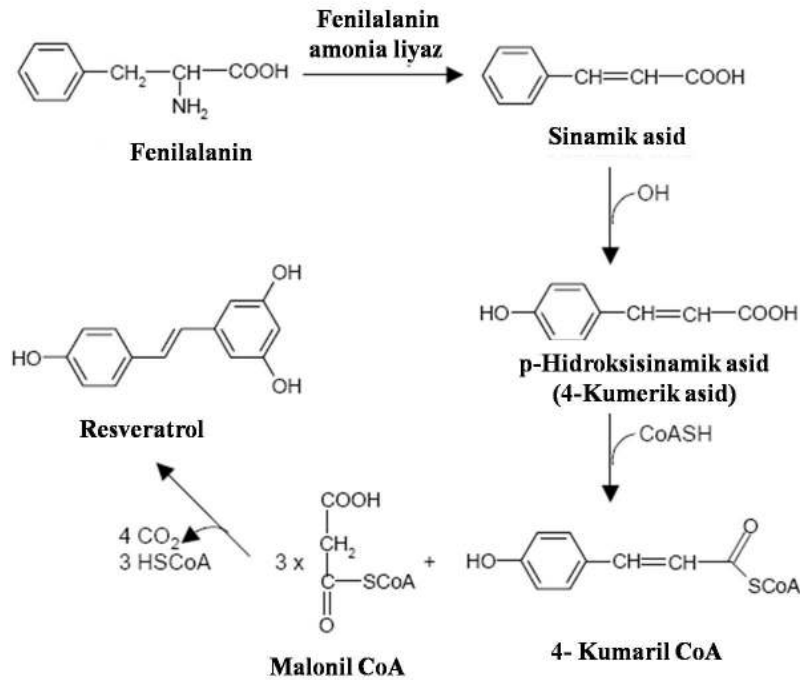
polifenolik bir bileşik olan resveratrol'ün hücrel hipertrofi üzerine etkileri araştırılmıştır (15, 16, 63). VDKH'lerinde resveratrolün hipertrofi üzerine etkilerinin araştırılmasına öncülük etmiş bu grubun çalışmalarında resveratrolün hücrel proliferasyonunu baskıladığı ve bu baskılanmadaki temel yolağın Akt proliferasyon yolağı olduğu öne sürülmüştür. Ancak yüksek glukoz koşullarında resveratrolün VDKH'lerindeki etkisi ve proliferasyon yolakları henüz anlaşılamamıştır.

2.4. Resveratrol

Resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroksistilbene) üzüm, fıstık ve dut gibi spermatofitlerde bulunur. İlk defa 1963 yılında *Polygonum cuspidatum*'dan izole edilmiştir. Çin ve Japon yerel kültürlerinde uzun yıllardan beri yer almasına rağmen 1992 yılında kırmızı şarapta bulunduğundan sonra dikkatleri üzerine çekmiştir (64). Resveratrol üzümde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır.

2.4.1. Sentezi

Resveratrol fenilalanininden birden fazla basamakla sentezlenir. (Şekil 2.8). Resveratrol biyosentezini stilben sentaz enzimi kataliz eder. Resveratrol bitkiler tarafından strese yanıt olarak üretilir ve normalde fazla miktarda üretilmez. Resveratrolün biyosentezi *p*-kumarol-CoA'nın *p*-kumarol kalıntısı ile malonil-CoA'dan 3 adet C-2 alt ünitesinin dekarboksilasyonu ile kondensasyon sonucu oluşur. Daha ileri reaksiyonları resveratrolün bifenolik halkasının 3. pozisyonunda glikozil yada sülfat kalıntıları ile konjuge olmasıdır (65).

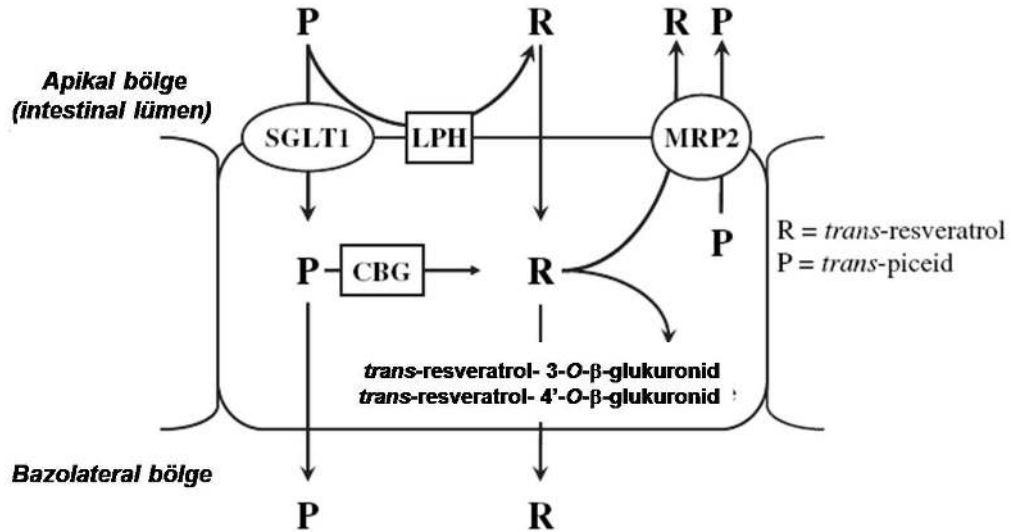


Şekil 2.8. Resveratrolün Sentezi (54).

2.4.2. Emilimi

Resveratrolün büyük kısmı jejunumdan, az kısmı ileumdan emilir. Bazolateral tarafa transport edilen resveratrolün çoğu, glukuronid ve sülfat formlarına konjuge edilir.

Tüm perfüze edilen resveratrolün ve konjugatlarının yalnızca % 6'sı barsak epitelinin geçmektedir (65). Resveratrol diyet ürünlerinde *cis* ve *trans* şeklinde bulunur. Glikozile formu 3-O- β -D-glukozid'tir. Glikozilasyon resveratrolün enzimatik olarak oksidasyonunu önler ve böylece biyolojik etkinliğini korur, kararlılığını ve biyoyararlanımını artırır. Barsak hücreleri sadece glikozile olmayan resveratrolü absorbe ettiği için emilim sürecinde glikozidazlar gerekir. Yiyecekteki glikolize olmayan ve glikozile resveratrolün göreceli oranları emilim hızını düzenler. Emilimi esnasındaki formu olan Trans-piceidin deglikozile edilmesi, ince barsakta laktaz florizin hidrolaz [Lactase phlorizin hydrolase (LPH)] ve sitozolik- β -glukozidaz [Cytosolic β -glucosidase (CBG)] tarafından olmaktadır. Enterositlere geçişte trans-piceid'in 2 yolu vardır: Birinci yol apikal membran üzerinde bulunan LPH iledir. Lümeneye glikozile olmayan trans-resveratrol olarak salınır. Daha sonra karşı tarafa difüze olur. İkinci yol sodyuma bağlı glukoz taşıyıcısı 1 [Sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT 1)] ile fırçası kenar (brushborder) membranını geçtikten sonra CBG ile glukozidlerin yıkımıdır. Deglikozilasyondan sonra trans-piceid'ten trans-resveratrol oluşmaktadır. Trans-resveratrol enterositlerde daha ileri metabolize edilir, oluşan yeni bileşik glukuronik konjugatıdır. Major glukuronat trans resveratrol-3-O- β -glukuronid'tir. Glukurokonjugat enterositlerden barsak lümenine salınır (Şekil 2.9) (66).



Şekil 2.9. Resveratrolün emilimi (66). MRP2, multi-drug resistans protein 2.

2.4.3. Resveratrolün Dokulara Taşınması

Resveratrolün hidrofilik konjuge hale gelmesi kana geçişini, vücutta dağılımını ve ekskresyonunu kolaylaştırır. Resveratrol ve metabolitleri karaciğer ve safra kesesi tarafından kandan filtre edilerek safra ile barsaklara atılır. Daha sonra geri emilime uğrar. Resveratrol oral yolla alındıktan kısa süre sonra kolonda bulunur. Ancak dokulara dağılımı birkaç saat alır. Resveratrol karaciğerde glukuronatlanır, karaciğer ve duodenumda sülfatlanır. Sülfatla konjugasyon resveratrolün biyoyararlanımında hız sınırlayıcı basamaktır. Diyetle alınan oral dozun % 70'i plazmada resveratrol ve konjugatları şeklinde tepe noktaya erişir; yarı ömrü dokuz saattir. Değişmemiş resveratrol eser miktarda plazmada saptanır (67).

2.4.4. Resveratrolün Hücre İçi Reseptörlere Bağlanması

Resveratrolün hücre içi reseptörleri konusunda bilinenler çok azdır. Aril hidrokarbon reseptörüne (AhR) bağlanan digoksinin kompetitif antagonist olabileceği gösterilmiştir. Resveratrol, AhR'nin nukleusa tranlokasyonunu sağlamaktadır. Genistein ve resveratrol gibi fitoöstrojenler, insan östrojenleri ile bazı yapısal benzerlikler göstermekte ve östrojen reseptörüne bağlanabilmektedir. Bazı çalışmalarda da resveratrol ile östrojen reseptörleri arasındaki etkileşim gösterilmiştir (68). Resveratrol, östrojenle ilgili genlerin ifadenmesini indüklemek için estradiol ile kombine olduğunda "süperagonist" olarak fonksiyon görmektedir. Son yapılan çalışmalarda resveratrolün her iki izomerinin ılımlı konsantrasyonda ($>10 \mu\text{M}$) yalnızca süperöstrojen etkinliğine sahip olduğu; daha düşük konsantrasyonlarda ($<1 \mu\text{M}$) antiöstrojenik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Resveratrol meme kanseri hücrelerinde östrojen reseptör agonisti olarak rol oynamaktadır (69).

2.4.5. Resveratrolün Atılımı

Atılım zamanı plazmada bulunan resveratrolün konsantrasyonuna bağlıdır. Üretilen miktar ile atılan miktar arasında ilişki yoktur. Çok küçük miktarda glikozile olmayan resveratrol idrarda bulunur. Böbrekte başlıca doğal formda bulunurken, idrarda konjuge formu büyük çoğunluktadır (65).

2.4.6. Resveratrolün Sinyal İletim Yolları ve Kardiyoprotektif Etkileri

Resveratrol, mitogen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskadını harekete geçirebilir. MAPK'ların yolun aşağısına doğru hedefleri mitojenik pro-enflamatuar enzimler ve nükleer transkripsiyon faktörleridir. Hücre içerisinde resveratrol farklı roller oynar. Resveratrol, protein kinaz C (PKC) fosforilasyonunu inhibe ederek yolun yukarısına etki eder. Resveratrol MAPK kaskadını etkinleştiren diğer kinazları, fosfoinozitol 3-kinaz (PI3K) fosforilasyonunu ve protein kinaz B'nin (Akt/PKB) fosforilasyonunu inhibe eder. Bu olaylar ile resveratrol vasküler düz kas hücrelerinde p70S6K'nın fosforilasyonunu azaltır. Resveratrol ERK1/2/JNK/p38'in tirozin fosforilasyonunu ve vasküler hücrelerde nükleusa geçişini inhibe ederek

MAPK kaskadını aşağıya doğru baskılar. Fosforilasyonun ve sitoplazmadan nükleusa geçişin inhibisyonu vazokonstriksiyon, anjiyogenez, çoğalma ve farklılaşma ile ilgili genlerin ifadenmesini azaltmaktadır (70, 71).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda resveratrolün kardiyoprotektif özelliği tespit edilmiştir. Kardiyak hasarın akut ve kronik modellerinde, resveratrol miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarının şiddetini azaltmaktadır (69).

MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal ve Kimyasal Malzemeler

Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS), kalsiyum klorid (CaCl_2), hepes, elastaz, kollejenaz, soya tripsin inhibitör, bovine serum albumin, fetal bovine serum, L-glutamin, penisilin-streptomisin ve DMEM Sigma'dan satın alındı.

Tripsin-EDTA, Biochrome'den satın alındı. Hücre kültüründe kullanılan petriler, flasklar ve 15 ml'lik plastik tüpler ile benzeri sarf malzemeler R&D Falcon firmasından satın alındı.

Hücre kültüründe aktivatör olarak kullanılan Anjiyotensin II ve resveratrol Sigma'dan, inhibitörler ise Calbiochem'den satın alındı. AT1 antagonisti losartan, Merck Sharp&Dohme firması tarafından hediye edildi.

İmmünohistokimyasal analizler için Dako marka immünohistokimya kiti kullanıldı. İmmünohistokimya için kullanılan primer ve sekonder antikolar Sigma'dan alındı.

Protein ölçümleri için Bio-Rad marka protein deney kiti, western blot için Bio-Rad Mini-Protean deney seti, sinyal dedeksiyonlarında Bio-Rad ve Pierce kemilüminesan kit, Milipor marka 0.45 μm por genişliğindeki nitroselüloz membranlar kullanıldı. Membranlar filme aktarılırken Amersham marka yüksek kaliteli film ile filmlerin geliştirilmesinde Illugater marka developer ve fiksatif satın alındı. Metanol Merck'den alındı.

Western blot işleminde kullanılan pERK primer antikoru Sigma'dan, pSTAT3, pAkt primerler antikoları, Anti-mouse Ig ve Anti-rabbit Ig sekonder antikoları Cell Signaling'den satın alındı.

3.2. Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler

Deneylerde kullanılan ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan cihazlar ve özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

Spektrofotometre : BioTek μ Quant, Plate okuyucu

Santrifüj	: Beckman Coulter Microfuge 22R
Santrifüj	: Nüve NF 400
İnkübatör	: Heraeus HeraCell 150
Sonikatör	: Bandelin sonopuls UV 2070
Buzdolapları	: İndesit (+4, -20 °C)
Çalkalayıcı	: Biometra WT17
pH Metre	: Hanna Instruments
Su Banyosu	: Raypa
Hassas Terazı	: Precisa WB220A
Kaba Terazı	: Kern 440-43A
Güç Kaynağı	: Power Pack 300, Bio-Rad
İnverted mikroskop	: Olympus CKX 41
Kültür Kabini	: Esco Class II BSC
-80 °C Soğutucu	: Hettich HS 2486
Karıştırıcı	: LabLine Thermal Rocker
Karıştırıcı	: Biometra WT17
Manyetik Karıştırıcı	: Heidolph MR Hei-Standart

Plastik ve cam malzemeler Akdeniz Üniversitesi Sterilisasyon Merkezinde steril edildi.

Deneyde kullanılan 250-350 g ağırlığındaki erkek wistar ratlar Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edildi. Vasküler düz kas hücrelerinin izolasyon işlemleri, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminde ve Biyokimya Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında yapıldı. Akdeniz Üniversitesi, Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alındı.

Primer hücre kültürü işlemleri, hücre proliferasyon ölçümleri, protein ölçümleri, immünositokimya ve western blot yöntemleri Akdeniz Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.3. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu (72)

3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar

Transfer Medyumu :

Solüsyon 0,2 mM olacak şekilde 2,94 mg CaCl₂ tartılıp 10 ml HBSS içinde çözüldü. Çözelti steril 0,22 µm'lik filtrelerden geçirildi ve 90 ml steril HBSS eklenip final hacim 100 ml'ye tamamlandı. Total hacimde % 2 oranında 2 ml penisilin-streptomisin (PS) antibiyotiği eklendi ve + 4 °C'de saklandı.

Enzim Ayırışma Solüsyonu (EAS) :

Final hacim 4 ml olacak şekilde steril HBSS solüsyonu içerisinde (Ca^{+2} - Mg^{+2} içermeyen) 0,2 mM Ca^{+2} (CaCl_2), 15 mM HEPES (pH:7,2-7,3), 0,0625 mg/ml elastaz, 0,25 mg/ml soya tripsin inhibitör (STİ), 0,5 mg/ml kollejenaz, 2,0 mg/ml bovine serum albumin (BSA) çözöldü. Bunun için aşğıdaki stok solüsyonlar hazırlandı.

➤ **CaCl_2 :** Solüsyon 0,2 mM olacak şekilde, 10 ml HBSS solüsyonu içerisinde 2,352 mg CaCl_2 çözöldü. Çözelti 0,22 μm 'lik steril filtreden geçirildi ve steril olarak +4 $^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Final hacim 4 ml olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 0,5 ml alınıp enzim ayırışma solüsyonuna eklendi.

➤ **HEPES:** Solüsyon 15 mM olacak şekilde, 10 ml HBSS içerisinde 143,1 mg hepes çözöldü. Çözelti 0,22 μm 'lik steril filtreden geçirildi ve steril olarak +4 $^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Final hacim 4 ml olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 1 ml alınıp enzim ayırışma solüsyonuna eklendi.

➤ **Elastaz:** Steril toz şeklinde bulunan 5 mg tip E pankreatik elastaz (90 U), 5 ml HBSS'de çözölür. Stok solüsyon, 10 adet 0,5 ml'lik steril plastik tüplere bölündü ve -20 $^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Her plastik tüp 2 kullanımlık olacak şekilde ayarlandı. Her tüpte 0,0625 mg/ml elastaz olacak şekilde, 250 μl stok solüsyon enzim ayırışma solüsyonu ile 4 ml'ye tamamlandı.

➤ **Soya Tripsin İnhibitör (STİ) :** Solüsyon 0,25 mg/ml olacak şekilde, 5 ml HBSS solüsyonu içerisinde 5 mg STİ Tip I-S tartılıp çözöldü. Çözelti 0,22 μm 'lik steril filtreden geçirildi ve +4 $^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Final hacim 4 ml olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 1 ml alınıp enzim ayırışma solüsyonuna eklendi.

➤ **Kollajenaz Tip I-A:** Steril toz şeklinde bulunan 100 mg kollajenaz (125 U), 12,5 ml HBSS'de çözöldü. Stok solüsyon 25 adet 0,5 ml'lik steril plastik tüplere bölündü ve -20 $^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Her tüp 2 kullanımlık olarak ayarlandı. Her tüpte 0,5 mg/ml kollejenaz olacak şekilde, 250 μl stok solüsyon, enzim ayırışma solüsyonu ile 4 ml'ye tamamlandı.

➤ **Bovine Albumin :** Solüsyon 2 mg/ml olacak şekilde, 5 ml HBSS solüsyonu içerisinde 80 mg albumin tartılıp çözöldü. Çözelti 0,22 μm 'lik steril filtreden geçirildi ve +4 $^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Final hacim 4 ml olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 0,5 ml alınıp enzim ayırışma solüsyonuna eklendi.

Bu stoklardan alınan hacimler, final hacim 4 ml olacak şekilde Tablo 3.1'deki gibidir.

Tablo 3.1. Enzim Ayırma Solüsyonu Bileşenleri ve Miktarları

STİ	HEPES	Ca ⁺²	BSA	ELASTAZ	KOLLAJENAZ	HBSS	TOPLAM
1 ml	1 ml	0,5 ml	0,5 ml	250 µl	250 µl	0,5 ml	4 ml

3.3.2. Metod

Hücrelerin İzolasyonu :

Ratlar, steril koşullar altında eter anestezisi uygulanarak torasik aorta ve abdominal aortanın üst kısmı disseke edildi. Aorta buz içinde transfer medyumu içeren steril bir petri içine alındı. Disseksiyon mikroskobu altında aortanın dış kısmındaki yağlar ve venöz yapılar (adventisya) temizlendi. Aorta boyuna kesilip aortun iç kısmı pamuklu bir çubuk ile hafifçe sıyrıldı. Bu sayede aortun lümenine bakan tek katlı epitel dokusu ortamdan uzaklaştırıldı. Adventisya ve endotel ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra aorta transfer medyumu ile yıkanıp içinde transfer medyumu bulunan 1,5 ml'lik plastik tüpe alındı. Plastik tüp buz içinde hücre kültürünün yapıldığı ortama taşındı.

3.4. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin Kültürü (72)

3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar:

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Dengeli Tuz Solüsyonu):

Kalsiyum ve magnezyum içermeyen HBSS solüsyonu 0,4 g/L potasyum klorid, 0,06 g/L potasyum fosfat, 8,0 g/L sodyum klorid, 0,04788 g/L sodyum fosfat, 1,0 g/L D-glukoz içermektedir.

Tripsin-EDTA:

Solüsyon % 0.05 (w/v) Tripsin ve 0.02% (w/v) EDTA içermektedir.

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu:

100 mL'lik penisilin-streptomisin solüsyonu 10,000 U penisilin, 10 mg streptomisin içermektedir.

Medyum (Besi Yeri) Hazırlanması:

Besi yeri olarak Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kullanıldı. Solüsyon 500 ml medyum içerisinde %10 v/v fetal bovine serum (FBS), %1 v/v penisilin-streptomisin, 0,584 g/L L-glutamin, 25 mM HEPES içerecek şekilde hazırlandı ve steril hale getirildi. Hücre beslemede kullanılan standart medyumlar 1,0 g/L glukoz içermektedir (5,5 mM). Yüksek glukoz ile yapılan deneylerinde ise medyumun glukoz içeriği 4,5 g /L'dir (25 mM).

3.4.2. Metod

Düz Kas Hücrelerinin Kültürü:

Plastik tüp içindeki temiz aorta steril kültür kabini içerisinde doku petrilere transfer edildi. Aorta iki adet steril bistüri yardımıyla toplu iğne başı büyüklüğünde küçük parçalara ayrıldı. Daha önceden hazırlanmış ve 37 °C sıcaklığa getirilmiş 4,0 ml EAS petriye eklendi ve 45 dakika hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. 45 dakika sonra 10 ml'lik plastik enjektöre çekilen doku süspansiyonu 5-6 kez 14 µm'lik çelik uçlu kanülden geçirilir. Petri kabına EAS'nin 2 katı (8 ml) medyum eklenip tamamı 200g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında dipteki pellet 3 ml medyum ile resüspanse edilip 12,5 cm² lik flaska ekildi. Flask 37 °C'de nemlendirilmiş %5 CO₂-% 95 atmosfer hava içeren inkübatörde inkübe edildi. İlk hücrelerin flaskta görünmesi için 3-5 gün beklendi. Bu zaman içerisinde hücrelerde herhangi bir enfeksiyonun olup olmadığı kontrol edildi. Mikroskop ile bakıldığında ilk hücrelerin tutunduğu görüldüğü gün veya en geç 4-5. günün sonunda, ortamdaki doku yıkıntıları ve hücre atıklarını ortamdaki uzaklaştırmak için, medyum 4 ml taze medyumla değiştirildi. Medyumlar 48-72 saat aralıklar ile rutin olarak değiştirildi.

Hücrelerin Pasajlanması (Tripsinizasyon):

Pasajlanacak olan hücrelerin bulunduğu kültür kabının medyumunu çekilip Hücreler 37 °C'ye getirilmiş 5 ml HBSS ile 1 kez yıkandı. HBSS aspire edilip yüzeyi kaplayacak kadar tripsin-EDTA ile 37 °C'lik etüvde 5 dakika inkübe edildi. Tripsinin etkilerini ortadan kaldırmak için flaska 4 ml medyum eklenip solüsyon santrifüj tüpüne alındı. 200g'de 5 dakika santrifüj edildi. Dipteki pelet 1 ml medyum ile süspanse edildi. Hücre sayımı yapıldı ve hücrelerin kullanım yerine göre hücreler belli sayıda pasajlandı.

Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığı Testi:

Hücre sayımı için hücre kabı içerisindeki hücreler tripsinize edildi ve santrifüj sonrası dipte oluşan pellet 1 ml medyum ile süspanse edildi. Süspansiyondan 10 µL alındı ve üzerine 40 µL medyum konularak süspansiyon 1/5 dilüe edildi. Dilüe süspansiyondan 10 µL Thoma lamına damlatılıp 5 farklı alan sayıldı ve her alandaki hücre sayıları toplandı. Toplam hücre sayısı 5'e bölündü ve 1 alandaki ortalama

hücre sayısı bulundu. Bir alandaki ortalama hücre sayısı dilüsyon faktörü olan 5 ile çarpıldı. Sonuç 10^4 ile çarpılıp 1 ml'deki hücre sayısı hesaplandı.

10 µl dilüe hücre süspansiyonu, 10 µl % 0,5'lik tripan blue ile süspanse edildi. Hücreler Thoma lamına alındı ve mikroskopta 20X'lik büyütmeyle incelendi. Membranı mavi boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak kabul edilip canlı ve ölü hücreler sayıldı.

3.5. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu

3.5.1. Hücrelerin İmmünohistokimya Preparatları Haline Getirilmesi

Deneyde kullanılan lamalar % 70' lik alkolden geçirildi. Distile su ile yıkandı, kurutuldu ve otoklavlandı. Steril lamalar üzerine steril ortamda hidrofobik kalemle 2 alan işaretlendi. 25 cm²'lik hücre flaskı tripsinize edildi ve santrifüj sonrası dipte kalan pellete 2 ml medyum eklenip resüspanse edildi. İşaretli alanlara bu süspansiyondan 100 µl ekildi. Lamlar büyük steril petrilere konuldu ve ağzı kapalı olacak şekilde etüvde inkübe edildi.

Preparatların bir gün sonra medyumunu değiştirildi ve hücre yoğunlukları kontrol edildi. Hücreler tamamen cama tutunduktan ve yüzeyi kapladıktan sonra hücre medyumunu çekildi ve Ca^{+2} - Mg^{+2} içermeyen HBSS ile yıkandı. Steril PBS ile tekrar yıkanan lamalar oda ısısında 3 gün kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar -20 °C'ye kaldırıldı. Preparat üzerinde tutunan hücre olup olmadığını anlamak için hematoxilen-eozin boyasıyla preparatların bir kısmı boyandı ve hücre dağılımlarına bakıldı.

İmmünohistokimyasal analizler için preparatlar 3 gruba ayrıldı.

1. Vasküler düz kas hücrelerini göstermek için düz kas hücrelerine spesifik α -aktin boyamaları yapıldı.
2. İzotip kontrolleri için sekonder antikor olarak kullanılan fare kaynaklı IgG_{2a}'nın boyamaları yapıldı.
3. Normal boyama kontrolü için PBS ile kontrol grubu çalışıldı.

3.5.2. Kullanılan Solüsyonlar

İmmünohistokimya için hazır kit, düz kas boyamaları için fare kökenli α -düz kas spesifik aktin antikor, antikor dilüsyonları için antibody dilüent, sekonder antikor olarak da fare kökenli horse radish peroksidaz enzimiyle işaretli IgG_{2a} antikor kullanıldı.

TBS Stok Solüsyon (Tris Buffer salin, 10 X konsantre):

TBS solüsyonu hazırlamak için 60,55 g Tris, 87,66 g NaCl 800 ml distile suda çözüldü. Solüsyonun pH'sı HCl ile 7,4'e ayarlanır. Final hacim 1000 ml olarak distile su ile tamamlandı.

TBS (1 X):

TBS stok solüsyondan (10X) 100 ml alınıp 1L'ye tamamlandı.

3.5.3. Metod

İmmünohistokimyasal analiz için aşağıdaki protokol takip edildi.

- Hazırlanan preparatlar aseton tanklarına konuldu ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Aseton tanklarından çıkarılıp 20 dakika oda ısısında kurutuldu.
- TBS ile oda ısısında 3 kez 5 dakika yıkandı.
- 5 dakika bloklama solüsyonuyla bloklandı.
- Primer antikor damlatılıp 45 dakika beklendi.
- 3 kez TBS ile 5 dakika yıkandı.
- Sekonder antikor eklenip 30 dakika beklendi.
- 3 kez TBS ile 5 dakika yıkandı.
- Sekonder antikora bağlanması için enzim (biyotin- HRP kompleksi) verildi ve 30 dakika inkübe edildi.
- Enzime Amino Etil Karbizol (AEC) substratı verilip 3-5 dakika inkübe edildi.
- Preparatlar TBS ile yıkandı, kurutuldu ve kayser jelatin ile kapatılıp karanlıkta buz dolabında saklandı.
- Preparatlar mikroskop altında incelenip fotoğraflandı.

3.6. VDKH Kültürlerinin Western Blot Analizi için Lizatlarının Hazırlanması**3.6.1. Kullanılan Solüsyonlar****Enzim Ayrışma Tamponu:**

Enzim ayrışma tamponu 25 mM Tris HCl, pH 7,4, %1 Triton X-100, %10 Gliserol, 10 mM sodyum pirofosfat, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM Fenilmetilsülfonil florid, 10 µg/ml Leupeptin içermektedir.

PBS (Fosfat Tamponlu Salin, 10X konsantre):

10X konsantre PBS için 2 g KCl, 80 g NaCl, 14,4 g Na_2HPO_4 , 2 g KH_2PO_4 tartılıp 1 L distile suya tamamlandı. pH'sı 7,4'e ayarlanır. Kullanım esnasında 1:10 oranında sulandırıldı.

3.6.2. Kullanılan Aktivatör ve İnhibitörler

Anjiyotensin II:

Toz halindeki 1 mg Ang II 9,5 ml distile suda çözüldü (1×10^{-4} M) ve 120 µl'lik alikuatlara bölünüp -20°C 'de saklandı. Kullanım esnasında 2 ml serum içermeyen medyuma 100 nM konsantrasyon için 20 µl eklendi.

Losartan:

Toz halindeki losartan 4,6201 mg tartılıp 10 ml PBS içinde çözüldü (10^{-3} M). 500 µl'lik alikuatlara bölünüp -20°C 'de saklandı. İnhibisyon ortamında 10^{-5} M olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

AG1478:

Toz halinde satın aldığımız inhibitörün 1600 µM'lık ara stoğu DMSO içinde hazırlandı. -20°C 'de saklandı. İnhibisyon ortamında 1 µM olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

PD09805:

Toz halindeki inhibitörün 9353,5 µM ara stoğu hazırlandı.

Resveratrol:

Toz halindeki resveratrol'den, direk ışığa maruz bırakmadan, 4,56 mg tartılıp 500 µL'de çözüldü (40.000 µM). 50 µL'lik alikuatlara bölünüp karanlıkta $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. 4 hafta içerisinde alikuatlar kullanıldı. ~ 1/1000 medyumla dilüe edilerek hücrelere uygulandı.

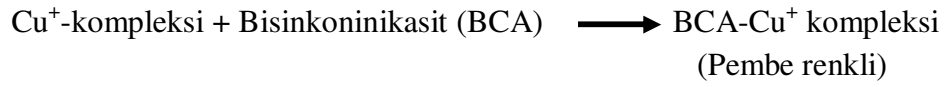
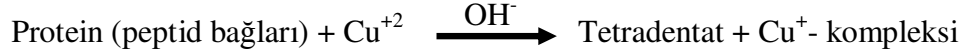
3.6.3. Metod

Düz kas hücreleri 60 mm ve 100 mm petrilere pasajlandı ve % 60-70 yoğunluğa gelinceye kadar rutin olarak beslendi. Normal glukoz inkübasyonları için normal glukozlu medyumla, yüksek glukoz inkübasyonları için yüksek glukozlu medyumla hücreler 48 saat inkübe edildi. Ardırdan hücreler gece boyu serum içermeyen medyuma bırakıldı. Petriler deney planına uygun inhibitör ve aktivatörler ile belirli zaman periyotlarında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonu bitirmek için buz üzerinde medyum hızlı şekilde aspire edildi. 1X PBS ile 2 kez yıkandı. Buz soğukluğunda proteaz inhibitör kokteyl ve fosfataz inhibitörü içeren lizis tamponununundan 200-400 µl eklendi. Hücreler kuyucuklardan kazıyıcısı yardımıyla kazındı ve plastik tüplere toplandı. Ultrasonik homojenizatör ile 9000 rpm'de 10 saniye sonike edildikten sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 12500 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. Temiz süpernatant kısmı western analizi için kullanıldı.

3.7. Protein Miktarının Tayin Edilmesi

3.7.1 Mikro BCA (Bisinkoninikasit) Deney Kitinin Prensibi

Proteinlerin peptid bağları OH^- iyonu varlığında Cu^{+2} iyonlarıyla reaksiyona girip Cu^+ -kompleksi oluşturur. Cu^+ -kompleksi bisinkoninikasit ile reaksiyona girerek pembe renkli BCA- Cu^+ kompleksi'ni oluşturur. Oluşan pembe renk 562 nm dalga boyunda spektrofotometre'de okunur.

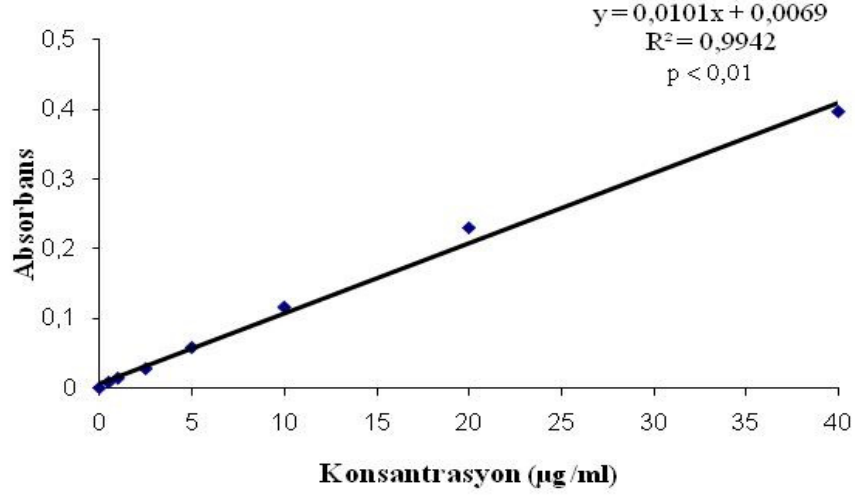


3.7.2. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafiğın Hazırlanması

Standart olarak kullanılan BSA (Bovine Serum Albumine) 0,2 mg/ml kitin içinde hazır verildi. Bu stoktan dilüsyonlar yapılarak standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar 200 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 'dir.

Protein ölçümü için kitin içinde hazır olarak verilen MA, MB, MC solüsyonları 25:24:1 (v/v) oranında karıştırılarak working reagent (WR) hazırlandı.

96- kuyucuklu petrilere 100 μl standart ve 100 μl WR pipetlenerek karıştırıldı ve 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat inkübe edildi. 2 saat inkübasyon sonrasında standartlar kendi körüne karşı 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede aynı anda okundu. Tüm protein standartları çift çalışıldı ve sonuçların ortalamaları alındı. Okunan absorbans değerlerine göre standart grafiğı çizildi (Şekil 3.1). Elde edilen doğru yardımıyla sonuçlar mililitredeki mikrogram protein miktarı olarak saptandı.



Şekil 3.1. Protein Standart Grafiği

3.7.3. Numunelerin Protein Miktar Tayini

Hücre kültürlerinden hazırlanan lizatlar protein tayini için kullanıldı. Hazırlanan her bir lizattan 5 µl alınıp 95 µl distile su ile tamamlanıp numune 1:20 oranında dilüe edildi 100 µl numune üzerine 100 µl WR pipetlendi ve 37 °C’de 96-kuyucuklu petrilerde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda numuneler çift kontrollü olarak spektrofotometrede 562 nm’de körüne karşı okundu. Elde edilen absorbans değerleri, standart grafiğin yardımı ile örneklerin mililitresindeki mikrogram protein miktarının tayininde kullanıldı. Sonuçlar hesaplanırken dilüsyon oranı olan 20 ile çarpıldı.

3.8. SDS-PAGE ve Western İmmünblot Analizi:

Rat aortik düz kas hücre kültürlerinde normo-glukoz (NG) ve yüksek-glukoz (YG; HG) şartlarında, Ang II uyarımı sonrasındaki pAkt, pERK ve pSTAT3 fosforilasyonları ve resveratrolün bu proteinler üzerindeki etkileri western blot tekniği uygulanarak belirlendi.

3.8.1. Elektroforez Jelinin Hazırlanması

Solüsyonların Hazırlanması:

Ayrışma jeli tamponu (Resolving Buffer) (1,5 M Tris pH 8,8):

Tris 9,085 g tartıldı ve 20 ml distile su içinde çözüldü, pH 1,5 M HCl ile 8,8’e ayarlandı ve final hacim 50 ml’ye tamamlandı. 0,2 g SDS tartılıp solüsyona eklenip çözüldü. Solüsyon +4 °C’de saklandı.

Yükleme jeli tamponu (Stacking Buffer) (0,5 M Tris, pH 6,8):

Tris 6,05 g ve 40 ml distile su içinde çözüldü, pH 1 N HCl ile 8,8'e ayarlandı. 0,4 g SDS tartılıp bu solüsyonda çözüldü. Solüsyon +4 °C'de saklandığında 1 ay stabildir.

Akrilamid – Bisakrilamid Solüsyonu:

Akrilamid 30 g ve bisakrilamid 0,8 g tartıldı, 100 ml distile su içinde çözüldü.

Amonyum persülfat (%10; APS):

Amonyum persülfat 50 mg tartıldı ve 0,5 ml distile su içinde çözüldü.

TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamin):

Amonyum persülfattan serbest radikaller oluşmasını sağlayarak akrilamid ve bis akrilamidin polimerizasyonunu katalizleyen hazır solüsyon kullanıldı.

Jelin Hazırlanması ve Gerekli Kimyasalların Miktarı:

Bu çalışmada, ayrışma ve yükleme kısımlarından oluşan iki farklı akrilamid jel kullanıldı.

Ayrışma Jeli (%10 ve %12'lik):

Ayrışma Jeli Tablo 3.2'de gösterilen kimyasalların belirtilen şekilde karıştırılması ile elde edildi.

Tablo 3.2. Ayrışma jeli tamponu ve miktarları

	% 10	%12
Distile Su	3,125 ml	2,625
Resolving buffer (pH: 8,8)	1,875 ml	1,875
Akrilamid	2,5 ml	3,000
% 10 APS	0,025 ml	0,025
TEMED	0,005 ml	0,005

Yükleme Jeli (%5):

Tablo 3.3' te verilen miktarların karıştırılması ile elde edildi.

Tablo 3.3. Yükleme jeli tamponu ve miktarları

	% 5
Distile Su	1,525 ml
Stacking buffer (pH: 6,8)	0,625 ml
Akrilamid	0,325 ml
% 10 APS	0,0125 ml
TEMED	0,0025 ml

Jelin Dökülmesi İşlemi

- Jelin döküleceği camlar, üzerlerinde olabilecek partiküllerin jeli bozmaması ve proteinlerin düzgün bir şekilde yürümesini sağlamak için distile su ile yıkandı, % 70'lik alkolden geçirildi ve kurutuldu.
- Camlar hazırlanıp jel yükleme aygıtına yerleştirildi. Ayrışma jelinin ilk 3 solüsyonu karıştırılıp ve 5 dakika beklendi. APS ve TEMED eklendikten hemen sonra jel karıştırılıp camlar arasına üstten 1-1.5 cm kalacak şekilde döküldü.
- Jel oda ısısında yaklaşık 45 dakika sonra katılaştı. Üst jelin (yükleme jeli) ilk 3 solüsyonu karıştırıldı. Alt jelin üzerindeki distile su boşaltılarak kurutma kağıdı ile kurutuldu.
- İki cam arasına 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi. Üst jele, APS ve TEMED eklendi ve hızlı bir şekilde karıştırılarak iki cam arasına tarakların içinde hava kalmayacak şekilde döküldü.
- Üst jel oda ısısında tamamen donduktan (yaklaşık 20 dakika) sonra camlar kısıkaçların içerisinden çıkarıldı.
- Jelin içerisinde bulunduğu camlar üzerinde kutupların bulunduğu kısıkaçların içine yerleştirildi ve elektroforez tankına alındı üzerlerine 1X Elektroforez Çalışma Tamponu (ERT) tamponu doldurulup taraklar çıkartıldı.

3.8.2. Elektroforez İşlemi

Solüsyonların Hazırlanması:

Laemli Tamponu (Loading Dye, 5X konsantre):

Laemli tamponu için 10 ml gliserol, 10 ml % 10 SDS, 1,25 ml 1 M pH 6,8 Tris, 7,5 ml β -merkaptoetanol ve brom fenol blue karıştırılıp 50 ml distile suya tamamlandı. Numune ile 1:5 oranında dilüe edilir.

Çalışma Tamponu (Elektroforez Running Buffer, 5X Stok Solüsyon):

Tris 15 g, 72 g Glisin, 5 g SDS tartılır, 1000 ml distile su içinde çözüldü. Elektroforez aşamasında bu stok solüsyon 1:5 oranında dilüe edilir.

Elektroforeze Konacak Örneklerin Hazırlanması:

- Protein miktarları tayin edilmiş lizatlar -20 °C'den alınarak buz içeren bir kaba konuldu.
- Jel kuyusuna yüklenecek olan 25 μ l içerisinde 15-45 μ g protein olacak şekilde her numuneden çekilip lizis tamponu ile ayrı bir tüpün içerisinde 60 μ l'ye tamamlandı. Üzerine 15 μ l 5X laemli sample buffer pipetlenip vortekslendi.
- Hazırlanan örnekler 5 dakika ısıtıcı bloklarda kaynatıldı. Elektroforeze yüklenmeden önce oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

Elektroforez İşlemleri:

- Elektroforez jelinin ilk kuyucuğuna protein markırı, devamına örnekler yüklendi.
- Elektroforez 80 V, 65 mA'de SDS-PAGE'de yürütüldü.
- Yükleme boyası jelden çıktığında elektroforez sona erdirildi. Yükleme jeli kesilerek atıldı.
- Proteinleri içeren ayırma jeli blotlama tamponuna konuldu. Bu aşamadan sonra jel, proteinlerin membrana transferi için hazır hale geldi.

3.8.3. Elektroforez Jelinin Membrana Aktarılması

Solüsyonların Hazırlanması:

Blotlama Tamponu (Blotting Buffer 1 L, 10X stok solüsyon):

Tris 12,11 g, 30 g glisin, 1 g Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA) tartıldı ve 1 L distile suda çözüldü. Kullanım esnasında 10X tampon 1X haline dönüştürülürken % 10 metanol eklendi.

Metanol:

Transfer sırasında membranın şişmesi ve yapışan proteinlerin korunabilmesi için gereklidir.

İşlemler:

- Nitroselüloz membran, blotlama kağıtları ve süngerler buz soğukluğundaki blotting tamponu ile ıslatıldı ve 10 dakika tamponda bekletildi.
- Sandviç aparatının arasına gelecek şekilde en alta (–) kutup olmak şartıyla, transfer tamponu ile doyurulmuş sünger konuldu.
- Süngerin üzerine blotlama kağıdı onun üzerine jel yerleştirildi.
- Jelin üzerin hava kabarcığı kalmayacak şekilde nitroselüloz membranla kapatıldı.
- Üzerine blotlama kağıdı onun üzerine sünger konularak sandviç tamamlandı.
- Hazırlanan sandviğin anot kutbu anota, katot kutbu katota bakacak şekilde, elektroforez tankına yerleştirildi. Tank blotlama tamponu ile dolduruldu.
- Tüm numuneler 1 saat 15 dakika +4 °C’ de 250 mA’ de blotlandı.

3.8.4. Membranların Antikor ile İşaretlenmesi

Solüsyonların Hazırlanması:

TBS Stok Solüsyon (Tris Buffer Salin, 10X konsantre):

TBS solüsyonu hazırlamak için 60,55 g Tris, 87,66 g NaCl 800 ml distile suda çözünür. pH, HCl ile 7,4’e ayarlanır. Final hacim 1000 ml olarak distile su ile tamamlandı.

TBS (1X):

TBS stok solüsyondan (10X) 100 ml alınıp 1 L'ye tamamlandı.

TBST (1X):

TBS stok solüsyondan (10X) 100 ml alınıp 1 L'ye tamamlandı. Bu solüsyona 1 ml Tween-20 eklendi ve iyice karıştırıldı.

% 5' lik Süt Tozu Çözeltisi (Bloklaama Çözeltisi):

%5'lik bloklaama çözeltisi için 0,5 g yağsız süt tozu tartılarak 10 ml TBS içerisinde çözüldü. Solüsyon 10 dakika magnetik karıştırıcıda karıştırılarak tam çözünmesi sağlandı.

Fosfo-p42/p44 MAPK Primer Antikoru:

Primer antikor -20 °C'de saklandı. Kullanım esnasında 1:5000 dilüsyon kullanıldı. 10 ml TBST içinde 0,5 g yağsız süt tozu çözüldü ve 2 µl primer antikor eklendi.

Fosfo-Akt Primer Antikoru:

Antikoru ana stoğu -20 °C'de saklandı. Çalışma solüsyonlarında 1:1000 dilüsyon kullanıldı ve antikor %5 BSA içeren 1X TBST'de dilüe edildi.

Fosfo-STAT3 Primer Antikoru:

Antikoru ana stoğu -20 °C'de saklandı. Çalışma solüsyonlarında 1:1000 dilüsyon kullanıldı ve antikor %5 BSA içeren 1X TBST'de dilüe edildi.

HRP (Horse -Radish Proksidaz) konjuge anti-mouse Ig G:

Enzim işaretli, fare kökenli sekonder antikor -20 °C'de saklandı. 1:2000 oranında dilüe edilerek kullanıldı. MAPK için bloklaama solüsyonunda, Akt ve STAT3 için direkt TBST içerisinde çözümlenerek kullanıldı.

ECL (Enhanced Chemiluminescence):

ECL-1 ve ECL-2 olmak üzere kit içinde bulunan kromojenik solüsyon 1:1 oranında karıştırıldı. Kit +4 °C'de saklandı ve kullanım esnasında oda sıcaklığına getirildi.

İşlemler:

- ✓ Membran TBST ile yıkandı ve membranın yüzeyini örtecek şekilde bloklama çözeltisi ilave edilerek 1 saat oda ısısında hafifçe çalkalandı.
- ✓ TBST ile 10 dakika 3 kez yıkandı.
- ✓ Primer antikor ile membran tüm gece +4 °C'de inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyon bitiminde membran 3 kez 5 dakika TBST ile yıkandı.
- ✓ Membran sekonder antikorun belirtilen çalışma dilüsyonlarında oda ısısında 2 saat çalkalanarak inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyonun ardından membran 6 kez 5 dakika yıkandı.
- ✓ Membranların fazla suyu alınarak hızlı bir şekilde temiz ve düzgün bir yüzeye yerleştirildi. Üzerine 1:1 oranında karıştırılan ECL-1 ve ECL-2 tüm yüzeyi kaplayacak şekilde yayıldı ve 5 dakika inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyonun bitiminde membranlar kasete yerleştirilip oluşan sinyaller filme alındı.

3.8.5. Membrandaki Sinyallerin Filme Aktarılması**Kullanılan Solüsyonlar:****Developer:**

Developer 1:10 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

Fiksatif:

Fiksatif 1:10 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

İşlemler:

- ✓ Kaset içerisindeki membranların üzerine karanlık odada film konuldu ve 10 dakika beklendi.
- ✓ Sürenin sonunda kaset açıldı ve film membranın üzerinden alınıp karanlıkta developer içine konuldu. Filmin üzerinde sinyaller görününceye kadar hafifçe sallandı.
- ✓ Daha sonra film developerdan alınıp fiksatife konuldu.

- ✓ Fiksatiften çıkan film distile suyla yıkandı ve kuruması için temiz bir yere asıldı. Filmler protein standartlarına göre değerlendirildi.

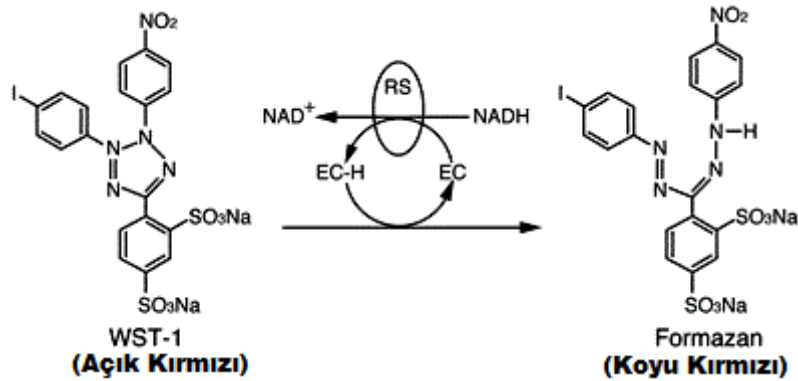
3.8.6. Sinyallerin Grafik Haline Dönüştürülmesi ve Değerlendirilmesi

Filme aktarılan sinyaller, bilgisayar ortamında Windows 7 işletim sisteminde çalışan Scion Image (Beta 4.0.3 versiyonu) programı ile taranıp Microsoft Office Excel (2007) programı ile sütun grafiği grafik haline dönüştürüldü. Kontrolün band yoğunluğu 100 birim kabul edildi ve her gruptaki diğer bandlar 100 birim üzerinden değerlendirildi. Birbirinden bağımsız yapılan en az 3 deneyin sonuçları grafik haline getirildi ve sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak gösterildi.

3.9. VDKH'lerinde Hücre Proliferasyonları Ölçümleri

3.9.1 WST-1 Deneyinin Prensibi

VDKH'lerinde uygulanan inhibitör ve aktivatörlere cevap olarak değişen hücre proliferasyonlarının saptanması için WST-1 ölçümleri yapıldı. Deneyin prensibi, bir tetrazolyum tuzu olan WST-1'in [2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4 disülfenil)-2H tetrazolyum], elektron taşıyıcı reaktif içerisinde mitokondriyal süksinat tetrazolium redüktaz sistem varlığında koyu kırmızı renkli formazana indirgenmesi esasına dayanır (Şekil 3.2). Canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri üzerine kurulu bir sistem olduğu için formazandan dolayı oluşan koyu kırmızı renk, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Oluşan kırmızı rengin yoğunluğu 440 nm'de (referans dalga boyu 600 nm) spektrofotometrede ölçülür. Nonradyoaktif olan WST-1 deneyi, hücre proliferasyonu ve sitotoksitesi deneylerinde canlı hücrelerin sayısının tayin edilmesine izin veren hassas kolorimetrik bir ölçüm yöntemidir.



Şekil 3.2.WST-1'in prensibi: WST-1, EC (elektron taşıma reaktifi) ve RS (mitokondriyal süksinat tetrazolium redüktaz sistem) bulunduğu ortamda koyu kırmızı renkli formazan oluşturur. Oluşan renk 440 nm'de spektrofotometrede okunur.

3.9.2. WST-1'in Deney Prosedürü

- ✓ Hücreler Tripsin-EDTA ile flasktan kaldırılıp 200g'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edilir.
- ✓ %10 FBS içeren medyum ile süspanse edilen hücreler, 200 µl medyum içerisinde 5.000 hücre/kuyu olacak şekilde 96-kuyucuklu steril hücre kaplarına ekilir. 96-well içerisinde hücrelerin bir kısmı normal glukozlu (NG) medyum ile ekilirken bir kısmı yüksek glukozlu (YG) medyumla ekilir ve 48 saatlik yüksek glukozun ön-inkübasyonuna bırakılmış olur.
- ✓ Ardından hücreler serumdan yoksun NG ve YG'lu medyumla (%0,01 FBS içeren) yıkanıp 100 ml NG ve YG'lu serum içermeyen medyum (SFM) içinde istenilen süre ve dozlarda (24 ve 48 saat; 50 ve 100 µM) resveratrol inkübasyonuna bırakılır.
- ✓ Resveratrol inkübasyonunun ardından hücreler 100 ml serum içermeyen medyum içerisinde 24 saat Ang II inkübasyonuna bırakılır. Ang II uyarımı boyunca resveratrol ortamda tutulur.
- ✓ Spesifik yolak inhibitörlerinin bulunduğu ortamda Ang II uyarımı araştırılacaksa bu inhibitörler Ang II uyarımından 30 dakika önce ortama eklenerek işlem yapılır ve Ang II uyarımı boyunca istenilen konsantrasyonlarda ortamda bulundurulur.
- ✓ 24 saatlik Ang II inkübasyonunun bitmesinin ardından tüm inkübasyonlar tamamlanır ve hücre medyumları 100 mL taze SFM ile değiştirilir. Üzerlerine 10 µL WST-1 pipetlenerek %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren inkübatörde 37 °C'de 4 saat inkübe edilir.
- ✓ Canlı hücrelerde oluşan koyu kırmızı formazanın absorbens değerleri, mikropate okuyuculu spektrofotometrede hücre içermeyen körüne karşı okunur. Proliferasyon ölçümleri, her bir deneyde üçlü tekrar olmak üzere, birbirinden bağımsız zamanlardaki dört farklı deneyle tekrarlanır.

3.9.3. WST-1'in Deneyinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizi

Hücre proliferasyon ölçümlerinde, her bir 96-kuyucuklu petri içindeki gruplar, en az 3'er tekrarlı çalışılıp kendi içlerinde ortalamaları alındı ve bir deney seti olarak kabul edildi. Kontrol grubunun absorbansı 100 birim kabul edildi ve diğer gruplardaki proliferasyonlar % üzerinden değerlendirildi. Birbirinden bağımsız zamanlarda yapılan en az 4 deney tekrarının sonuçları Microsoft Office Excel 2007 yardımıyla grafik haline dönüştürüldü.

Hücre Proliferasyon ölçümü sonuçları ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak gösterildi. İstatistiksel analizlerde SPSS 18 programı (Release 18.0.0) kullanıldı. Yapılan deneylerden elde edilen verilerin, gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarında nonparametrik testlerden olan Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. İki grup arasındaki istatistiksel kıyaslamalarda ise nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi uygulandı. Elde edilen istatistiklerden $p < 0.05$ ve altındaki değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

4.1. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu

Ratların torasik aortalarından elde edilip primer kültür ortamına aktarılan vasküler düz kas hücrelerinin saflıklarını ve doğru hücre grubu olduklarını gösterebilmek amacıyla immünohistokimyasal boyamaları yapıldı.

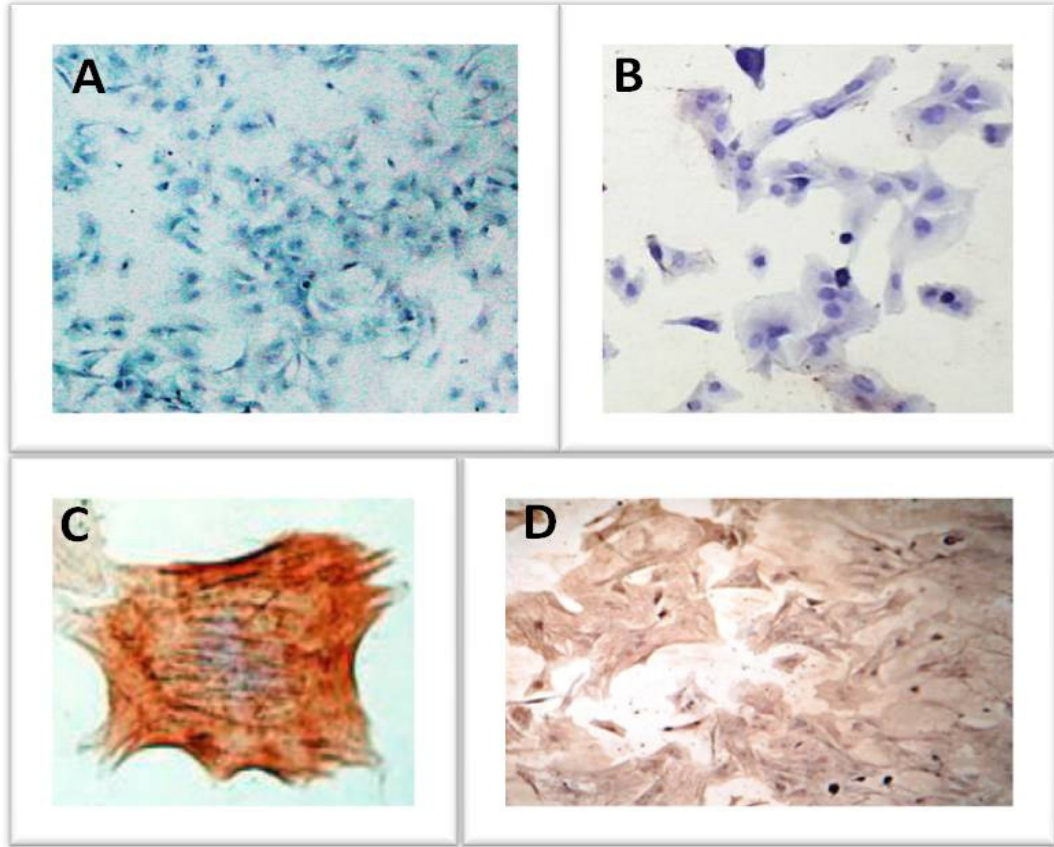
İzole edilen ve primer kültüre aktarılan vasküler düz kas hücrelerine 2-3. kuşakta immünohistokimya tekniği uygulandı. Kültüre edilmiş vasküler düz kas hücreleri lamalar üzerinde üretildi ve immünohistokimyasal karakterizasyon için uygun preparatlar haline getirildi.

İmmüno preparatları 3 gruba ayrılarak çalışıldı.

1. Kontrol Grubu: İmmünohistokimyasal analizlerde kontrol amacıyla kullanıldı. Kontrol grup boyamaları, aktinlerdeki boyanmalarının primer antikora spesifik olduğunu gösterdi (Şekil 4.1A).

2. İzotip Kontrolü: Boyanmaların sekonder antikordan bağımsız spesifik boyanmalar olduğunu gösterebilmek amacıyla kullanıldı (Şekil 4.1B).

3. α -Aktin Grubu: Vasküler düz kas hücrelerini gösterebilmek amacıyla düz kas hücrelerinin α -aktin'leri, VDK hücrelerine spesifik α -aktin primer antikoruyla boyandı. Preparattaki kırmızı boyalı alanlar α -aktin'e spesifik düz kas hücrelerini göstermektedir. Boyanmalar sonucunda tek bir hücredeki α -aktin fiberleri net olarak görülmektedir (Şekil 4.1C). Boyanmaları geniş alanda incelediğimizde hemen hemen tamamının α -aktin'le boyandıkları görülmektedir (Şekil 4.1D). Bu veriler izole edip ürettiğimiz hücrelerin yüksek saflıkta düz kas hücresi olduğunu göstermektedir.



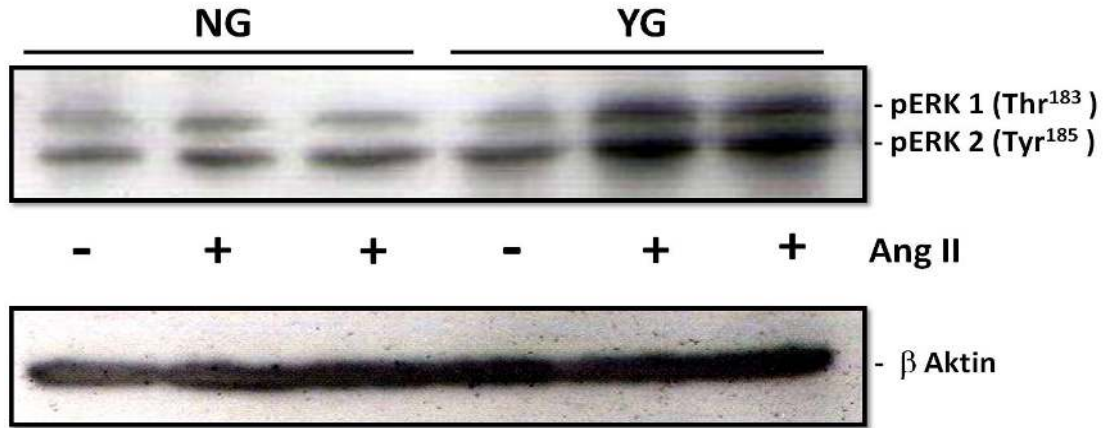
Şekil 4.1. Vasküler Düz Kas Hücre Kültürlerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu. A, kontrol grubu; B, izotip kontrolü; C ve D, vasküler düz kas hücrelerinin α -aktin boyamalarını göstermektedir. Boyalı alanlar kırmızı renkli görünmektedir.

4.2. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Normal Glukoz (NG) ve Yüksek Glukoz (YG) Altında Ang II Uyarımıyla Aktive olan Sinyal Yolakları

Kültürü yapılan vasküler düz kas hücrelerinin immünohistokimya ile vasküler düz kas hücresi oldukları tespit edildikten sonra western blot tekniği uygulanmadan önce hücre canlılığı testleri uygulandı. Üretilen hücrelerin % 99'nun canlı hücrelerden oluştuğu tespit edildikten sonra hücre cevaplarını standardize edebilmek açısından üretilen hücrelerin 3-15 arası pasajları deney aşamasına alındı. Yüksek Glukozun 48 saatlik uygulamalarında kıyaslayabilme açısından aynı kuşaktaki hücrelere eş zamanlı 48 saat normal glukoz uygulamaları yapıldı. 48 saat inkübasyon bitiminde hücreler tüm gece boyunca serum açlığına bırakıldı ve uygulamaların tamamı serumsuz medyunda gerçekleştirildi. VDKH'leri NG ve YG ortamında pERK1/2 (p42/p44 MAPK), pAkt ve pSTAT3 proteinlerinin Ang II uyarımına verdiği cevaplar western blot yöntemiyle gösterildi.

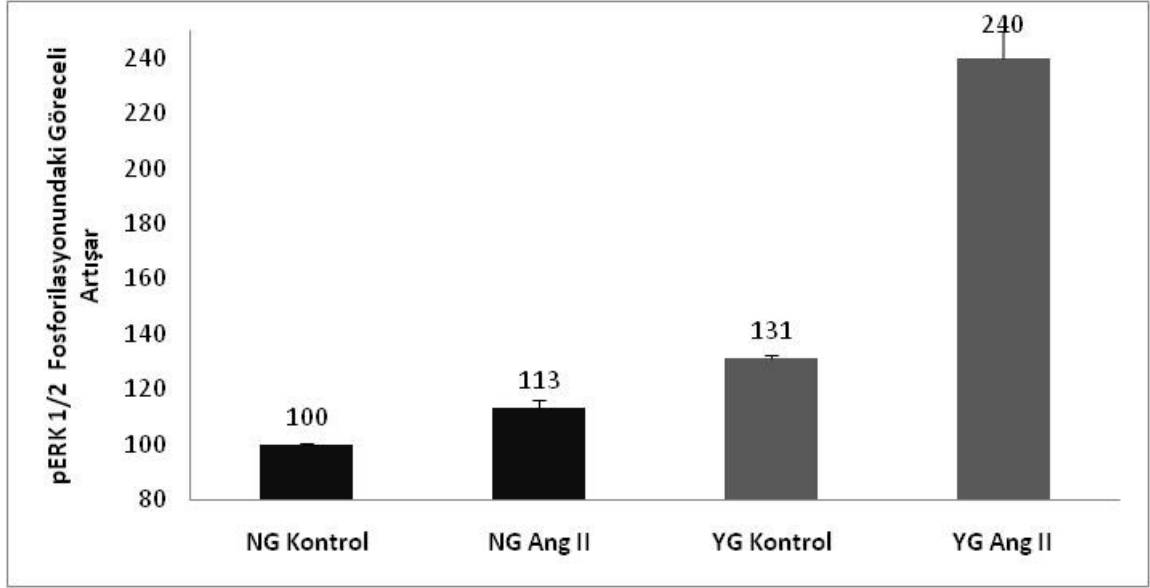
4.2.1. VDKH Kùltürlerinde NG ve YG'lu Ortamda Ang II'nin ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

VDKH'leri 48 saat NG veya YG'lu medyumla inkübe edilip serum starvasyonu yapıldıktan sonra 100 nM, 5 dakika Ang II ile uyarılıp ERK1/2 fosforilasyonları incelendi. Sonuçlarda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında Ang II uyarımının ERK1/2 fosforilasyonunu arttığı görüldü. Hem NG hemde YG'lu ortamda Ang II uyarımına cevaben ERK1/2 fosforilasyonu saptandı ve YG'lu ortamda bu artış daha belirgindi. Ang II uyarımı olmadan sadece yüksek glukozun kendisi de ERK1/2 fosforilasyonunda artışa neden oldu (Şekil 4.2). Bu sonuçlar tek başına yüksek glukozun ERK1/2 fosforilasyonuna neden olduğunu Ang II uyarımı altında bu artışın belirginleştğini göstermektedir.



Şekil 4.2. VDKH'lerinde NG ve YG ortamında Ang II'nin pERK1/2 üzerine etkisi. VDKH kùltürlerinde, NG ve YG şartlarında 100 nM, 5 dakika Ang II'nin etkileri incelendi. pERK1/2' nin YG ve Ang II varlığında arttığı saptandı. Bulgu yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir.

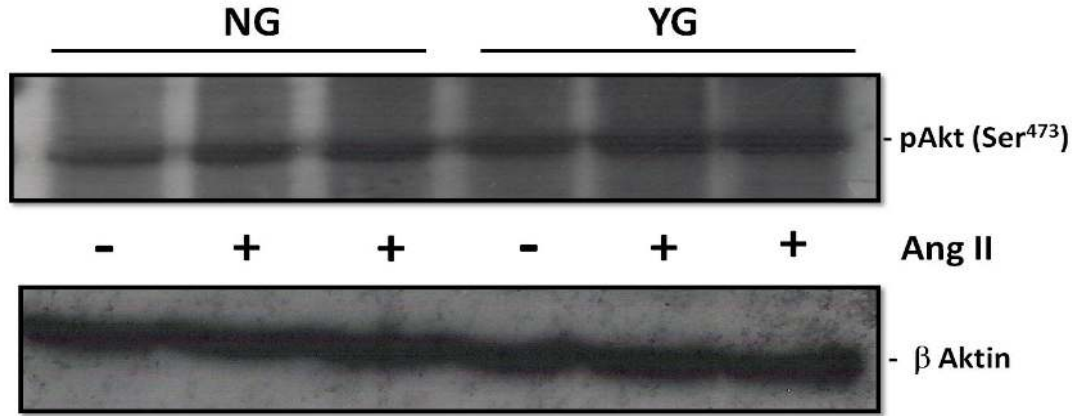
Elde ettiğimiz western blot sonuçları taranıp grafiğe aktarıldı. NG-Kontrol grubunun band yoğunluğu 100 birim kabul edildi ve diğer bandlardaki değişiklikler bu kontrolle karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart sapma ($\bar{X} \pm SD$) olarak gösterildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. VDKH'lerinde NG ve YG ortamında Ang II'nin pERK1/2 üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH'leri NG ve YG ortamda, 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarılıp ERK1/2 fosforilasyonları incelendi. Bulgularımızda Ang II ve YG'un ERK1/2 fosforilasyonunda artışa neden olduğunu görülmektedir. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=3).

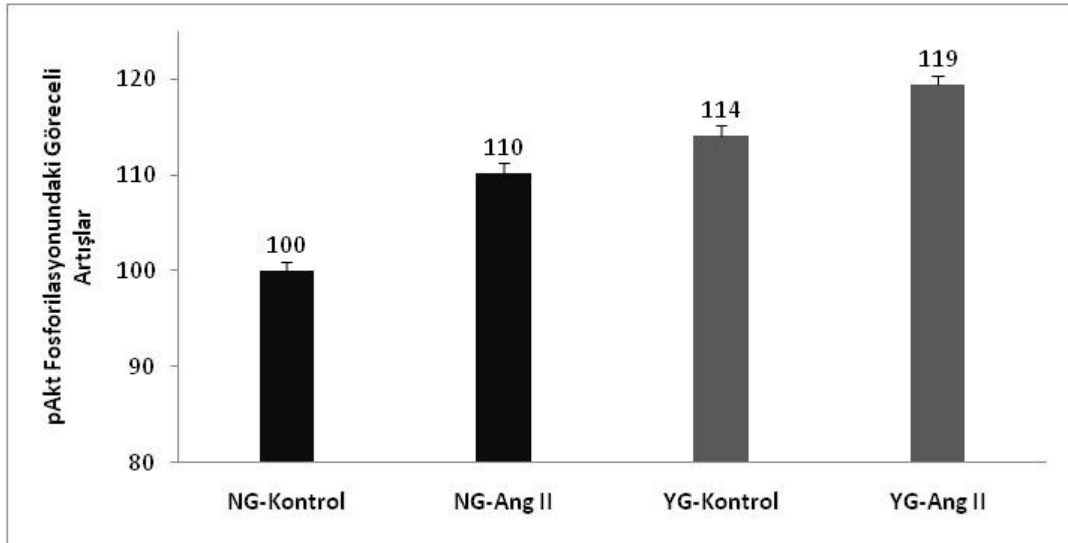
4.2.2. VDKH Kültürlerinde NG ve YG'lu Ortamda Ang II'nin Akt Fosforilasyonuna Etkileri

VDKH hücreleri %25 yoğunlukla kültür kaplarına ekildikten sonra %50-60 yoğunluğa gelinceye kadar rutin olarak beslendi. İstenilen yoğunluk sağlanınca hücreler eş zamanlı 48 saat normal glukoz veya yüksek glukozlu standard medyumla beslendi. Hücreler 48. saatin bitiminde, tüm gece boyunca, NG veya YG'lu serumdan yoksun medyumla inkübe edildi. Ertesi gün 100 nM, 5 dakika Ang II ile uyarılıp hücre lizatları hazırlandı. Eşit protein konsantrasyonlarında western blot tekniğiyle Akt fosforilasyonları incelendi. Sonuçlarımızda Ang II ve yüksek glukozun Akt fosforilasyonunda artışa neden olduğunu görüldü. Ang II'nin kullandığımız süre ve konsantrasyonu literatür ile uyumlu ve Akt fosforilasyonundaki artışları görebilmek için yeterli düzeydeydi. Yüksek glukozla beslenmiş hücrelerdeki Ang II uyarımları (YG-Ang II), NG-Kontrol, NG-Ang II ve YG-Kontrolle kıyasla daha yüksekti (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. VDKH'lerinde NG ve YG ortamında Ang II'nin pAkt üzerine etkisi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında 100 nM, 5 dakika Ang II'nin Akt fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi. pAkt'yi YG ve Ang II'nin arttırdığı saptandı. Bulgu yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir.

Birbirinden bağımsız zamanlarda yapılan en az 3 tekrardan elde edilen veriler taranıp grafik ortamına aktarıldı ve sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak gösterildi (Şekil 4.5).

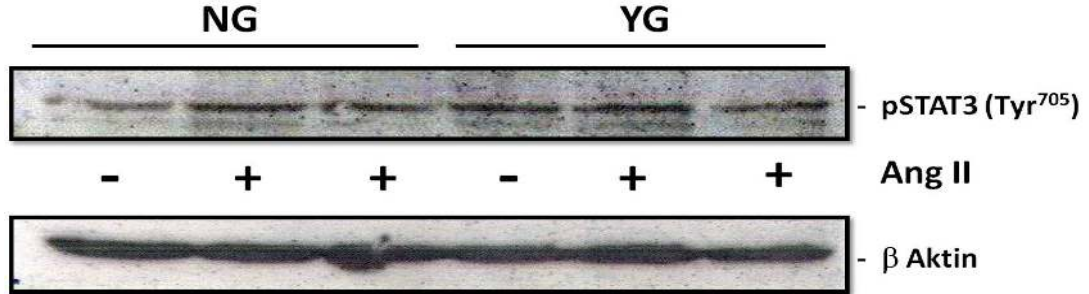


Şekil 4.5. VDKH'lerinde NG ve YG ortamda Ang II'nin pAkt üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH'leri NG ve YG ortamda, 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarılıp Akt fosforilasyonları incelendi. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=3). Bulgularımız Ang II ve YG'un Akt fosforilasyonunda artışa neden olduğunu göstermektedir.

4.2.3. Primer VDKH kültürlerinde NG ve YG'lu Ortamda Ang II Uyarımının STAT3 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

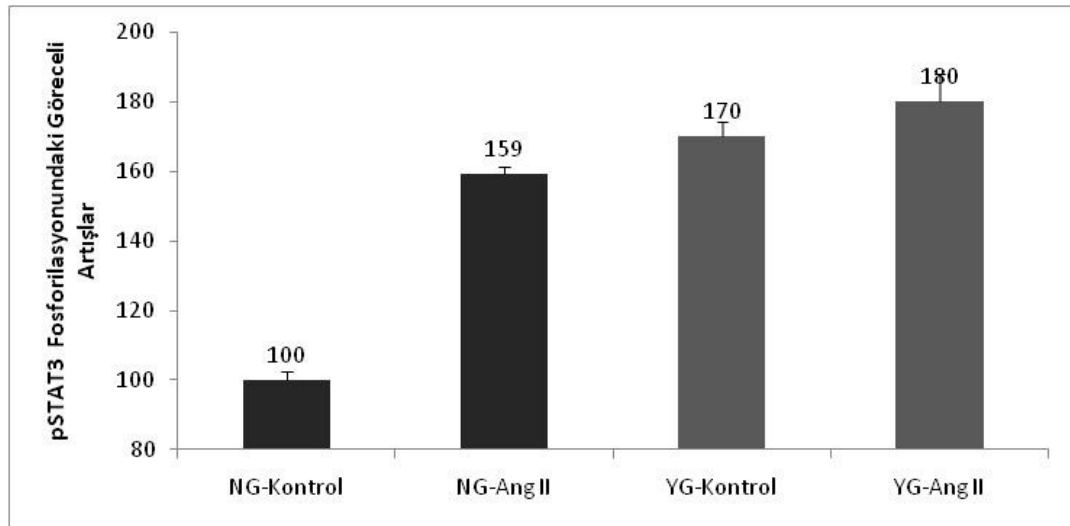
VDKH kültürlerinde NG veya YG ile 48 saat inkübe olan hücrelerde Ang II'nin etkilerini görebilmek için hücrelerin STAT3 fosforilasyonları western blot

yöntemiyle araştırıldı. Sonuçlarımızda yüksek glukoz ile 48 saat beslenen hücrelerin STAT3 fosforilasyonlarının normal glukoz ile beslenenlere kıyasla arttığı görüldü. Ang II uyarımı (100 nM, 5 dakika) hem NG hemde YG’da STAT3 fosforilasyonunu arttırdı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. VDKH’lerinde NG ve YG ortamında Ang II’nin pSTAT3 üzerine etkisi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında 100 nM, 5 dakika Ang II’nin STAT3 fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi. YG ve Ang II uyarımı altında STAT3 fosforilasyonunda artış gözlemlendi. Bulgu yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir.

VDKH kültürlerinde NG ve YG ortamda Ang II’nin STAT3 fosforilasyonuna etkilerini gösteren birbirinden bağımsız 3 western blot sonucu taranıp grafiğe aktarıldı. NG-Kontrol grubunun band yoğunluğu 100 birim kabul edildi ve diğer bandlardaki değişiklikler bu kontrolle karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak gösterildi (Şekil 4.7).



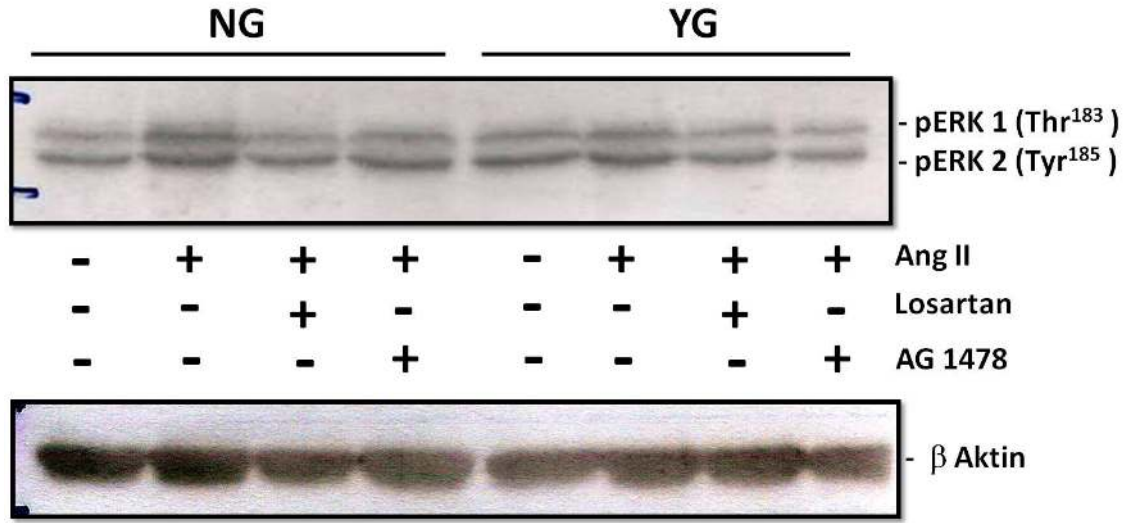
Şekil 4.7. VDKH’lerinde NG ve YG ortamda Ang II’nin pSTAT3 üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH’leri NG ve YG ortamda, 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarılıp STAT3 fosforilasyonları incelendi. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi ve yapılan en az 3 bağımsız deneyin sonuçları grafik haline getirildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=3). Bulgularımız Ang II ve YG’un STAT3 fosforilasyonunda artışa neden olduğunu göstermektedir.

4.3. VDKH Kùltürlerinde Normal Glukoz ve Yüksek Glukoz Altında Ang II Uyarımıyla Aktive olan Sinyal Yolaklarında AT1 ve EGFR Reseptörünün Etkileri

Vasküler düz kas hücreleri kùltüre edildikten sonra standart normal glukozlu medyumla beslendi. YG etkilerini incelemek için 100 mm hücre petrilere alınan hücreler %50-60 yoğunluğa gelince 48 saat YG'lu medyum inkübasyonuna bırakıldı. Bu hücreleri NG ile beslenen hücrelerle kıyaslayacağımız için, aynı kuşaktaki hücreler de 48 saat NG içeren medyumla beslendi. 48. Saatin bitiminde hücre petrilere tüm gece boyu NG veya YG'lu serum içermeyen medyumla serum starvasyonuna bırakıldı. Ertesi sabah hücrelere 30 dk AT1 reseptör antagonisti losartan (10 µM) ve EGFR reseptör inhibitörü AG1478 (1 µM) uygulandı ve ardından 100 nM Ang II ile 5 dakika hücreler uyarıldı. Hücrelerin lizatları hazırlandıktan sonra protein ölçümleri yapıldı ve western blot yöntemiyle ERK1/2, Akt ve STAT3 fosforilasyonları incelendi.

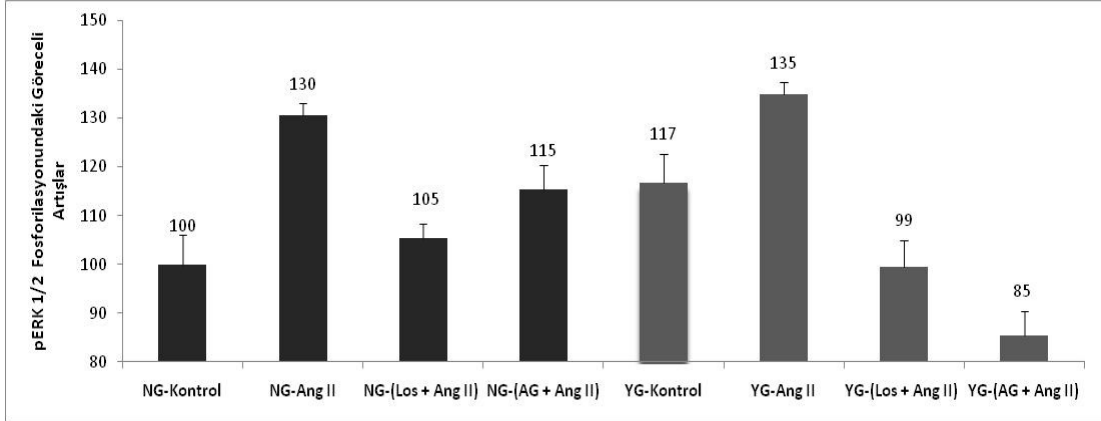
4.3.1. VDK Hücrelerinde NG ve YG'lu Ortamda Reseptör İnhibitörlerinin Ang II Uyarımlı ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda reseptör inhibitörlerinin Ang II uyarımına cevaben ERK1/2 fosforilasyonları incelendi. Sonuçlarımızda NG'lu ortamda AT1 reseptör antagonisti losartanın Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunu kontrol seviyesine baskıladığı görüldü. EGFR inhibitörü AG1478 ise Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunu düşürdü ancak bu düşüş NG-kontrol seviyesinden yüksekti. Bu veriler bize NG'lu ortamda Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunda, Ang II artışının temel reseptörünün AT1R olduğunu, EGFR transaktivasyonun ise var olduğunu ancak ikincil sırada kaldığını düşündürmektedir. YG şartlarında ise hem losartan hem de AG1478 Ang II uyarımı ortamda olmasına karşın ERK1/2 fosforilasyonunu kontrol seviyelerinin altına düşürmüştür. Bu bulgular YG şartlarında da NG şartlarındakine benzer şekilde Ang II uyarımının AT1R üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak YG'da AG1478 inhibitörü olan hücrelerdeki düşüşün losartan'dan daha fazla olması yüksek glukoz şartlarında EGFR reseptörünün ön plana çıktığını ve büyüme sinyallerinin bu reseptör üzerinden işlediğini düşündürmektedir. Ayrıca YG şartlarında AT1 reseptörünün EGFR transaktivasyonunu arttırdığı düşünülebilir (Şekil 4.8 ve 4.9).



Şekil 4.8. VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda reseptör inhibitörlerinin Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonu üzerine etkisi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında AT1R antagonisti losartan (10 μ M, 30 dakika) ve EGFR inhibitörü AG1478 (1 μ M, 30 dakika)'ın Ang II uyarımı altında (100 nM, 5 dakika) ERK1/2 fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi. Bulgu yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir.

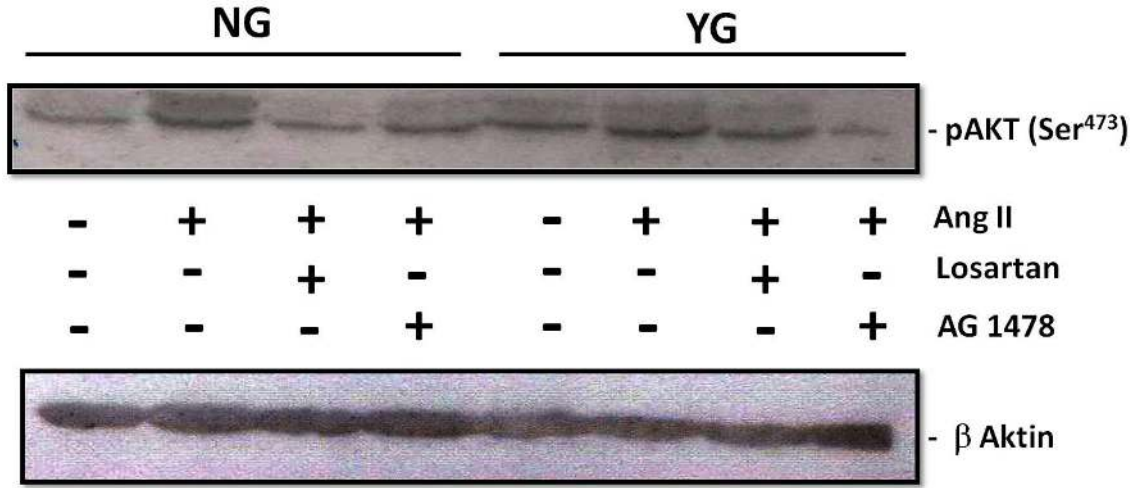
VDKH kültürlerinde Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonu üzerine reseptör inhibitörlerinin etkileri ile ilgili en az 3 bağımsız western blot bandı taranıp grafiğe aktarıldı. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi ve sonuçlar ortalama $\text{değer} \pm \text{standart sapma}$ olarak gösterildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda reseptör inhibitörlerinin Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında AT1R antagonisti losartan (10 μ M, 30 dakika) ve EGFR inhibitörü AG1478 (1 μ M, 30 dakika)'ın Ang II uyarımı altında (100 nM, 5 dakika) ERK1/2 fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm \text{SD}$ olarak gösterildi (n=3).

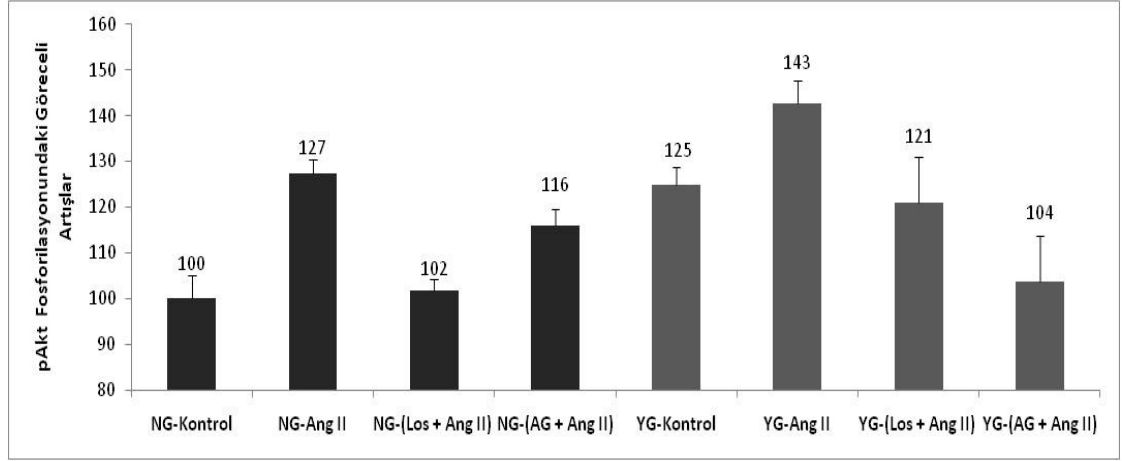
4.3.2. VDKH Hücrelerinde NG ve YG'lu Ortamda Ang II'nin Uyarımı Altında Reseptör İnhibitörlerinin Akt Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

VDKH kültürlerinin 48 saatlik NG ve YG inkübasyonları tamamlandıktan sonra AT1R antagonisti losartan ve EGFR inhibitörü AG1478'in Ang II uyarımlı Akt fosforilasyonu üzerine etkileri western blot yöntemiyle araştırıldı. Sonuçlarımızda NG'lu ortamda losartanın, Ang II uyarımlı Akt fosforilasyonunu kontrol seviyesine kadar baskıladığı görüldü. AG1478'in ise Ang II uyarımı sonucu artan Akt fosforilasyonunu azalttığı saptandı. YG'lu ortamda ise losartan Akt fosforilasyonunu YG-kontrolü seviyesine düşürdü. Bu düşüş YG'da oluşan Ang II uyarımının AT1R üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. YG'da Ang II uyarımı altında AG1478 uygulanan hücrelerdeki NG- kontrol seviyesine kadar olan düşüş, yüksek glukozdan kaynaklanan Akt fosforilasyonundaki artışın temelde büyüme faktör reseptörlerinden kaynaklandığını göstermektedir (Şekil 4.10 ve 4.11).



Şekil 4.10. VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda reseptör inhibitörlerinin Ang II uyarımlı Akt fosforilasyonu üzerine etkisi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında AT1R antagonisti losartan (10 µM, 30 dakika) ve EGFR inhibitörü AG1478 (1 µM, 30 dakika)'ın Ang II uyarımı altında (100 nM, 5 dakika) Akt fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi. Bulgu birbirinden bağımsız 3 deneyden bir tanesini göstermektedir.

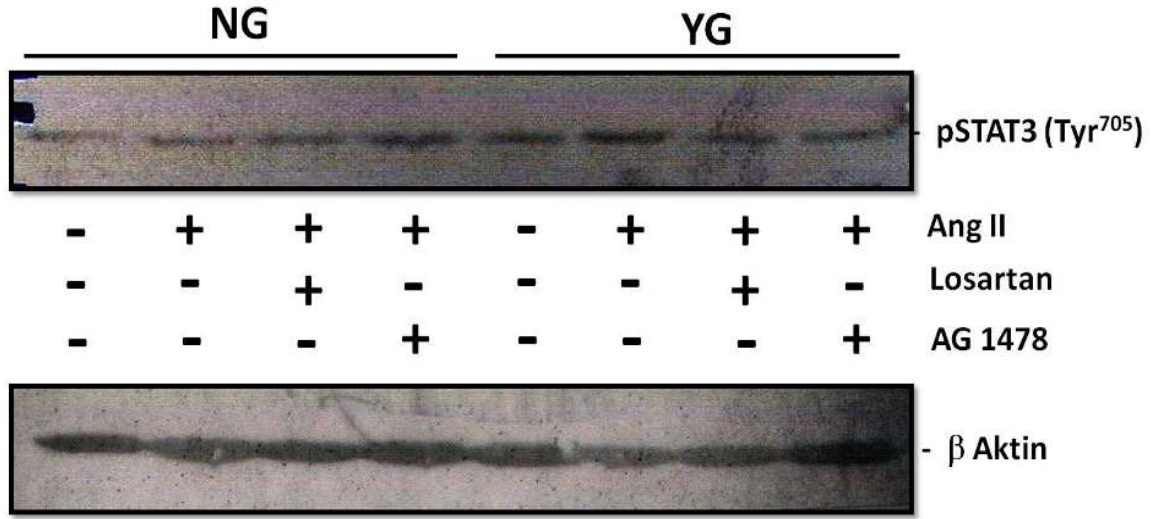
VDKH kültürlerinde Ang II uyarımlı Akt fosforilasyonu üzerine reseptör inhibitörlerinin etkilerini gösteren 3 bağımsız western blot sonucu taranıp grafiğe aktarıldı. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi ve sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak gösterildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda reseptör inhibitörlerinin Ang II uyarımlı Akt fosforilasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında AT1R antagonisti losartan (10 µM, 30 dakika) ve EGFR inhibitörü AG1478 (1 µM, 30 dakika)'in Ang II uyarımı altında (100 nM, 5 dakika) Akt fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=3).

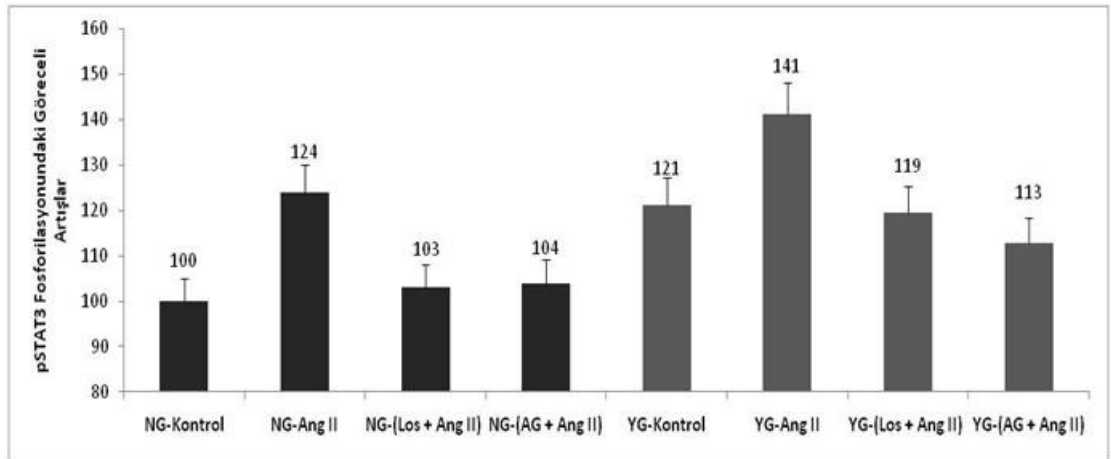
4.3.3. VDK Hücrelerinde NG ve YG Ortamında Ang II'nin Uyarımı Altında Reseptör İnhibitörlerinin STAT3 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

VDKH kültürlerine uygulanan NG ve HG inkübasyonlarının ardından AT1R antagonisti losartan ve EGFR inhibitörü AG1478'in Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonu üzerine etkileri western blot yöntemiyle araştırıldı. Elde ettiğimiz bulgularda NG'lu ortamda hem losartanın hemde AG1478 Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonunu kontrol seviyesine kadar düşürdüğü görüldü. Bu bulgu Ang II uyarımının AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştiğini gösterirken, STAT3 fosforilasyonunda AT1R kadar büyüme faktör reseptörlerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. YG'lu ortamda ise Ang II uyarımı altında hem losartan hem de AG1478 uygulanan hücrelerde STAT3 fosforilasyonları HG-Kontrol seviyesine kadar düşmüştür. Bu bulgular yüksek glukozla beslenen hücrelerde Ang II uyarımı altında her iki reseptöründe etkili olduğunu göstermektedir (Şekil 4.12 ve 4.13).



Şekil 4.12. VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda reseptör inhibitörlerinin Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonu üzerine etkisi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında AT1R antagonisti losartan (10 µM, 30 dakika) ve EGFR inhibitörü AG1478 (1 µM, 30 dakika)'ın Ang II uyarımı altında (100 nM, 5 dakika) STAT3 fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi. Bulgu birbirinden bağımsız 3 deneyden bir tanesini göstermektedir.)

Birbirinden bağımsız elde edilen ve VDKH kültürlerinde reseptör inhibitörlerinin STAT3 fosforilasyonuna etkilerini gösteren en az 3 deneyin sonuçları taranıp grafik haline getirildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda reseptör inhibitörlerinin Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında AT1R antagonisti losartan (10 µM, 30 dakika) ve EGFR inhibitörü AG1478'in (1 µM, 30 dakika) Ang II uyarımı altında (100 nM, 5 dakika) STAT3 fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=3).

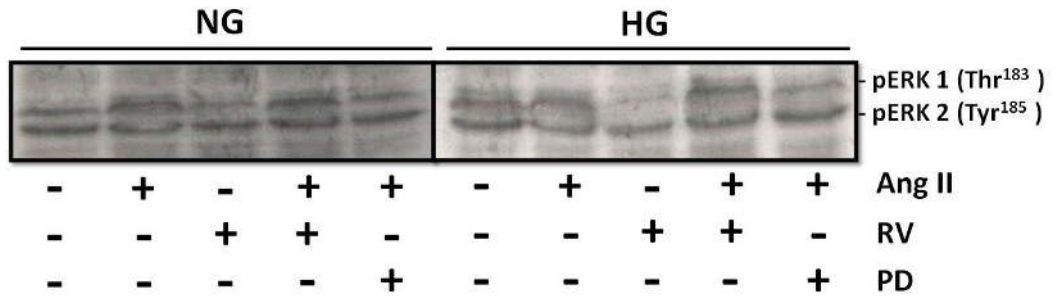
4.4. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Normal Glukoz ve Yüksek Glukoz Altında Ang II Uyarımıyla Aktive olan Sinyal Yolaklarına Resveratrolün Etkileri

Vasküler düz kas hücre kültürlerinde, normal ve yüksek glukoz altında, Ang II uyarımı sonucu aktiveleşen ERK1/2, Akt ve STAT3 fosforilasyonu üzerine resveratrolün etkileri western blot yöntemiyle incelendi. Standart olarak izole edilip üretilen VDK hücreleri 48 saat NG'lu ve eş zamanlı YG'lu medyumla beslenip, yüksek glukoz inkübasyonları uygulandı ve ardından bütün gece starvasyonuna bırakıldı. Serum içermeyen ortamda hücreler 30 dakika 50 µM resveratrole maruz bırakıldı ve ardından 100 nM konsantrasyonda ve 5 dakika süreyle Ang II ile uyarıldı. Tüm inkübasyonlar bittiğinde hücre lizatları hazırlandı ve protein konsantrasyonları ölçülüp western blot yöntemiyle ERK1/2, Akt ve STAT3 fosforilasyonları incelendi.

4.4.1. VDK Hücrelerinde NG ve YG'lu Ortamda, Ang II Uyarımı Altında, Resveratrolün ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

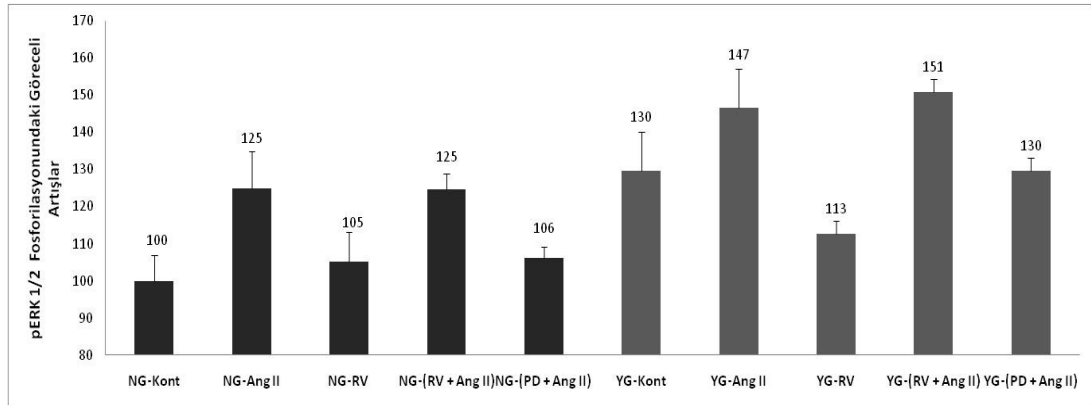
NG ve YG altında Ang II uyarımı ile aktiveleşen ERK1/2 fosforilasyonuna 50 µM ve 100 µM (sonuçları gösterilmemiştir) konsantrasyonda, 30 dakika süreyle uygulanan resveratrolün etkileri incelendi. Sonuçlarımızda, Ang II uyarımı sonucunda oluşan ERK1/2 fosforilasyonunu teyit edebilmek için spesifik ERK1/2 inhibitörü PD098059 (30 dakika, 1 µM) - Ang II uyarımından önce - ortama eklenmiş ve ERK1/2 fosforilasyonunun kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bulgularımız NG ve YG şartlarda, PD098059'un Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunu kontrol seviyesine baskıladığını göstermektedir (Şekil 4.14).

NG Şartlardaki verilerimizde; Ang II uyarımının ERK1/2 fosforilasyonuna neden olduğunu, resveratrol uygulamasıyla ERK1/2 fosforilasyonunda herhangi bir değişiklik olmadığı (sinyalin kontrol seviyesinde kaldığını) gözlemlendi. Ang II uyarımıyla birlikte ortamda RV bulunması durumunda ise; RV'nin Ang II uyarımla ERK1/2 fosforilasyonunu baskılamadığı saptandı. YG'lu şartlarda ise; resveratrol tek başına uygulandığında ERK1/2 fosforilasyonu NG-Kontrol seviyesine kadar düştü. Bu veri bize YG nedeniyle oluşan ERK1/2 fosforilasyonunu, resveratrolün baskılayabildiğini düşündürmektedir. Ortamda Ang II ve resveratrolün birlikte olduğu hücrelerde ise resveratrolün bu etkisi tamamen ortadan kalkmış gibi görünürken, hücreler Ang II uyarımına tam olarak cevap verebilmektedir (Şekil 4.15).



Şekil 4.14. VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda resveratrolün Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonu üzerine etkisi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında ERK1/2 inhibitörü PD'nin (1 μ M, 30 dakika) ve resveratrolün (50 μ M, 30 dakika) Ang II uyarımlı (100 nM, 5 dakika) ERK1/2 fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi. Bulgular birbirinden bağımsız 3 deneyden bir tanesini göstermektedir.

Birbirinden bağımsız elde edilen 3 deneyin sonuçları taranıp grafik haline getirildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda RV'nin Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında ERK1/2 inhibitörü PD'nin (1 μ M, 30 dakika) ve resveratrolün (50 μ M, 30 dakika) Ang II uyarımlı (100 nM, 5 dakika) ERK1/2 fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=3).

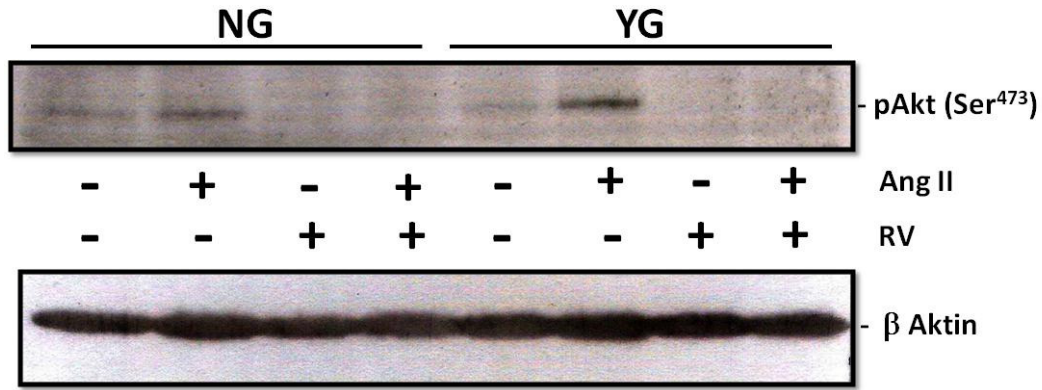
Bu bulgular bize NG ve YG'lu ortamda Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonuna resveratrolün bir inhibisyon etkisi olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte yüksek glukoz nedeniyle artan ERK1/2 fosforilasyonunda resveratrolün inhibitör etki oluşturduğu düşünülmektedir.

4.4.2. VDK Hücrelerinde NG ve YG Ortamda Ang II Uyarımı Altında Resveratrolün Akt Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

VDKH kültürlerinde Ang II uyarımı sonuca aktiveleşen Akt fosforilasyonuna resveratrolün etkileri NG ve YG ortamda araştırıldı. Bulgularımızda 100 nM, 5

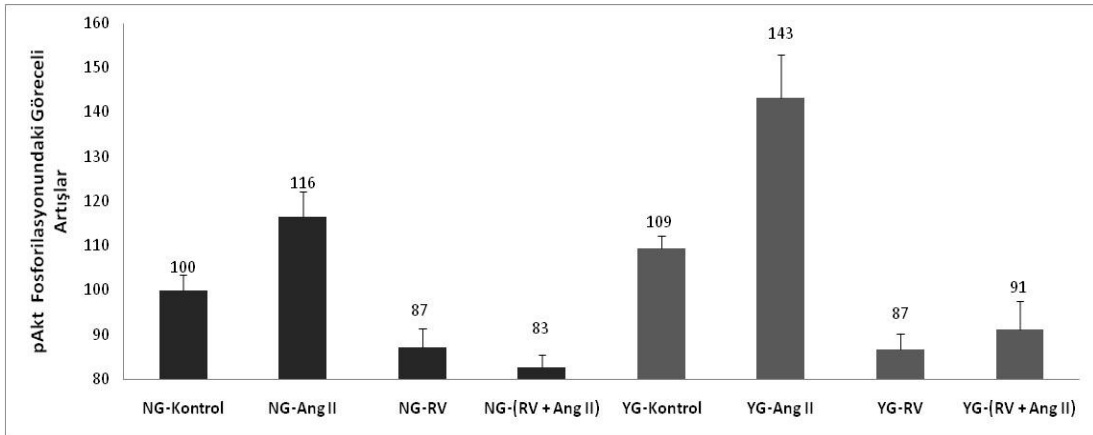
dakika Ang II uyarımının Akt yolunu aktifleştirdiği, YG'lu ortamda bu aktivasyonun daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.16).

Resveratrol (50 μ M, 30 dakika) uygulaması her iki ortamda da Akt fosforilasyonunu kontrol seviyesinin altına düşürdü. Ang II ve RV'nin birlikte uygulanması durumunda ise Akt fosforilasyonu, tek başına RV'de olduğu gibi, kontrol seviyesinin altındaydı. Sonuçlarımızda, NG ve YG'lu ortamda Ang II uyarımı sonucu aktifleşen Akt fosforilasyonunda resveratrolün tam bir inhibisyon etkisinin olduğu, Ang II uyarımı olmadan da resveratrolün Akt fosforilasyonu kontrol seviyesinin altına düşürdüğü gösterilmektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda Resveratrolün Ang II uyarımlı Akt fosforilasyonu üzerine etkisi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında resveratrolün (50 μ M, 30 dakika) Ang II uyarımlı (100 nM, 5 dakika) Akt fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi (bulgular birbirinden bağımsız 3 deneyden bir tanesini göstermektedir).

Farklı zamanlarda birbirinden bağımsız 3 deneyin sonuçları taranıp grafik haline getirildi ve bulgular ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak gösterildi (Şekil 4.17).

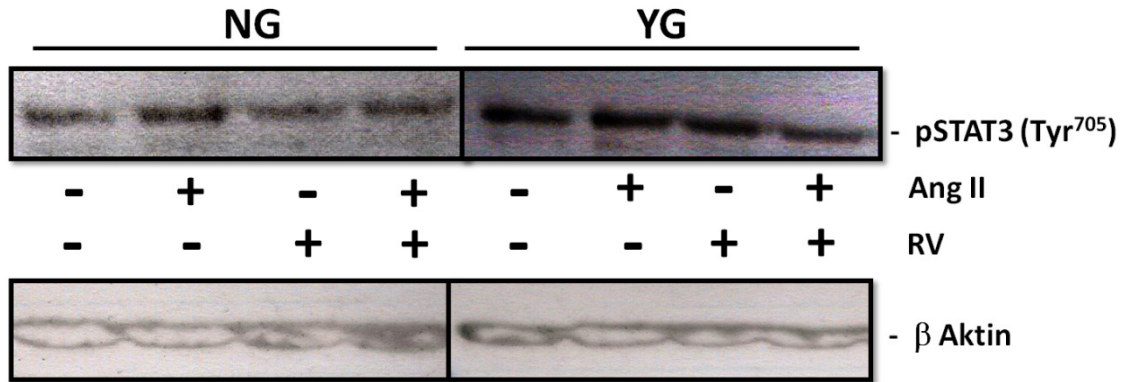


Şekil 4.17. VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda Resveratrolün Ang II uyarımlı Akt fosforilasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında resveratrolün (50 μ M, 30 dakika) Ang II uyarımlı (100 nM, 5 dakika) Akt fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=3)

4.4.3. VDK Hücrelerinde NG ve YG Ortamda Ang II Uyarımı Altında Resveratrolün STAT3 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

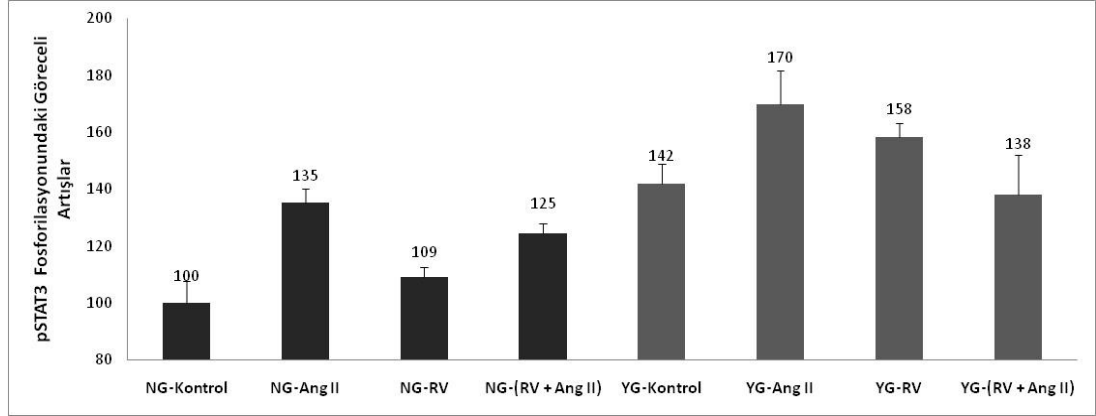
VDK primer hücre kültürlerinde NG ve YG ortamda Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonu üzerine resveratrolün etkileri western blot yöntemiyle incelendi. Ang II'nin 100 nM konsantrasyonu 5 dakika, resveratrolün ise 50 μ M konsantrasyonu, 30 dakika uygulandı. Her iki maddenin birlikte uygulandığı hücrelerde resveratrol Ang II'den önce uygulandı.

Bulgularımızda resveratrolün tek başına uygulandığı hücrelerde STAT3 fosforilasyonunun her iki ortamda da kontrol seviyesine yakın olduğu ve resveratrolün Ang II uyarımı olmadan inhibisyon etkisinin olmadığı gözlemlendi. NG ortamda; Ang II ile birlikte RV'nin olduğu hücrelerde, RV, Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonunu kısmı olarak düşürdü. YG'lu ortamda ise; RV, Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonunu kontrol seviyelerine kadar baskıladı (Şekil 4.18). Bu veriler bize YG'lu ortamda Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonu üzerine resveratrolün inhibitör etkisinin olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 4.18. VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda resveratrol'nin Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonu üzerine etkisi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında resveratrolün (50 μ M, 30 dakika) Ang II uyarımlı (100 nM, 5 dakika) STAT3 fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi (bulgular birbirinden bağımsız 3 deneyden bir tanesini göstermektedir).

Farklı zamanlarda birbirinden bağımsız 3 deneyin sonuçları taranıp grafik haline getirildi ve bulgular ortalama $\text{değer} \pm \text{standart sapma}$ olarak gösterildi (Şekil 4.19).



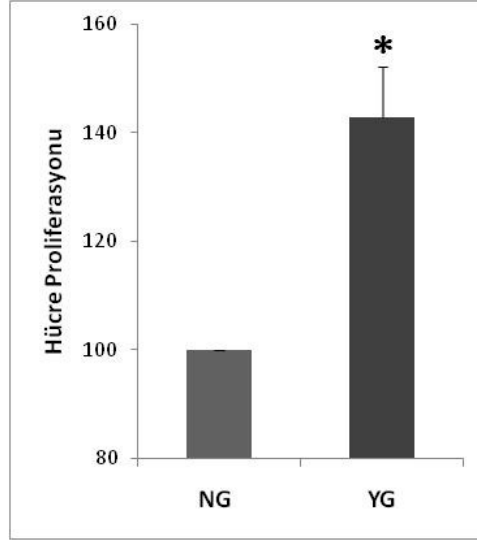
Şekil 4.19. VDKH'lerinde NG ve YG'lu ortamda resveratrol'nin Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde, NG ve YG şartlarında resveratrolün (50 μ M, 30 dakika) Ang II uyarımlı (100 nM, 5 dakika) STAT3 fosforilasyonu üzerine etkileri incelendi. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=3).

4.5. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Yüksek Glukozun Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri

VDKH kültürlerinde yüksek glukozun hücre proliferasyonu üzerine etkileri incelendi ve kontrol grubu olarak normal glukozla beslenen hücreler kullanıldı. Standart olarak izole edilip üretilen hücrelerde, glukozun etkilerini incelemek için, aynı flasktan alınan eşit sayıdaki (5.000 hücre/kuyu) hücrenin bir kısmı 96 kuyucuklu petrilere NG'lu medyumla bir kısımda YG medyumla ekildi. Hücrelerin tutunup çoğalması için 48 saat inkübasyon uygulandı. Sürenin bitiminde hücrelerin medyumları % 0,1 FBS içeren NG veya YG medyumla değiştirildi ve 48 saat daha inkübe edildi. Bu işlem 48 saat resveratrol ve 24 saatlik Ang II uygulaması için geçen sürenin toplamına eşit olarak uygulandı. Amacımız resveratrol ve Ang II uygulamaları süresince hücre proliferasyonundaki değişiklikleri de görebilmektir.

Tüm bu uygulamaların ardından hücre proliferasyonları WST-1 yöntemiyle ölçüldü. Elde edilen absorbans değerlerinden kontrol grubu 100 birim kabul edildi ve diğer gruplar 100 üzerinden değerlendirildi. Her bir deney seti kendi içerisinde en az 3 tekrardan oluştu ve birbirinden bağımsız en az 4 deney tekrarın sonuçları değerlendirildi.

Sonuçlarımızda yüksek glukozun, normal glukozlu kontrol grubuna kıyasla hücre proliferasyonunda % 40 gibi bir artışa neden olduğu saptandı. Hücre proliferasyonundaki bu artış istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p < 0.013$) (Şekil 4.20).

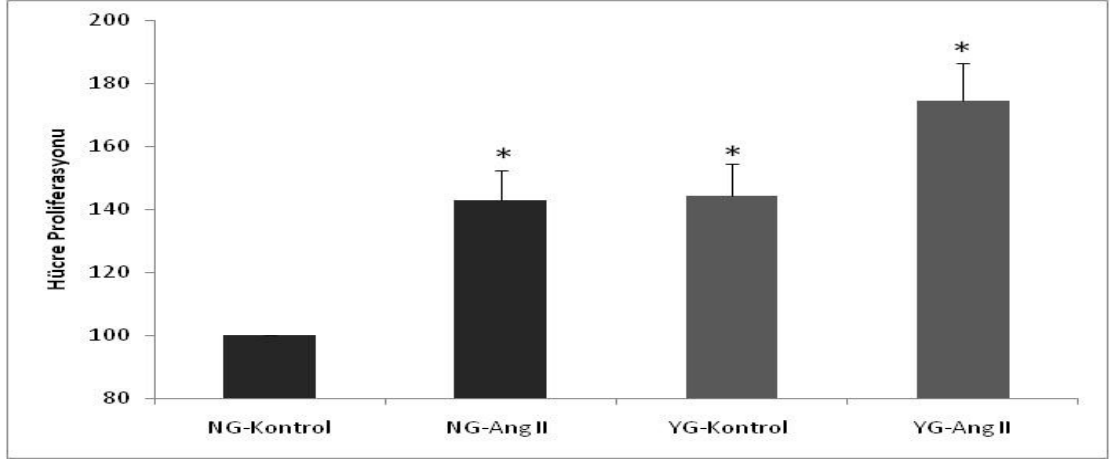


Şekil 4.20. VDKH'lerinde YG'un hücre proliferasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde hücre proliferasyonu üzerine NG (5,5 mM) ve YG (25 mM) etkileri incelendi. YG'lu ortamda hücre proliferasyonunda artış izlendi * $p < 0.013$. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=4).

4.6. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Normal Glukoz ve Yüksek Glukozun Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri

VDKH'lerindeki proliferasyonu takip edebilmek için, hücreleri 48 saat NG ve YG medyumla beslendikten sonra % 0.1 FBS içeren DMEM'le medyumları değiştirildi ve 24 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda hücrelere 100 nM, 24 saat Ang II uygulandı. Sonuçlar kendi kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı. Bulguların anlamlılık derecesi Kruskal-Wallis testine göre $p < 0.006$ 'dır.

Bulgularımızda NG ve YG ortamda Ang II uyarımının hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlemlendi ve bu artış kendi kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bulundu $p < 0.05$. YG uygulaması da, daha önceki verilerimizde gösterdiğimiz gibi, NG kıyasla hücre proliferasyonunda artışa neden oldu $p < 0.05$ (Şekil 4.21).

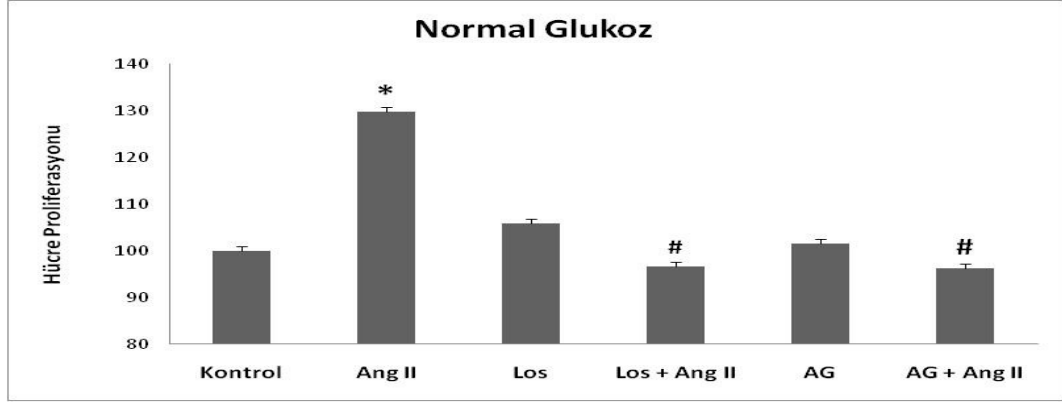


Şekil 4.21. VDKH'lerinde NG ve YG'un Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde NG (5.5 mM, 48 saat) ve YG (25 mM, 48 saat) ortamda Ang II'nin (100 nM, 24 saat) hücre proliferasyonu üzerine etkileri incelendi. Ang II'nin her iki ortamda da hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlemlendi * $p < 0.05$. NG-Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=4).

4.7. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Normal Glukoz ve Yüksek Glukozlu Ortamda Reseptör İnhibitörlerinin Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri

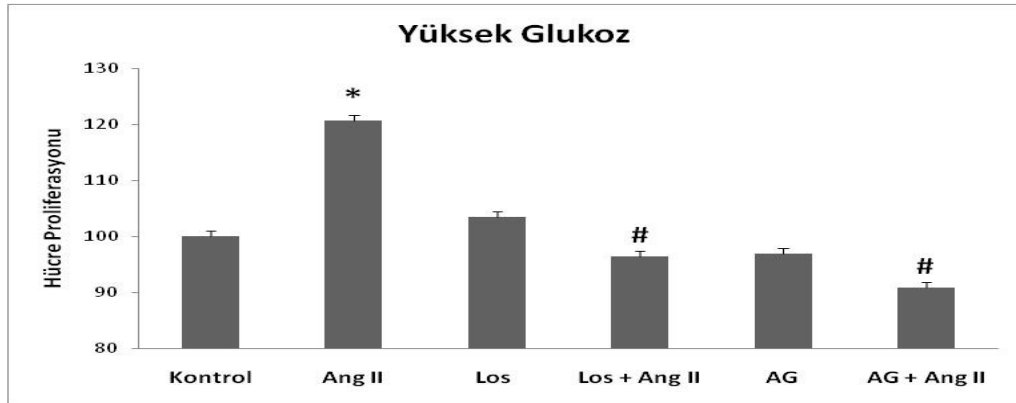
Normal glukoz ve yüksek glukozlu ortamda reseptör inhibitörlerinin Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine etkilerini ortaya koymak için VDKH'leri 48 saat NG ve YG'lu medyum uygulamasının ardından, % 0.1'lik FBS içeren medyumla beslendi. Ang II uygulaması yapılmadan 30 dakika önce hücrelere AT1R antagonisti losartan (10 μ M) ve EGFR blokörü AG1478 (1 μ M) eklendi. Sürenin sonunda Ang II ile (100 nM, 24 saat) hücreler uyarıldı ve hücre proliferasyonları incelendi.

NG'lu ortamda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, reseptör inhibitörleri losartan ve AG1478'in Ang II uyarımlı hücre proliferasyonunu kontrol seviyesine kadar baskıladığı gözlemlendi (Şekil 4.22) ($p < 0.05$). NG ortamdaki sonuçların Kruskal-Wallis testine göre anlamlılık derecesi $p < 0.04$ 'tür.



Şekil 4.22. VDKH'lerinde NG'lu ortamda reseptör inhibitörlerinin Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde NG (5.5 mM, 48 saat) ortamda reseptör inhibitörlerinin Ang II (100 nM, 24 saat) uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine etkileri incelendi. Ang II uyarımından 30 dakika önce ortama, AT1R antagonisti losartan (Los) (10 µM) ve EGFR blokörü AG1478 (AG) (1 µM) eklendi. Her iki inhibitöründe Ang II uyarımlı proliferasyonu kontrol seviyesine baskıladığı gözlemlendi # p<0.05. * p<0.05. Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=4).

YG'lu ortamda ise kendi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, AT1R antagonisti losartan Ang II uyarımlı proliferasyonu kontrol seviyelerine baskımlarken p<0.05, EGFR inhibitörü AG1478 Ang II uyarımlı proliferasyonu kontrol seviyesinin altına düşürmüştür p<0.05 (Şekil 4.23). YG ortamdaki sonuçların Kruskal-Wallis testine göre anlamlılıkları p<0.02'dir.

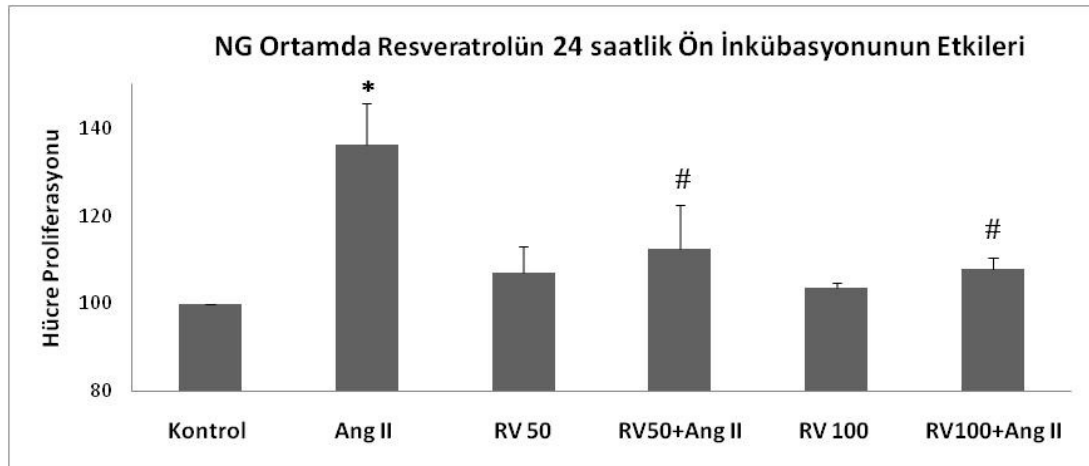


Şekil 4.23. VDKH'lerinde YG'lu ortamda reseptör inhibitörlerinin Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde YG (25 mM, 48 saat) ortamda reseptör inhibitörlerinin Ang II (100 nM, 24 saat) uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine etkileri incelendi. Ang II uyarımından 30 dakika önce ortama, AT1R antagonisti losartan (Los) (10 µM) ve EGFR blokörü AG1478 (AG) (1 µM) eklendi. Her iki inhibitöründe Ang II uyarımlı proliferasyonu baskıladığı gözlemlendi # p<0.05. * p<0.05. Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=4).

4.8. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Normal Glukozlu Ortamda Resveratrolün Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri

VDK hücrelerinde Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine resveratrolün etkilerini incelemek için 96 kuyucuklu petrilere ekilen VDK hücreleri (5.000 hücre/kuyu) 48 saat NG medyumla beslendi. 48 saatin sonunda hücre medyumları % 0.1 FBS içeren NG-DMEM'le değiştirildi. Serum içermeyen ortamda resveratrol'nin 50 μ M ile 100 μ M konsantrasyonun etkileri, 24 ve 48 saatlik ön inkübasyonlar olmak üzere incelendi. Sürenin bitiminde hücreler 100 nM Ang II ile 24 saat uyarıldı. Tüm inkübasyonların sonunda hücrelerin medyumları 100 μ L taze medyumla değiştirilip 10 μ L WST eklendi. 4 saat sonra okunan absorbanlarla hücre proliferasyonları incelendi. NG ortamdaki bulguların Kruskal-Wallis testine göre anlamlılık derecesi $p < 0.002$ 'dir.

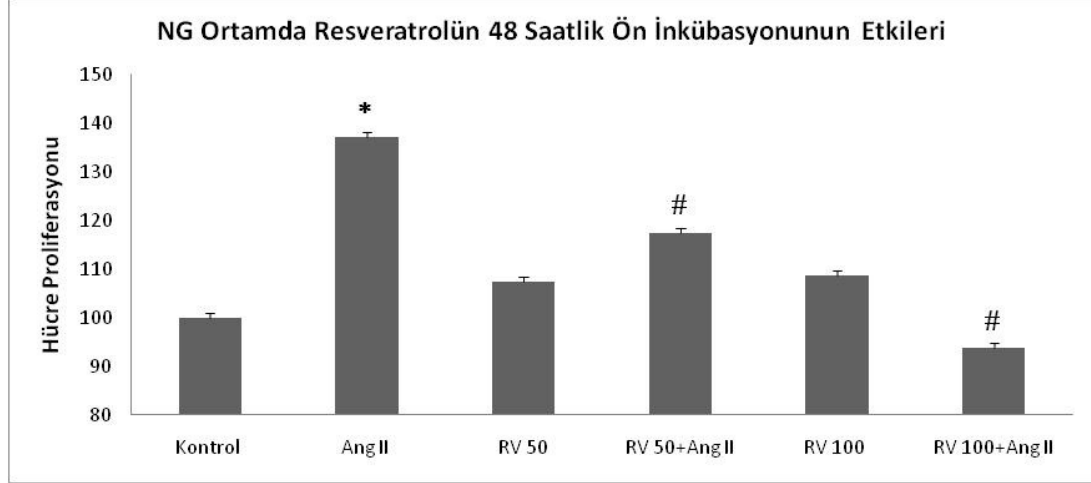
Bulgularımızda NG ortamda resveratrol'nin 24 saatlik ön inkübasyonunu gösteren deneylerde; Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Ang II uyarımının (100 nM, 24 saat) hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlemlendi $p < 0.05$. Resveratrolün 50 ve 100 μ M'lık kontrol grupları ile kontrol grubu aynı seviyedeydi. Resveratrolün Ang II ile birlikte uygulandığı hücrelerde ise, RV'nin her iki konsantrasyonunda da Ang II uyarımlı hücre proliferasyonunun azaldığı gözlenmiştir $p < 0.05$ (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. VDK hücrelerinde NG'lu ortamda 24 saatlik Resveratrol ön inkübasyonunun Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde NG (5,5 mM, 48 saat) ortamda Ang II (100 nM, 24 saat) uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine RV'nin (50 μ M ve 100 μ M) 24 saatlik ön inkübasyonunun etkileri incelendi. RV'nin her iki konsantrasyonda da Ang II uyarımlı proliferasyonu baskılandığı gözlemlendi # $p < 0.05$. * $p < 0.05$. Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=4).

Bulgularımızda NG ortamda, 48 saatlik RV ön inkübasyonunu gösteren deneylerde; Ang II uyarımı (100 nM, 24 saat) ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunun arttığı saptanmıştır $p < 0.05$. Resveratrolün Ang II ile birlikte

uygulandığı hücrelerde; Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu, RV'nin 50 μ M konsantrasyonunda azalırken 100 μ M'lık uygulamalarda, kontrol seviyesinin altına düşmüştür $p<0.05$ (Şekil 4.25).

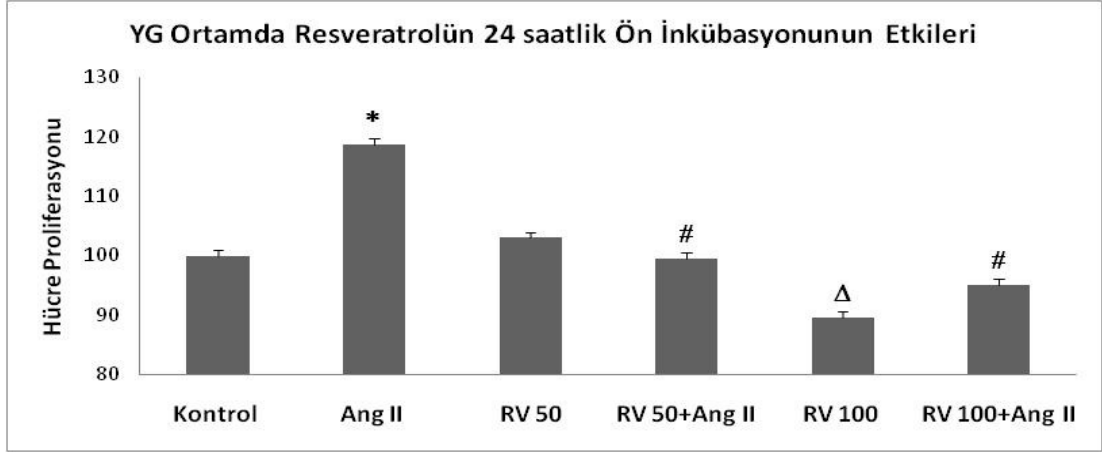


Şekil 4.25. VDK hücrelerinde NG'lu ortamda 48 saatlik Resveratrol ön inkübasyonunun Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde NG (5,5 mM, 48 saat) ortamda Ang II (100 nM, 24 saat) uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine RV'nin (50 μ M ve 100 μ M) 48 saatlik ön inkübasyonunun etkileri incelendi. 50 μ M RV, Ang II uyarımlı proliferasyonu baskımlarken, 100 μ M RV kontrol seviyesinin altına düşürmüştür. # $p<0.05$. * $p<0.05$. Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=4).

4.9. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Yüksek Glukozlu Ortamda Resveratrolün Ang II Uyarımlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri

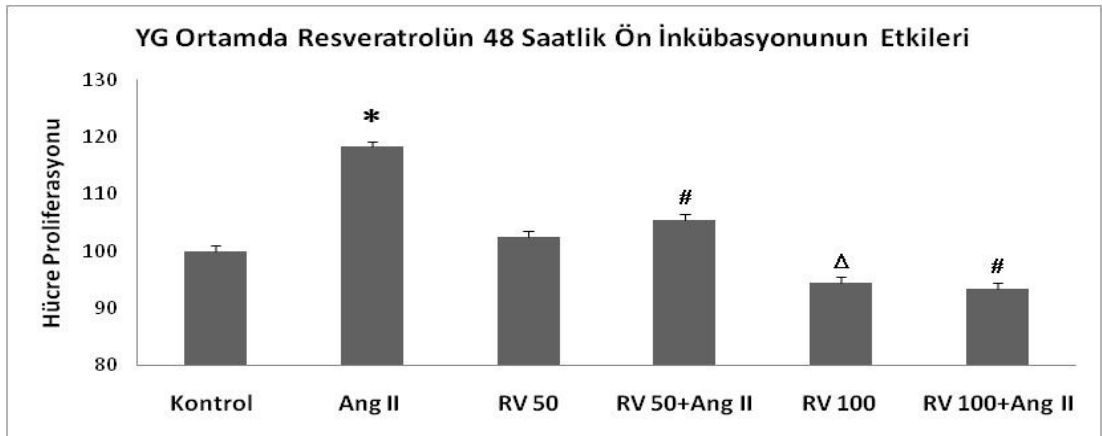
VDK hücreleri YG medyumla 96 kuyucuklu petrilere ekilip (5.000 hücre/kuyu) 48 saat beslendikten sonra hücre medyumları % 0.1 FBS içeren YG-DMEM'le değiştirildi. Serum içermeyen ortamda RV'nin 50 μ M ile 100 μ M konsantrasyonunun etkileri, 24 ve 48 saatlik ön inkübasyonlar olmak üzere incelendi. Sürenin bitiminde hücreler 100 nM Ang II ile 24 saat uyarıldı ve hücre proliferasyonları incelendi. YG ortamdaki bulguların Kruskal-Wallis testine göre anlamlılık derecesi $p<0.003$ 'dür.

Bulgularımızdaki YG'lu ortamda RV'nin 24 saatlik ön inkübasyonunu gösteren deneylerde; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, Ang II uyarımının (100 nM, 24 saat) hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlemlendi ($p<0.05$). RV'nin 50 μ M'lık kontrol grubunun (3. sütun) hücre proliferasyonunu etkilemediği, 100 μ M'lık kontrol grubunun ise hücre proliferasyonunu kontrol seviyesinin altına düşürdüğü gözlenmiştir ($p<0.05$). Resveratrolün Ang II ile birlikte uygulandığı hücrelerde, RV'nin her iki konsantrasyonunda da, Ang II uyarımlı hücre proliferasyonunu kontrol seviyesine baskıladığı saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. VDK hücrelerinde YG’lu ortamda 24 saatlik Resveratrol ön inkübasyonunun Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde YG (25 mM, 48 saat) ortamda Ang II (100 nM, 24 saat) uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine RV’nin (50 μ M ve 100 μ M) 24 saatlik ön inkübasyonunun etkileri incelendi. RV’nin her iki konsantrasyonda da Ang II uyarımlı proliferasyonu baskıladığı gözlemlendi (* $p < 0.05$, # $p < 0.05$, Δ $p < 0.05$). Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=4).

Bulgularımızda YG ortamda, RV’nin 48 saatlik ön inkübasyonunu gösteren deneylerde; Ang II uyarımı (100 nM, 24 saat) ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunun arttığı saptanmıştır ($p < 0.05$). Resveratrolün Ang II ile birlikte uygulandığı hücrelerde; Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu, RV’nin 50 μ M konsantrasyonunda azalırken 100 μ M’lık uygulamalarda, kontrol seviyesinin altına düşmüştür ($p < 0.05$) (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. VDK hücrelerinde YG’lu ortamda 48 saatlik Resveratrol ön inkübasyonunun Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine etkisinin grafiksel gösterimi. VDKH kültürlerinde YG (25 mM, 48 saat) ortamda Ang II (100 nM, 24 saat) uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine RV’nin (50 μ M ve 100 μ M) 48 saatlik ön inkübasyonunun etkileri incelendi. RV’nin 50 μ M konsantrasyonu Ang II uyarımlı proliferasyonu baskılamakta, 100 μ M RV kontrol seviyesinin altına düşürmüştür # $p < 0.05$. * $p < 0.05$. Kontrol grubu 100 birim kabul edildi. Sonuçlar $\bar{X} \pm SD$ olarak gösterildi (n=4).

TARTIŞMA

Diyabet, insulin sekresyonu ve/veya etki mekanizmasındaki bozukluklar sonucu ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. 2006 yılında, dünyamızda 171 milyon insanın diyabetten etkilendiği tahmin edilmektedir. Dünya sağlık örgütünün 2007 verilerine göre, 2030 yılında 366 milyon insanın diyabetten etkileneceği ön görülmektedir (73, 74). 2002 yılında TURDEP'in yaptığı çalışmada Türk populasyonundaki diyabet prevalansı %7.2 iken 2011 yılında yapılan çalışmalarda bu sayı hızla artmış ve %12.7'nin üzerinde bulunmuştur (88). 2000 yılında ölüme neden olan hastalıklar listesinde diyabet 5. sıradadır ve bunun büyük bir kısmını diyabetik mikrovasküler komplikasyonlar oluşturmaktadır (73, 74). Diyabette oluşan uzamış hiperglisemi de vasküler düz kas hücrelerinin aşırı proliferasyonuna neden olan mikrovasküler komplikasyonlardandır.

VDKH proliferasyonuna neden olan en önemli moleküllerden biri Ang II' dir. Ang II, damar duvarın yapısal ve fonksiyonel bütünlüğün kontrolünde temel rol oynayan multifonksiyonel bir peptiddir. Ang II, AT1 reseptörleri üzerinden hücre proliferasyonunu ve ilgili sinyal iletimlerini düzenlemektedir (4). VDK hücrelerinde Ang II uyarımı sonrasında aktifleşen ERK1/2, Akt ve STAT3 protein fosforilasyonlarının hücre proliferasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Ang II uyarımı sonrasında uzamış hiperglisemide değişen sinyal iletim yollarının incelenmesi, vasküler hastalıkların altında yatan mekanizmaların anlaşılması için temeldir.

Resveratrol, kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu olduğu düşünülen polifenolik bir bileşiktir. Japon geleneksel tıbbında yüzyıllardır kullanılan resveratrolün kardiyovasküler sistem üzerindeki koruyucu etkileri son 15 yıldır araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar literatürde yerini almaya başlamıştır ancak resveratrolün vasküler yapılardaki moleküler etki mekanizmaları ile ilgili çalışmalar çok yenidir. Uzun süre yüksek glukoz maruz kalan VDK hücrelerinde, resveratrolün hücre proliferasyonu üzerine olan etkilerini gösteren çalışmalarsa yok denecek kadar azdır. Haider ve arkadaşlarının 2002 yılında rat aortik düz kas hücrelerinde yaptıkları çalışmada ise resveratrolün, Ang II uyarımlı hipertrofiyi baskıladığı öne sürülmüştür (15). 2006 yılında yapılan bir çalışmada Streptozotocin uyarımlı diyabetik ratların 14 gün boyunca resveratrol almasıyla kontrol gruplarına kıyasla kan glukoz ve insulin seviyelerinin düştüğü gözlenmiştir. Bunun yanı sıra plazma trigliserid konsantrasyonlarında da anlamlı düşüşler olmuştur (75). Szkudelski ve arkadaşları 2011 yılında yayınladıkları bir derlemede;

Resveratrolün hiperglisemik hayvanlarda, kan glukozunu düşürüp pankreasın β hücrelerini koruması nedeniyle anti diyabetik etkiler oluşturduğundan bahsetmektedir (74).

Bu ve benzeri bulgular, resveratrolün kardiyovasküler hastalıkların tedavi sürecine yardımcı olabilecek potansiyelde bir molekül olduğuna işaret etmektedir.

Bu çalışmanın planlanmasının amacı; VDK hücrelerinde, diyabet gibi uzamış hiperglisemi durumunda, Ang II uyarımı sonrasında artan hücre proliferasyonunu inhibe edebilecek yeni hedef moleküllerin geliştirilmesine yardımcı olmaktır. Bu sebeple çalışmamızda normal ve yüksek glukozla beslenen VDKH'lerinde artan hücre proliferasyonu ve buna aracılık eden sinyal molekülleri üzerine (pERK1/2, pAkt ve pSTAT3), resveratrolün etkileri incelenmiştir.

Çalışmalarımızın ilk aşamasında ratların torasik aortalarından vasküler düz kas hücreleri izole edilmiş ve primer kültür ortamına aktarılmıştır. İzolasyonu ve primer kültürü yapılan hücrelere immünositokimya tekniği uygulanarak identifikasyonları yapılmıştır. Düz kas hücrelerin düz kasa spesifik α -aktinleri boyanmış ve kültüre edilmiş hücrelerin yüksek saflıkta düz kas hücresi oldukları gösterilmiştir (Şekil 4.1). İmmünositokimyanın izotip kontrol ve normal kontrol boyamaları α - aktindeki boyanmaların spesifik olduğunu göstermiştir.

Vasküler düz kas hücreleri izole edilip idendifikasyonları yapıldıktan sonra, hücreler yüksek glukozla beslenmiş ve yüksek glukozlu ortamda hücre proliferasyonu ile buna aracılık eden ERK1/2, Akt ve STAT3 fosforilasyonlarındaki değişiklikler incelenmiştir. Aynı özellikteki hücreler normal glukoz ile beslenip yüksek glukozun kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bulgularımızda yüksek glukozun, vasküler düz kas hücre proliferasyonunda ~ % 40 gibi bir artışa neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.20). Yüksek glukoz uygulaması ile elde ettiğimiz diğer bulgularda ise, normal glukoz kontrollerine göre, ERK1/2, Akt ve STAT3 fosforilasyonlarının arttığı saptanmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Literatürde yüksek glukozun sebep olduğu bu artışların nedenini açıklayabilecek pek çok çalışma mevcuttur.

Mariero ve arkadaşlarının 2005 yılında yayınladıkları derlemede, yüksek glukozun farklı hücreler üzerinde oluşturduğu değişikliklerden söz edilmiştir (76). Bu derlemeye göre yüksek glukoz, hücrelerdeki Protein Kinaz C (PKC) enziminin de novo sentezinin artışına neden olmaktadır. Yüksek glukoz uyarımlı glomerüler mezangiyal hücrelerde, PKC'nin birçok formunun uzun süreli aktifleştigi gözlenmiştir (77). Bunun yanı sıra, Ha ve Lee ile Hanede ve ark. yaptıkları çalışmada

yüksek glukozda, makromoleküllerde artan non enzimatik modifikasyonlar (glikozile son ürünlerin, AGE, oluşumu gibi) hücrelerde sorbitol ve miyo-inozitol metabolizmasını değiştirip oksidanların oluşumunu arttırdığı ve bu durumun MAP kinaz aktivasyonunda artışa yol açabildiğini ileri sürmüşlerdir (78, 79) Amiri ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda ise yüksek glukozun vasküler düz kas hücrelerinde serin ve tirozin fosforilasyonlarını arttırdığı ve hücre büyümesine neden olduğunu öne sürmüştür (10). Yine aynı çalışmada yüksek glukozun Jak/STAT aktivasyonunu arttırdığını gözlenmiştir. Natarajan ve arkadaşlarının 1999 yılında yüksek glukozlu ortamda VDK hücreleri üzerine yaptıkları çalışmalarda, yüksek glukozun ERK1/2 ve JNK aktivitesini arttırdığı saptanmıştır. Bunlar ve benzeri bulgular yüksek glukozun hücre içerisinde, PKC enzim aktivitesinin artması, oksidatif stres ürünlerinin oluşumu, hücre içi fosforilasyon mekanizmalarının artıp fosfatazların baskılanması gibi mekanizmalarla ERK1/2, JNK ve STAT gibi proteinleri aktive ederek hücre proliferasyonunu arttırdığına işaret etmektedir.

VDKH proliferasyonunu arttıran bir diğer uyaran Ang II'dir. Elde ettiğimiz verilerde normal ve yüksek glukozlu ortamda Ang II'nin vasküler düz kas hücre proliferasyonunda artışa neden olduğunu gözlemlenmiştir (Şekil 4.20). Ang II uyarımı sonrasında hücre proliferasyonundaki bu artışların Ang II uyarımı sonrasında fosforilasyonları artan ERK1/2, Akt ve STAT3 gibi sinyal moleküllerinden kaynaklandığını düşünüyoruz. Çünkü VDK hücrelerinde elde ettiğimiz verilerde, Ang II uyarımı sonrasında ERK1/2, Akt ve STAT3 protein fosforilasyonlarında artışlar saptadık (Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Aşağıdaki paragraflarda Ang II uyarımıyla artan protein fosforilasyonundaki değişiklikler, yüksek glukozdaki işleyiş mekanizmaları ve bunlarla ilişkili bulgularımıza değinilmektedir.

Ang II uyarımıyla AT1R üzerinden MEK kinazların fosforilasyonu aracılığıyla ERK1/2'lerin fosforile oldukları bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, AT1R uyarımını takiben MEK kinazların aktive olabilmesi için, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması, PLC ve PKC enzimin aktifleşmesi gerektiği bildirilmiştir. Bu bilgilerin bir kısmı grubumuzun daha önceki çalışmalarıyla gösterilmiştir (18). ERK1/2 fosforilasyonuna farklı bir açıyla bakıldığında; EGF reseptörü üzerinden Grb2-Sos-Ras yolağının etkinleşmesi ile pERK1/2 arttığı saptanmıştır. Bu iki farklı reseptör üzerinden oluşan ERK1/2 fosforilasyonu, Ang II uyarımı sonrasında AT1R üzerinden EGFR transaktivasyonun gerçekleştiği noktada birleşmektedir. Bu sayede Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunun güçlendiği düşünülmektedir. Bu transaktivasyondaki aracı moleküller ise halen araştırılmaktadır. Bizim elde ettiğimiz bulgularda, Ang II uyarımı sonrasında, hem Ang II'nin hem de ortamdaki yüksek glukozun ERK1/2 fosforilasyonunu arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.2 ve 4.3). Ang II ve YG'un birlikte bulunduğu durumda ERK1/2 fosforilasyonu şiddetlenmiştir. Ang II uyarımı sonrasında ortama spesifik ERK1/2 inhibitörü PD098059 eklendiğinde

Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunun kontrol seviyesinde kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.15). Bu bulgu Ang II uyarımlı pERK1/2'deki artışın spesifik olduğunu göstermektedir.

Ang II uyarımı sonrasında aktifleşen bir diğer sinyal iletim yolu PI3K/Akt'dir. VDKH'lerinde Ang II uyarımı sonrasında PI3K aktifleştiği ve Akt'ye bağlanarak Akt'nin ser473 fosforilasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Fosforillenen Akt; bad, mTOR ve eNOS gibi aracı moleküller üzerinden hücreyi yaşama ve protein sentezine götürmektedir (80). Wang ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada, yüksek glukozlu şartlarda süre bağımlı olarak Akt aktivasyonunun arttığı saptanmıştır (81). Ancak bu çalışma kısa süreli (0-2 saat) (0-24 saat) yüksek glukoz inkübasyonlarını göstermektedir.

Literatürde yüksek glukozlu ortamda Akt fosforilasyonuna dair çalışmalar çok yeni ve sınırlıdır. Bu sebepten dolayı amacımız doğrultusunda, uzun süre yüksek glukozla maruz kalan VDK hücrelerinde Ang II uyarımlı Akt fosforilasyonları çalışılmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara Ang II ve yüksek glukozun Akt fosforilasyonunda artışa neden olduğunu saptandı (Şekil 4.4). Bu bulgulardan yola çıkarak VDKH'lerinde Ang II ve yüksek glukozun Akt fosforilasyonunda etkili olduğunu ve iki uyarının birlikte bulunması durumunda sinyallerin katlanarak arttığını söylenebilir. Bunun yanı sıra bizim çalışmamız uzun süreli hiperglisemide Akt fosforilasyonunun etkisini göstermesi açısından değerlidir.

Biz vasküler düz kas hücrelerinde hücre proliferasyonuna neden olan temel basamaklardan birinin Jak/STAT yolu olduğunu düşünmekteyiz. Daha önceden yapılan çalışmalarda Ang II uyarımı sonrasında AT1 reseptörünün C-terminal bölgesinin JAK2'ye bağlandığı ve tirozin fosforilasyonunun gerçekleştiği belirtilmiştir (82). JAK2 inhibitörü AG-490 ile yapılan çalışmalarda; JAK2 inhibe edildiğinde STAT3'lerin, Ang II uyarımlı hücre proliferasyonunun ve DNA sentezinin bloke olduğu saptanmıştır (9). Amiri ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda ise yüksek glukoz ve Ang II uyarımının JAK/STAT fosforilasyonunu ve hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlenmiştir (10).

Bu verilerden yola çıkarak VDKH kültürlerinde 48 saat yüksek glukozla inkübasyon sonrasında Ang II uyarımının STAT3 fosforilasyonu üzerine etkileri araştırıldı. Sonuçlarımızda Ang II uyarımı sonrasında NG ve YG'lu ortamda STAT3 fosforilasyonunun arttığı gözlemlendi (Şekil 4.6). Elde ettiğimiz bulgular Amiri ve arkadaşlarının çalışmalarıyla da uyumludur. Ang II'ni VDKH'lerinde hücre proliferasyonunda önemli bir basamak olan STAT3 fosforilasyonunu arttırdığı bilinmektedir.

VDK hücrelerinde yüksek ve normal glukozlu ortamda Ang II'nin hücre proliferasyonu ve aracı sinyal molekülleri üzerine etkilerini inceledikten sonra bu etkilerin ortaya çıkmasına aracılık eden reseptörlerin her iki ortamda da etkilerini incelemek istedik. VDK hücrelerinde Ang II uyarımı sonrasında AT1 reseptörünün aracılı sinyalleri yönlendirdiği bilinmektedir ancak ortamdaki glukoz konsantrasyonunun artması ve AT1R üzerinden EGFR transaktivasyonlarının gerçekleşmesinden dolayı her iki reseptör de çalışma kapsamına alındı.

İlk aşamada AT1R antagonisti losartan ve EGFR inhibitörü AG1478'in Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine olan etkilerini incendi. Bulgularımızda NG'lu ortamda AT1R antagonisti losartan ve EGFR inhibitörü AG1478, Ang II uyarımlı hücre proliferasyonunu kontrol seviyesine kadar baskıladı (Şekil 4.22). YG'lu ortamda ise AT1R antagonisti losartan, Ang II uyarımlı proliferasyonu kontrol seviyelerine baskılamak; EGFR inhibitörü AG1478 kontrol seviyesinin altına düşürdü (Şekil 4.23).

Bu veriler bize uzun süre yüksek glukozla maruz kalan vasküler düz kas hücrelerinde EGF reseptörü üzerinden işleyen sinyallerin de etkili olduğunu göstermektedir. Her ne kadar Ang II uyarımlı hücre proliferasyonunda AT1 reseptörü etkili olsa da, hücre proliferasyonu söz konusu olduğunda büyüme faktör reseptörlerinin etkisi beklenmedik bir sonuç değildir. 2003 yılında Konishi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, vasküler düz kas hücrelerinde EGFR transaktivasyonlarını ortamda bulunan glukozun düzenlediği öne sürülmektedir. Yaptıkları çalışmada yüksek glukozun 170 kDa ağırlığındaki EGFR aktive ettiği ve Ang II'nin de EGFR transaktivasyonunu 170kDa-EGFR üzerinden gerçekleştirdiği söylenmektedir. Bu veri bize yüksek glukozlu ortamda EGFR reseptörünün ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Reseptör inhibitörlerinin hücre proliferasyonu üzerine olan etkilerini inceledikten sonra; Her iki reseptör inhibitörünün Ang II uyarımlı ERK1/2, Akt ve STAT3 fosforilasyonu üzerine olan etkilerini NG ve YG ortamda araştırdık. Bulgularımızda, NG'lu ortamda AT1 Reseptör antagonisti losartanın Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunu kontrol seviyesine baskıladığı görülmüştür. EGFR inhibitörü AG1478 ise Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunu baskılamıştır ancak bu baskı losartanda olduğu kadar güçlü değildir (NG-kontrol seviyesinden yüksek). Bu veriler bize NG'lu ortamda Ang II uyarımlı ERK fosforilasyonunda temel reseptörün AT1R olduğunu, EGFR transaktivasyonun ise etkili olduğunu (AG1478 ile baskılamadan dolayı) ancak ikinci sırada kaldığını düşündürmektedir (Şekil 4.8 ve 4.9).

YG'lu şartlarda ise; hem Losartan hem de AG1478 Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunu YG-kontrol seviyesinin altına düşürmüştür ve AG1478' deki düşüş

daha etkilidir. YG'da AG1478 inhibitörü olan hücrelerdeki düşüşün losartan'dan daha fazla olması yüksek glukoz şartlarında EGFR reseptörünün ön plana çıktığını ve büyüme sinyallerinin bu reseptör üzerinden işlediğini düşündürmektedir. Ayrıca YG'lu ortamda, Ang II uyarımlı-losartan inhibisyonu YG-kontrol seviyesinin altında bulunmuştur. Bunun nedeninin losartanın AT1R bloke etmesi sonucunda EGFR transaktivasyonlarının kısmı olarak kesilmesi olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.8 ve 4.9).

AT1R antagonisti losartan ve EGFR inhibitörü AG1478'in Ang II uyarımlı Akt fosforilasyonu üzerine etkileri incelendiğinde, NG'lu ortamda losartanın, Ang II uyarımlı Akt fosforilasyonunu, NG-kontrol seviyesine kadar baskıladığı; AG1478'in ise kısmı baskıladığı görüldü. YG'lu ortamda ise losartan, Akt fosforilasyonunu YG-kontrol seviyesine düşürdü. Bu düşüşler NG ve YG'da oluşan Ang II uyarımının AT1R üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. YG'lu ortamda Ang II uyarımı altında AG1478 uygulanan hücrelerde NG-kontrol seviyesine kadar olan düşüş, ortamda glukoz konsantrasyonu arttığında Akt fosforilasyonunun temelinde EGFR olduğunu akla getirmektedir (Şekil 4.10 ve 4.11).

AT1R antagonisti losartan ve EGFR inhibitörü AG1478'in Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonu üzerine etkileri incelendiğinde, elde ettiğimiz bulgulara, NG'lu ortamda hem losartanın hemde AG1478'in Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonunu kontrol seviyesine baskıladığı görüldü. Bu bulgu, Ang II uyarımının AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştiğini doğrularken, STAT3 fosforilasyonunda AT1R kadar büyüme faktör reseptörlerinin de etkili olduğunu göstermektedir. YG'lu ortamda ise, Ang II uyarımı altında hem losartan hem de AG1478 uygulanan hücrelerde STAT3 fosforilasyonları HG-kontrol seviyesine kadar düşmüştür. Bu durumda Ang II uyarımı altında her iki reseptörün de etkili olduğu düşünülebilir (Şekil 4.12 ve 4.13).

Şu ana kadar anlatılan ve gösterilen veriler, vasküler düz kas hücrelerinde yüksek glukozlu ortamda, Ang II uyarımının hücre proliferasyonuna neden olduğunu ve bu hücre proliferasyonuna aracılık eden moleküllerin başında ERK1/2, Akt ve STAT3 fosforilasyonlarının geldiğini göstermektedir. Elde ettiğimiz deneysel verilerden Ang II ve yüksek glukozun hücre proliferasyonu üzerine etkilerinin AT1R ve EGFR reseptörü üzerinden gerçekleştiğini söyleyebiliriz. Bu noktadan sonra odaklandığımız konu, VDK hücrelerinde yüksek glukoz ve Ang II uyarımı altında artan hücre proliferasyonunu nasıl kontrol altına alabiliriz ve düz kas hücrelerinde artan proliferasyonun baskılanmasını nasıl bir moleküler mekanizma ile açıklayabiliriz.

Bu konuda literatürde çok geniş veriler olmasa da Haider ve ark yaptıkları çalışmalar resveratrolün vasküler düz kas hücreleri üzerindeki etkilerini ve mekanizmalarını açıklamada öncü olmuştur. Bu ekibin yaptıkları çalışmalarda VDKH'lerinde resveratrolün 48 saatlik ön inkübasyon sürelerinde, doz bağımlı olarak hücrel hipertrofiyi baskıladığı ve 50 μ M dozun baskılamadaki en etkili doz olduğu öne sürülmüştür. Yine aynı çalışmada resveratrolün Akt fosforilasyonunu kontrol seviyesine baskıladığı ve Erk fosforilasyonunda düşüşe neden olduğu belirtilmiştir.

Koroner arter düz kas hücrelerinde yapılan bir çalışmada, resveratrolün ERK1/2 ve JNK fosforilasyonunu baskıladığı gösterilmektedir (83).

Poussier ve ekibinin 2005 yılında yayınladıkları çalışmada; VDK hücrelerinde 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M resveratrol ile 3 gün inkübe edilmiş ve hücre sayılarındaki değişiklikler gözlenmiştir. %1 FBS içeren ortamda 10^{-4} ve 10^{-5} M resveratrolün hücre proliferasyonunu anlamlı derecede baskıladığı görülmüştür (84).

VDKH hücrelerinin primer kültürlerinde, resveratrolün hücre proliferasyonu üzerine olan etkilerini gösteren çalışmalar çok yeni ve yok denecek kadar azdır. Hiperglisemi durumunda resveratrolün hücre proliferasyonu üzerine etkileri ve bunlarla ilişkili sinyal molekülleri ise henüz literatürde yerini almamıştır.

Bu nedenlerle çalışmalarımızın devamında; Vasküler düz kas hücre kültürlerinde yüksek glukozlu ortamda Ang II uyarımı sonucunda aktiveleşen hücre proliferasyonu ve proliferasyona yol açabilecek sinyal molekülleri üzerine resveratrolün etkileri araştırılmıştır. Yüksek glukozlu ortamda Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine resveratrolün etkilerini incelemesinden dolayı çalışmamız özgündür.

Çalışmalarımızda resveratrolün 50 ve 100 μ M konsantrasyonu 24 ve 48 saatlik ön inkübasyonlarda çalışılmıştır. Resveratrol ön-inkübasyonlarını takiben 24 saatlik Ang II uygulama süresinde de resveratrol ortamda tutulmuştur. FBS'den kaynaklanabilecek uyarımları elimine etmek için resveratrolün ve Ang II'nin tüm inkübasyon sürelerinde medyumdaki FBS oranı % 0,1 oranında tutulmuştur.

Bulgularımızda, NG ortamda resveratrolün 24 saat ön inkübasyonu ile kontrol grupları karşılaştırıldığında, 50 ve 100 μ M resveratrolün Ang II uyarımlı hücre proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.24). Resveratrol ön inkübasyonu 48 saat uygulandığında, Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu, 50 μ M resveratrol ile azalırken, 100 μ M resveratrolde kontrol seviyesinin altında bulunmuştur (Şekil 4.25).

YG'lu ortamda 24 saat resveratrol ön inkübasyonu ile ilgili bulgularda 100 μ M resveratrolün tek başına uygulandığı hücrelerde proliferasyonun kontrol seviyesinin altına düştüğü gözlemlenmiştir. Resveratrolün Ang II ile birlikte uygulandığı hücrelerde ise, her iki konsantrasyonda da Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu kontrol seviyesine baskılanmıştır (Şekil 4.26). 48 saatlik resveratrol uygulamasında Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu, 50 μ M resveratrol ile azalırken 100 μ M'lık resveratrol uygulamalarında, kontrol seviyesinin altına düşmüştür (Şekil 4.27).

Elde ettiğimiz bu veriler bize normal ve yüksek glukozlu ortamda Ang II uyarımı sonrasında oluşan hücre proliferasyonunu resveratrolün baskılayabildiğini göstermektedir. Resveratrolün yüksek konsantrasyonlarda hücre proliferasyonundaki inhibisyon etkisi güçlenmektedir. Ayrıca yüksek glukozlu ortamda elde ettiğimiz veriler incelenip normal glukozla kıyaslanınca, resveratrolün yüksek glukoz nedeniyle artan hücre proliferasyonunu baskılamada daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Mnjoyan ve Fujise'nin 2003 yılında yayınladıkları çalışmalarında resveratrolün düşük konsantrasyonlarda VDK hücrelerini apoptozise uğratmadan inhibe ederken, yüksek konsantrasyonlarda apoptozisi uyarak inhibe ettiklerini göstermişlerdir (85). Bu verilerden yola çıkarak resveratrolün daha çok anormal hücre çoğalmasında seçici olduğu söylenebilir. Poussier ve ekibi de vasküler düz kas hücresinde resveratrolün apoptozisi uyarak hücre proliferasyonu inhibe ettiğini öne sürmüştür (84).

Resveratrolün VDK hücre proliferasyonunu baskılama nedenleriyle ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur. Daha önceden de bahsedildiği üzere Haider ve arkadaşları resveratrolün vasküler hipertrofiyi Akt'nin inhibisyonu üzerinden gerçekleştirdiğini öne sürmektedir (15). Poussier ve ark resveratrolün hücre morfolojisinde değişiklik yapmadan apoptozisi uyarak hücre proliferasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Bunun yanı sıra aynı çalışmada resveratrolün hücre siklusunu G1→S fazında bloke edildiği flow sitometri çalışmalarıyla gösterilmiştir (84). Cheng ve arkadaşlarının 2004 yayınladıkları çalışmada Ang II uyarımlı kardiyomiyosit hipertrofisinde resveratrolün ROS oluşumunu baskılayarak inhibisyon etki yarattığı rapor edilmiştir (86). Biz de çalışmamızda hücre proliferasyonunun baskılanmasında ERK1/2, Akt ve STAT3 fosforilasyonlarının katkısı olup olmadığını araştırmak istedik.

Bulgularımızda sadece resveratrol uygulanan hücrelerde Akt fosforilasyonunun NG ve YG ortamda kontrol seviyesinin altına düştüğü gözlemlendi. Ang II ve RV'nin birlikte uygulanması durumunda da Akt fosforilasyonu, kontrol seviyesinin altındaydı. Elde ettiğimiz sonuçlar, NG ve YG'lu ortamda Ang II uyarımı sonucu aktifleşen Akt fosforilasyonunda resveratrolün tam bir inhibisyon etkisinin

olduğunu; Ang II uyarımı olmadan da resveratrolün Akt fosforilasyonu kontrol seviyesinin altına düşürdüğünü göstermektedir (Şekil 4.16). NG ortamda elde ettiğimiz veriler Haider ve ark yaptıkları çalışmalar ile uyumluyken YG ortamdaki verilerimiz literatürde ilk kez gösterilmiştir. VDKH'lerinde Ang II uyarımını takiben Gab-1(Grb-2 associated binder)'in tirozin birimlerinin hızlı bir şekilde fosforile olduğu ve PI3K p85 alt ünitesiyle ilişkilendiği biliniyor. Resveratrolün Gab-1 fosforilasyonunu azaltarak Akt fosforilasyonunu baskıladığı öne sürülüyor (16). Bu mekanizma resveratrol uygulanan hücrelerde Akt inhibisyonunun nedenini açıklayabilir.

Kardiyak fibroblast hücrelerinde resveratrolün Ang II uyarımlı ERK1/2 aktivasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (17). Haider ve ark çalışmalarında ise VDK hücrelerinde resveratrolün ERK1/2 fosforilasyonunu kısmı olarak baskıladığını öne sürülmüştür. Bizim elde ettiğimiz verilerde ise VDK hücrelerinde NG ortamda ERK1/2 fosforilasyonunun baskılanmadığı görülmüştür. YG'lu şartlarda ise; resveratrol tek başına uygulandığında ERK fosforilasyonu NG-Kontrol seviyesine kadar düşürmüştür. Bu veri bize YG nedeniyle oluşan ERK fosforilasyonunu, resveratrolün baskılayabildiğini düşündürmektedir. Ortamda Ang II ve resveratrolün birlikte olduğu hücrelerde ise resveratrolün bu etkisi tamamen ortadan kalkmış gibi görünürken, hücreler Ang II uyarımına tam olarak cevap verebilmektedir (Şekil 4.14).

Resveratrolün süre ve doz bağımlı olarak Jak1/STAT3 sinyal yolunu fare kökenli lenfositik lösemili hücre kültürlerinde (L1210) inhibe ettiği gösterilmiştir. Resveratrolün bu etkiyi Jak1 ve STAT3'ün fosforilasyonunu azaltarak gerçekleştirdiği öne sürülmektedir (87). Literatürde resveratrol ve STAT3 fosforilasyonuna dair net veriler yoktur.

VDK primer hücre kültürlerinde, NG ve YG ortamdaki bulgularımızda resveratrolün tek başına uygulandığı hücre gruplarında, STAT3 fosforilasyonunun kontrol seviyesine yakın olduğu gözlenmiştir. NG ortamda; Ang II ile birlikte RV'nin olduğu hücrelerde, Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonunun kısmı olarak baskılandığı gözlenmiştir. YG'lu ortamda ise; Resveratrol, Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonunu kontrol seviyelerine kadar baskılamıştır (Şekil 4.18). Bu veriler bize YG'lu ortamda Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonu üzerine resveratrolün inhibitör etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu veri bizim için önemlidir çünkü VDKH hücrelerinde yüksek glukozlu ortamda resveratrolün STAT3 fosforilasyonunu baskıladığına dair ilk veriler bu çalışmada gösterilmiştir. Literatürde farklı hücre gruplarında bu inhibisyonun mekanizmasına ait yeterli veri bulunmamaktadır ve bu nokta araştırılmaya açıktır.

Özetle, VDK hücrelerinde yüksek glukozlu ortamda, Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu üzerine resveratrolün inhibitör etki yarattığı söylenebilir. Resveratrolün hücre proliferasyonunu baskılamada farklı mekanizmalar kullandığı öne sürülse de bu çalışma göstermiştir ki, resveratrol Akt ve STAT3 fosforilasyonlarını baskılayarak hücre proliferasyonunun inhibisyonuna katkı sağlamaktadır.

Çalışmalarımızda resveratrolün özellikle Akt fosforilasyonunu yüksek oranda inhibe etmesi dikkatimizi çekmiştir. Çünkü vasküler düz kas hücrelerinde Akt proteini, hücreyi yaşama yada ölüme götürmeye karar verebilecek kavşak bir moleküldür. Çalışmalarımız bize göstermiştir ki, resveratrol de yüksek glukozla beslenme gibi durumlarda, aşırı proliferen olan vasküler düz kas hücrelerini baskılamada daha etkilidir. Ayrıca çalışmalarımızda kullandığımız resveratrolün yüksek konsantrasyonları hücrelerin morfolojisini bozmadan inhibisyon etki yaratmıştır. Tüm bu veriler bize resveratrolün vasküler düz kas hücre proliferasyonunu gerekli durumlarda ve uygun molekülleri seçerek inhibisyon etki yarattığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda elde edilen verilerden, resveratrolün özellikle yüksek glukozla beslenen vasküler düz kas hücrelerinde STAT3 fosforilasyonunu inhibe ettiği bulgusu literatürde ilk kez gösterilmektedir. STAT3 proteini, ortamın glukoz konsantrasyonu arttığında fosforilasyonu artan ve hücreyi çoğalma yönünde uyaran bir moleküldür. Resveratrolün inhibisyon mekanizmasında STAT3 proteinini seçmesi diyabet gibi uzamış hiperglisemi durumunda artan hücre proliferasyonunu inhibe etmede çok etkili bir yol olabilir.

Resveratrolün kardiyovasküler hastalıklardan koruyucu etkisi bilinse de bu etkileri ortaya koyan moleküler etki mekanizmaları halen araştırılmaktadır. Çalışmamızın bu araştırmalara yardımcı olabilecek nitelikte olduğunu ve literatüre kattığımız yeni bilgilerin ilerideki araştırmaların geliştirilmesine ışık tutabileceğini düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Çalışmamızda rat aortik primer vasküler düz kas hücre kültüründe normal ve yüksek glukozlu ortamda Anjiyotensin II uyarımı ile oluşan hücre proliferasyonu ile aracı sinyal molekülleri (pERK, pAkt, pStat3) üzerine resveratrolün etkileri incelenmiştir.

Elde ettiğimiz bulguların sonuçları aşağıda kısaca özetlenmiştir.

1. VDK hücre kültürlerinde yüksek glukozun, (25 mM, 48 saat) normal glukoz (5,5 mM, 48 saat) kontrollerine kıyasla hücre proliferasyonunu ~ % 40 oranında arttırdığı saptanmıştır.
2. VDK hücrelerinde yüksek glukoz uygulamasının ERK1/2, Akt ve STAT3 fosforilasyonunda artışa neden olduğu gözlenmiştir.
3. VDK hücrelerinde normal ve yüksek glukozlu ortamda Ang II uyarımının (100 nM, 5 dakika) hücre proliferasyonunu arttırdığı saptanmıştır.
4. VDKH'lerinde normal ve yüksek glukozlu ortamda Ang II uyarımının (100 nM, 5 dakika) ERK1/2, Akt ve STAT3 proteinlerinin fosforilasyonunda artışa neden olduğu kaydedilmiştir.
5. VDKH'lerinde NG ortamda reseptör inhibitörleri losartan ve AG1478'in Ang II uyarımlı hücre proliferasyonunu kontrol seviyesine kadar baskıladığı saptandı.
6. VDKH'lerinde YG'lu ortamda AT1R antagonisti losartanın Ang II uyarımlı proliferasyonu kontrol seviyelerine baskılarken; EGFR inhibitörü AG1478'in, Ang II uyarımlı proliferasyonunu kontrol seviyesinin altına düşürdüğü gözlemlendi.
7. VDKH'lerinde NG'lu ortamda AT1 Reseptör Antagonisti losartanın Ang II uyarımlı ERK1/2 fosforilasyonunu kontrol seviyesine baskıladığı gözlenmiştir. EGFR inhibitörü AG1478 ise Ang II uyarımlı ERK fosforilasyonunu baskılamıştır ancak bu inhibisyon NG-kontrol seviyesinden yüksek bulunmuştur. Bu veriler bize NG'lu ortamda Ang II uyarımlı ERK

fosforilasyonunda temel reseptörün AT1R olduğunu, EGFR (AG1478 ile baskılanman dolayı) ise ikinci sırada kaldığını düşündürmektedir.

8. VDKH'lerinde YG'lu ortamda; hem AT1 Reseptör Antagonisti losartan hem de EGFR inhibitörü AG1478, Ang II uyarımlı Erk fosforilasyonunu YG-kontrol seviyesinin altına düşürmüştür ancak AG1478'deki düşüş daha etkilidir. Bu bulgular Ang II uyarımının AT1R üzerinden gerçekleştiğini, yüksek glukozlu ortamda EGFR reseptörünün de etkili olduğunu düşündürmektedir.
9. VDKH'lerinde NG'lu ortamda losartanın, Ang II uyarımlı Akt fosforilasyonunu, NG-kontrol seviyesine kadar baskıladığı; AG1478'in ise kısmı olarak baskıladığı gözlemlendi.
10. YG'lu ortamda ise losartan, Akt fosforilasyonunu YG-kontrolü seviyesine düşürmüştür. Bu düşüş YG'da oluşan Ang II uyarımının AT1R üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. YG'lu ortamda Ang II uyarımı altında AG1478 uygulanan hücrelerde gözlenen NG-kontrol seviyesine kadar olan düşüş, YG'lu Akt fosforilasyonunun temelinde EGFR olduğunu düşündürmektedir.
11. VDKH'lerinde NG'lu ortamda hem losartanın hemde AG1478'in Ang II uyarımlı STAT3 fosforilasyonunu kontrol seviyesine baskıladığı görüldü. Bu bulgu, Ang II uyarımının AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştiğini doğrularken, STAT3 fosforilasyonunda AT1R kadar büyüme faktör reseptörlerinin de etkili olduğunu düşündürmektedir.
12. VDKH'lerinde YG'lu ortamda ise, Ang II uyarımı altında hem losartan hem de AG1478 uygulanan hücrelerde STAT3 fosforilasyonları HG-kontrol seviyesine kadar düşmüştür. Bu bulgular yüksek glukozla beslenen hücrelerde Ang II uyarımı altında her iki reseptörün de etkili olduğunu düşündürmektedir.
13. VDKH kültürlerinde resveratrolün hücre proliferasyonu üzerine olan çalışmalarda; Resveratrolün 50 μ M konsantrasyonda, 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde, Ang II uyarımlı hücre proliferasyonunu her iki ortamda da kontrol seviyelerine düşürdüğü gözlemlendi. 100 μ M konsantrasyonlarda ise Ang II uyarımlı hücre proliferasyonu kontrol seviyelerinin altına düşmüş olarak bulundu. Bu veriler bize resveratrolün Ang II uyarımlı proliferasyonu baskılayabileceğini göstermektedir.

- 14.** VDKH' lerinde 48 saat NG ve YG'la beslenen hücrelerde Ang II (100nM, 5 dakika) uyarımı ile aktiveleşen ERK1/2 fosforilasyonuna 50 μ M, 30 dakika süreyle uygulanan resveratrolün etki etmediği gözlemlendi. YG'la beslenen hücrelere resveratrol tek başına uygulandığında ERK1/2 fosforilasyonunun NG-Kontrol seviyesine kadar düştüğü gözlemlendi. Bu veri bize YG nedeniyle oluşan ERK1/2 fosforilasyonunu, resveratrolün baskılayabildiğini düşündürmektedir.
- 15.** VDKH kültürlerinde NG ve YG ortamda resveratrol (50 μ M, 30 dakika) uygulaması Akt fosforilasyonunu kontrol seviyesinin altına düşürdü. Ang II ve resveratrolün birlikte uygulanması durumunda da Akt fosforilasyonu, kontrol seviyesinin altındaydı. Bu veriler, NG ve YG'lu ortamda Ang II uyarımı sonucu aktiveleşen Akt fosforilasyonunda resveratrolün tam bir inhibisyon etkisinin olduğunu göstermektedir.
- 16.** VDK primer hücre kültürlerinde, NG ortamda, Ang II uyarımlı (100 nM, 5 dakika) STAT3 fosforilasyonu üzerine, resveratrolün (50 μ M, 30 dakika) kısmı bir inhibisyonunun olduğu gözlemlendi. YG ortamda tam bir inhibisyon saptandı.

KAYNAKLAR

1. Wilson, J., DF., F. (1992) Diabetes Mellitus, in Williams Textbook of Endocrinology. pp 1255-1333.
2. Sowers, J. R., Epstein, M. (1995) Diabetes mellitus and associated hypertension, vascular disease, and nephropathy. An update, Hypertension; 26, 869-879.
3. Natarajan, R., Scott, S., Bai, W., Yerneni, K. K., Nadler, J. (1999) Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells under high glucose conditions. Hypertension; 33, 378-384.
4. Touyz, R. M., Schiffrin, E. L. (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Pharmacol Rev; 52, 639-672.
5. Bradford, C., Marshall, A. (1997) Ang II Signal Transduction in Vascular Smooth Muscle; Role of Tyrosine Kinases. Circulation Research; 80, 607-616,.
6. Meloche, S., Landry, J., Huot, J., Houle, F., Marceau, F., and Giasson, E. (2000) p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. Am J Physiol Heart Circ Physiol; 279, H741-751.
7. Abe, J., Berk, B. (1998) Reactive oxygen species as mediator of signal transduction in cardiovascular disease. Trends Cardiovasc Med; 8, 59-66.
8. Carman, C. V., Benovic, J. L. (1998) G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. Curr Opin Neurobiol; 8, 335-344.
9. Marrero, M. B., Schieffer, B., Li, B., Sun, J., Harp, J. B., Ling, B. N. (1997) Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. J Biol Chem; 272, 24684-24690.
10. Amiri, F., Venema, V. J., Wang, X., Ju, H., Venema, R. C., Marrero, M. B. (1999) Hyperglycemia enhances angiotensin II-induced janus-activated kinase/STAT signaling in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem; 274, 32382-32386.

11. Konishi, A., Berk, B. C. (2003) Epidermal growth factor receptor transactivation is regulated by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*; 278, 35049-35056.
12. Takahashi, T., Taniguchi, T., Konishi, H., Kikkawa, U., Ishikawa, Y., Yokoyama, M. (1999) Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*; 276, H1927-1934.
13. Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., Yin, Q., Fujio, Y., Walsh, K., Griendling, K. K. (1999) Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem*; 274, 22699-22704.
14. Hixon, M. L., Muro-Cacho, C., Wagner, M. W., Obejero-Paz, C., Millie, E., Fujio, Y., Kureishi, Y., Hassold, T., Walsh, K., Gualberto, A. (2000) Akt1/PKB upregulation leads to vascular smooth muscle cell hypertrophy and polyploidization. *J Clin Invest*; 106, 1011-1020.
15. Haider, U. G., Sorescu, D., Griendling, K. K., Vollmar, A. M., Dirsch, V. M. (2002) Resveratrol suppresses angiotensin II-induced Akt/protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*; 62, 772-777.
16. Haider, U. G., Roos, T. U., Kontaridis, M. I., Neel, B. G., Sorescu, D., Griendling, K. K., Vollmar, A. M., Dirsch, V. M. (2005) Resveratrol inhibits angiotensin II- and epidermal growth factor-mediated Akt activation: role of Gab1 and Shp2. *Mol Pharmacol*; 68, 41-48.
17. Olson, E. R., Naugle, J. E., Zhang, X., Bomser, J. A., Meszaros, J. G. (2005) Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 288, H1131-1138.
18. Çetin, A. (2005) Kültüre Edilmiş Rat Aortik Düz Kas hücrelerinde Anjiyotensin II Uyarımı ile p42/p44 MAPK (ERK-1/2) Fosforilasyonunda Fosfolipaz C ve Protein Kinaz C'nin Rolü. Prof. Dr. Akın Yeşilkaya, Akdeniz Üniversitesi, yüksek lisans tezi, Antalya.
19. Dzau, V. J. (1989) Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses, *J Hypertens* 7, 933-936.
20. Danser, A. H. (1996) Local renin-angiotensin systems. *Mol Cell Biochem*; 157, 211-216.
21. Hollenberg, N. K., Fisher, N. D., Price, D. A. (1998) Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension*; 32, 387-392.

22. Esther, C. R., Marino, E. M., Howard, T. E., Machaud, A., Corvol, P., Capeccchi, M. R., Bernstein, K. E. (1997) The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest*; 99, 2375-2385.
23. Naftilan, A. J. (1994) Role of the tissue renin-angiotensin system in vascular remodeling and smooth muscle cell growth. *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 3, 218-227.
24. Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S., Bernstein, K. E. (1991) Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*; 351, 233-236.
25. Kambayashi, Y., Bardhan, S., Takahashi, K., Tsuzuki, S., Inui, H., Hamakubo, T., Inagami, T. (1993) Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem*; 268, 24543-24546.
26. Chaki, S., Inagami, T. (1992) Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma neuro-2A cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 182, 388-394.
27. Swanson, G. N., Hanesworth, J. M., Sardinia, M. F., Coleman, J. K., Wright, J. W., et al. (1992) Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept*; 40, 409-419.
28. de Gasparo, M., Husain, A., Alexander, W., Catt, K. J., Chiu, A. T., et al. (1995) Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension*; 25, 924-927.
29. Berk, B. C., and Corson, M. A. (1997) Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res*; 80, 607-616.
30. Sadoshima, J. (1998) Versatility of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res*; 82, 1352-1355.
31. Zhuo, J., Moeller, I., Jenkins, T., Chai, S. Y., Allen, A. M., et al (1998) Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J Hypertens*; 16, 2027-2037.
32. Allen, A. M., Zhuo, J., and Mendelsohn, F. A. (2000) Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens*; 13, 31S-38S.
33. Nahmias, C., Strosberg, A. D. (1995) The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci*; 16, 223-225.

34. Katoh, Y., Periasamy, M. (1996) Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development. *Trends Cardiovasc Med*; 6, 100-106.
35. Berk, B. C., Vekshtein, V., Gordon, H. M., Tsuda, T. (1989) Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension*; 13, 305-314.
36. Touyz, R. M., Schiffrin, E. L. (1997) Angiotensin II regulates vascular smooth muscle cell pH, contraction, and growth via tyrosine kinase-dependent signaling pathways. *Hypertension*; 30, 222-229.
37. Ciuffo, G. M., Alvarez, S. E., Fuentes, L. B. (1998) Angiotensin II receptors induce tyrosine dephosphorylation in rat fetal membranes. *Regul Pept*; 74, 129-135.
38. Ross, R. (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*; 340, 115-126.
39. Weiss, D., Sorescu, D., Taylor, W. R. (2001) Angiotensin II and atherosclerosis. *Am J Cardiol*; 87, 25C-32C.
40. Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D., Alexander, R. W. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*; 74, 1141-1148.
41. Steinberg, D. (2002) Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med*; 8, 1211-1217.
42. Schmidt-Ott, K. M., Kagiya, S., Phillips, M. I. (2000) The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regul Pept*; 93, 65-77.
43. Geisterfer, A. A., Peach, M. J., Owens, G. K. (1988) Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res*; 62, 749-756.
44. Daemen, M. J., Lombardi, D. M., Bosman, F. T., Schwartz, S. M. (1991) Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res*; 68, 450-456.
45. Xi, X. P., Graf, K., Goetze, S., Fleck, E., Hsueh, W. A., Law, R. E. (1999) Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 19, 73-82.
46. Takagishi, T., Murahashi, N., Azagami, S., Morimatsu, M., Sasaguri, Y. (1995) Effect of angiotensin II and thromboxane A2 on the production of

matrix metalloproteinase by human aortic smooth muscle cells. *Biochem Mol Biol Int*; 35, 265-273.

47. Robinson, M. J., Cobb, M. H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*; 9, 180-186.
48. Treisman, R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*; 8, 205-215.
49. Takahashi, T., Kawahara, Y., Okuda, M., Ueno, H., Takeshita, A., Yokoyama, M. (1997) Angiotensin II stimulates mitogen-activated protein kinases and protein synthesis by a Ras-independent pathway in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*; 272, 16018-16022.
50. Ip, Y. T., Davis, R. J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*; 10, 205-219.
51. Liao, D. F., Monia, B., Dean, N., Berk, B. C. (1997) Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*; 272, 6146-6150.
52. Touyz, R. M., Berry, C. (2002) Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res*; 35, 1001-1015.
53. Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., Griendling, K. K. (1998) p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem*; 273, 15022-15029.
54. Saward, L., Zahradka, P. (1997) Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*; 81, 249-257.
55. Sandberg, E. M., Wallace, T. A., Godeny, M. D., VonDerLinden, D., Sayeski, P. P. (2004) Jak2 tyrosine kinase: a true jak of all trades?. *Cell Biochem Biophys*; 41, 207-232.
56. Schindler, C. W. (2002) Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest*; 109, 1133-1137.
57. Becker, S., Groner, B., Muller, C. W. (1998) Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature*; 394, 145-151.
58. McBride, K. M., McDonald, C., Reich, N. C. (2000) Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J*; 19, 6196-6206.
59. Ihle, J. N. (1995) Cytokine receptor signalling. *Nature*; 377, 591-594.

60. Srivastava, A. K. (2002) High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes (review). *Int J Mol Med*; 9, 85-89.
61. Clempus, R. E., Griendling, K. K. (2006) Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*; 71, 216-225.
62. Kamata, H., Hirata, H. (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*; 11, 1-14.
63. Haider, U. (2003) Resveratrol Attenuates Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy and Hyperplasia: Elucidation of Signalling Pathways, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
64. Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M. (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?. *Clin Biochem*; 30, 91-113.
65. Signorelli, P., Ghidoni, R. (2005) Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem*; 16, 449-466.
66. Henry-Vitrac, C., Desmouliere, A., Girard, D., Merillon, J. M., Krisa, S. (2006) Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur J Nutr*; 45, 376-382.
67. Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E., Jr., Walle, U. K. (2004) High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*; 32, 1377-1382.
68. Jannin, B., Menzel, M., Berlot, J. P., Delmas, D., Lancon, A., Latruffe, N. (2004) Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol*; 68, 1113-1118.
69. Das, D. K., Maulik, N. (2006) Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv*; 6, 36-47.
70. Delmas, D., Jannin, B., Latruffe, N. (2005) Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Nutr Food Res* 49, 377-395.
71. Sayın A, A. N., Güner G. (2008) Resveratrol ve Kardiyovasküler Sistem. *Türk j biochem*; 33, 117-121.

72. Cetin, A., Ozturk, O. H., Tokay, A., Akcit, F., Caglar, S., Yesilkaya, A. (2007) Angiotensin II-induced MAPK phosphorylation mediated by Ras and/or phospholipase C-dependent phosphorylations but not by protein kinase C phosphorylation in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Pharmacology*; 79, 27-33.
73. Cumbie, B. C., Hermayer, K. L. (2007) Current concepts in targeted therapies for the pathophysiology of diabetic microvascular complications. *Vasc Health Risk Mana*; 3, 823-832.
74. Szkudelski, T., Szkudelska, K. Anti-diabetic effects of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*; 1215, 34-39.
75. Su, H. C., Hung, L. M., Chen, J. K. (2006) Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 290, E1339-1346.
76. Marrero, M. B., Fulton, D., Stepp, D., Stern, D. M. (2005) Angiotensin II-induced signaling pathways in diabetes. *Curr Diabetes; Rev* 1, 197-202.
77. Kapor-Drezgic, J., Zhou, X., Babazono, T., Dlugosz, J. A., Hohman, T., Whiteside, C. (1999) Effect of high glucose on mesangial cell protein kinase C-delta and -epsilon is polyol pathway-dependent. *J Am Soc Nephrol*; 10, 1193-1203.
78. HB, H. (2000) Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int*; 58, S19-S25.
79. Haneda, M., Kikkawa, R., Sugimoto, T., Koya, D., Araki, S., Togawa, M., Shigeta, Y. (1995) Abnormalities in protein kinase C and MAP kinase cascade in mesangial cells cultured under high glucose conditions. *J Diabetes Complications*; 9, 246-248.
80. Shiojima, I., Walsh, K. (2002) Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*; 90, 1243-1250.
81. Wang, L., Zhu, L. H., Jiang, H., Tang, Q. Z., Yan, L., Wang, D., Liu, C., Bian, Z. Y., Li, H. Grape seed proanthocyanidins attenuate vascular smooth muscle cell proliferation via blocking phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling pathways. *J Cell Physiol*; 223, 713-726.
82. Ali, M. S., Sayeski, P. P., Dirksen, L. B., Hayzer, D. J., Marrero, M. B., Bernstein, K. E. (1997) Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem*; 272, 23382-23388.

83. El-Mowafy, A. M., White, R. E. (1999) Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects. *FEBS Lett*; 451, 63-67.
84. Poussier, B., Cordova, A. C., Becquemin, J. P., Sumpio, B. E. (2005) Resveratrol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and induces apoptosis. *J Vasc Surg*; 42, 1190-1197.
85. Mnjoyan, Z. H., Fujise, K. (2003) Profound negative regulatory effects by resveratrol on vascular smooth muscle cells: a role of p53-p21(WAF1/CIP1) pathway. *Biochem Biophys Res Commun*; 311, 546-552.
86. Cheng, T. H., Liu, J. C., Lin, H., Shih, N. L., Chen, Y. L., Huang, M. T., Chan, P., Cheng, C. F., Chen, J. J. (2004) Inhibitory effect of resveratrol on angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*; 369, 239-244.
87. Li, T., Wang, W. (2008) Regulatory effect of resveratrol on JAK1/STAT3 signal transduction pathway in leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*; 16, 772-776.
88. Süleymanlar, G., Utaş, C., Arinsoy, T., ve ark. (2011) A population-based survey of Chronic RENal Disease In Turkey—the CREDIT study. *Nephrol Dial Transplant* 26: 1862–1871.

ÖZGEÇMİŞ

Arzu ÇETİN, 11.11.1979 yılında İZMİR'in Urla ilçesinde doğdu. İlkokul öğrenimini 1990 yılında Barbaros Köyü İlkokulunda, orta öğrenimini 1993 yılında ve lise öğrenimini 1996 yılında Urla Lisesinde, yüksek öğrenimini 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2002-2005 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimi gördü. 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı'nda, Doktora öğrenimine başladı. 2003-2010 yılları arasında Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. 2010 yılında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarına Biyolog kadrosuyla naklen atandı ve halen çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir.

EKLER

Angiotensin II-Induced MAPK Phosphorylation Mediated by Ras and/or Phospholipase C-Dependent Phosphorylations but Not by Protein Kinase C Phosphorylation in Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells

Arzu Çetin O. Hasan Öztürk Alper Tokay Ferhat Akçit Serkan Çağlar
Akın Yeşilkaya

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey

Key Words

Phospholipase C • Protein kinase C • Angiotensin II • p42/p44 MAPK

Abstract

Angiotensin II (Ang II) induces a rapid increase in mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity through the Ang II type 1 receptor in cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMCs). In the present study, we examined the effects of the phospholipase C (PLC) inhibitor U73122, the protein kinase C (PKC) inhibitor GF109203X, and the Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid (FTS) on Ang II-induced activation of p42/p44 MAPKs in cultured VSMCs. Phosphorylation was shown using the Western blot technique with specific phospho-antibodies against MAPK proteins. The PLC inhibitor U73122 abolished the Ang II-induced MAPK activity, while the PKC inhibitor GF109203X only decreased it. There was also an inhibition observed with the Ras inhibitor, FTS on Ang II-induced MAPK activity. These data suggest that Ang II-induced MAPK phosphorylation through the Ang II type 1 receptor could be mediated by Ras and/or PLC-dependent phosphorylations but not by PKC phosphorylation.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

Introduction

Angiotensin II (Ang II) is an important growth factor and chemoattractant molecule for vascular smooth muscle cells (VSMCs). These characteristics implicate a role for Ang II in the development of restenosis, atherosclerosis, and hypertension. Although there are at least four Ang II receptor subtypes, the stimulation of growth and migration by Ang II in VSMCs is mediated by signal transduction through the Ang II type 1 (AT1) receptor [1, 2]. This receptor is a member of the superfamily of G protein-coupled receptors that contain 7 transmembrane helices [3, 4]. In cultured rat VSMCs, AT1 activation by Ang II is initiated by stimulation of a phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC), leading to the generation of inositol trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG) [5], which are involved in intracellular Ca²⁺ mobilization [6] and protein kinase C (PKC) activation [7], respectively.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), also known as extracellular signal-regulated kinases, are a family of protein-serine/threonine kinases that are believed to function as integrators for mitogenic signals originating from several distinct classes of cell surface

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2007 S. Karger AG, Basel
0031-7012/07/0791-0027\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/pha

Akın Yeşilkaya, PhD
Department of Biochemistry
School of Medicine, Akdeniz University
TR-07070 Arapsuyu, Antalya (Turkey)
Tel. +90 242 249 6894, Fax +90 242 227 4495, E-Mail yesilkaya@akdeniz.edu.tr

receptors, such as receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors [8, 9]. In their activated forms, p44 MAPK (ERK1) and p42 MAPK (ERK2) transmit extracellular stimuli by phosphorylating a variety of substrates including transcriptional factors and kinases [10]. MAPKs are activated by phosphorylation of both threonine and tyrosine residues [11] catalyzed by a MAPK kinase [12] also known as MEK. MEK is in turn regulated by serine phosphorylation by several MAPK kinase kinases, including Raf-1 [13, 14]. The adapter protein Grb2 links the tyrosine-phosphorylated receptor to Sos, which acts as a guanine nucleotide exchange factor for p21ras [15], and the active GTP-bound p21ras stimulates Raf-1 kinase activity toward MEK [16, 17]. However, the pathway originating from G protein-coupled receptors in the activation of MAPK is not clearly defined. Earlier reports proposed a dominant role of PKC in the mechanism of Ang II-mediated MAPK activation in VSMCs [18, 19], whereas more recent studies have indicated that Ang II can activate MAPK in cardiac fibroblasts by PKC-dependent pathway [20, 21]. This study aimed to investigate whether or not PLC or PKC activation have a role in MAPK phosphorylation after stimulation with Ang II in cultured VSMCs.

Experimental Procedures

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal calf serum, HEPES, elastase, collagenase, L-glutamine, penicillin-streptomycin and Ang II were obtained from Sigma. U73122, GF109203X (GFX), and farnesylthiosalicylic acid (FTS) were purchased from Calbiochem. The AT1 receptor antagonist losartan was a generous gift of Merck, Sharp & Dohme. Monoclonal anti-phospho-ERK1/2 antibodies were purchased from Sigma. Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG secondary antibodies were obtained from Sigma.

Isolation and Primer Culture of Rat VSMCs

VSMCs were isolated from the thoracic aorta of male Wistar rats (250–350 g) as described previously [22]. VSMCs were grown in DMEM mixture supplement with 10% (v/v) fetal calf serum, 100 IU/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. VSMCs between passages 3 and 10 were used in the experiments and showed 99% positive immunostaining against smooth muscle α -actin antibody (Sigma). For all experiments, cells at 80% confluence in culture wells were made quiescent by incubation with serum-free DMEM for 1 day.

Immunoblotting

VSMCs were stimulated with agonists and antagonists at 37°C in serum-free DMEM for specified durations. The reaction was terminated by the replacement of medium with ice-cold lysis

buffer, pH 7.5, containing 50 mmol/l HEPES, 50 mmol/l NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1.5 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l EDTA, 10 mmol/l sodium pyrophosphate, 1 mmol/l Na₃VO₄, 100 mmol/l NaF, 30 mmol/l 2-(*p*-nitrophenyl) phosphate, 1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg/ml leupeptin, and 10 mg/ml aprotinin. After sonication (10 s), the samples were centrifuged at 14,000 rpm (+4°C for 30 min). The supernatant was mixed in Laemmli sample buffer and approximately 5–10 µg of protein/lane were loaded for resolution via SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell). After blocking with 5% milk, the membrane was incubated overnight at 4°C with 1:5,000 dilution of mouse monoclonal anti-phospho-ERK1/2 antibody. Blots were probed with a 1:4,000 dilution of anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugated as secondary antibody. Immunoreactive proteins were detected by enhanced chemiluminescence reagent (Bio-Rad).

Data Analysis

Blots were analyzed using Scion Image software (Ver. 4.0.2 beta) and each blot is representative of at least 5 experiments. Column graphs were presented as means $\pm$ SEM.

Results

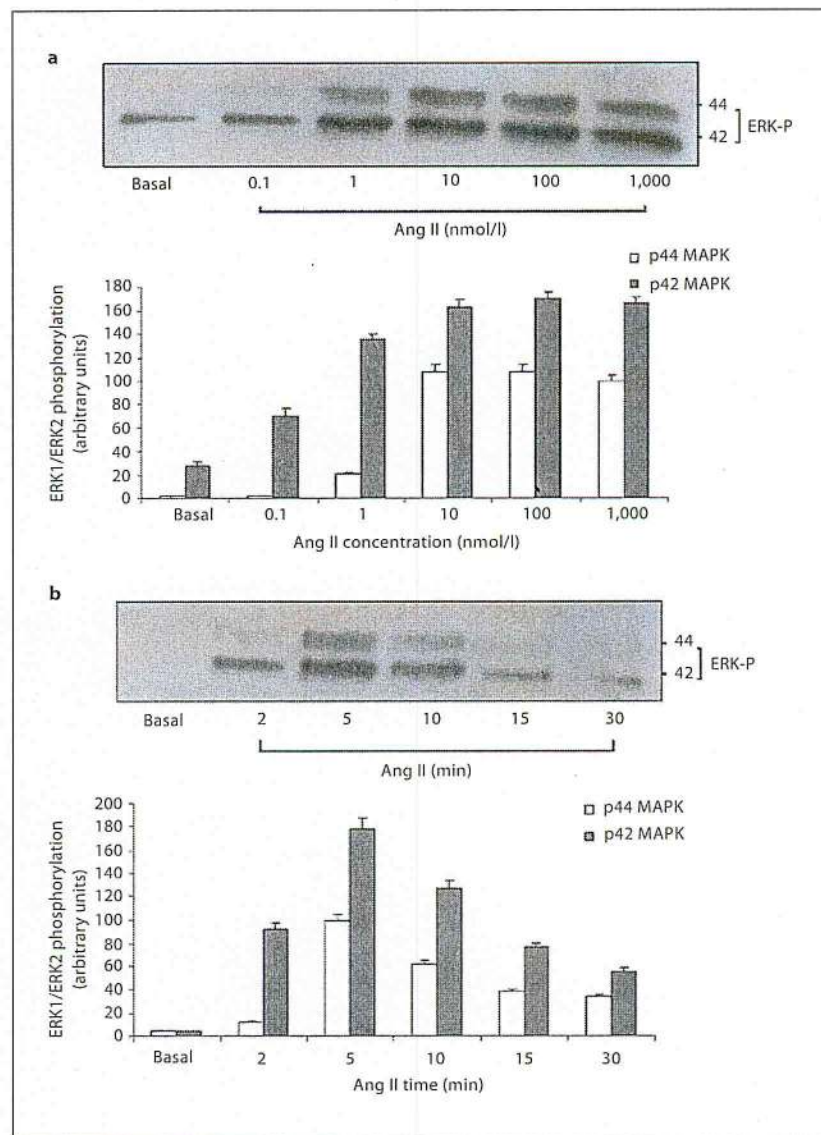
Ang II Stimulation Leads to MAPK Activation

The MAPK activation was dependent on the concentration of Ang II (fig. 1a); increased phosphorylation was detectable at 0.1 nmol/l and maximal at 100 nmol/l within 5 min incubation with Ang II. Although there was no significant difference among 10–1,000 nmol/l of applied Ang II concentrations, we used 100 nmol/l concentrations as the best-detected spot pointing to MAPK phosphorylation. In cultured rat VSMCs, the Ang II induced (100 nmol/l) MAPK activation, reaching a peak within 5 min (fig. 1b). Therefore, subsequent MAPK experiments were performed with 100 nmol/l Ang II stimulation for 5 min.

AT1 Receptor Stimulation Leads to MAPK Activation

In previous studies with VSMCs, it was reported that MAPK phosphorylation inhibits by the AT1 receptor antagonist, losartan [23]. In this study, we investigated the effects of losartan after 10 and 30 min at a concentration of 10⁻⁵ mol/l. Results of this experiment showed that the best inhibition of MAPK phosphorylation is observed at 10 min of incubation with losartan. MAPK phosphorylation by Ang II was markedly inhibited by 10⁻⁵ mol/l losartan concentration (fig. 2), indicating that Ang II-induced MAPK phosphorylation is mainly mediated by the AT1 receptor in VSMCs.

Fig. 1. a Effects of different concentrations of Ang II on p42/p44 MAPK in VSMCs. VSMC cultures were stimulated with different Ang II concentrations for 5 min and ERK1/ERK2 phosphorylations were observed. The best p42/p44 MAPK-activating Ang II concentration was found to be 100 nmol/l. **b** Time course of Ang II-induced activation of p42/p44 MAPK in VSMCs. Cells were incubated with 100 nmol/l of Ang II in different periods of time shown above and p42/p44 phosphorylations were observed. 5 min of incubation time was shown to be the effective period for Ang II-induced MAPK phosphorylation. Top: Representative example for immunoblotting. Bottom: MAPK phosphorylation as arbitrary units. The MAPK phosphorylation was determined as described under Experimental Procedures. Blots shown are representative of five separate experiments.



Ang II-Induced MAPK Activation Requires PLC Activation

AT1 receptors have been reported to be coupled with either Gq or Gi, which activates PI-PLC or inhibits adenylyl cyclase, respectively [24, 25]. To determine which G protein-mediated signaling is involved in the MAPK activation, the effects of the specific PI-PLC inhibitor U73122 [26] on Ang II-induced MAPK activation were studied in VSMCs. The concentration and the estimated times of U73122 were taken from the study done by Egu-

chi et al. [27]. U73122 (10 μ mol/l, 30 min) inhibited Ang II-induced tyrosine phosphorylation of p42/p44 MAPK in VSMCs (fig. 3).

Roles of PKC in Ang II-Induced MAPK Activation

In cultured VSMCs, PI-PLC activation by Ang II leads to the production of two secondary messengers, IP₃ and DAG [5], that induce the release of Ca²⁺ from intracellular stores [6] and PKC activation [7]. On the other hand, it was shown in some studies that PKC activation is inde-

Fig. 2. AT1 receptor stimulation leads to MAPK activation. VSMCs were incubated with 10^{-5} mol/l concentration of the AT1 receptor antagonist losartan (Los.) for 10 and 30 min, respectively, and then the cells were stimulated with 100 nmol/l Ang II for 5 min. The 10-min losartan incubation period was found to be more effective in the indicated concentration. Top: Representative example for immunoblotting. Bottom: MAPK phosphorylation as arbitrary units. The MAPK phosphorylation was determined as described under Experimental Procedures. Blots shown are representative of five separate experiments.

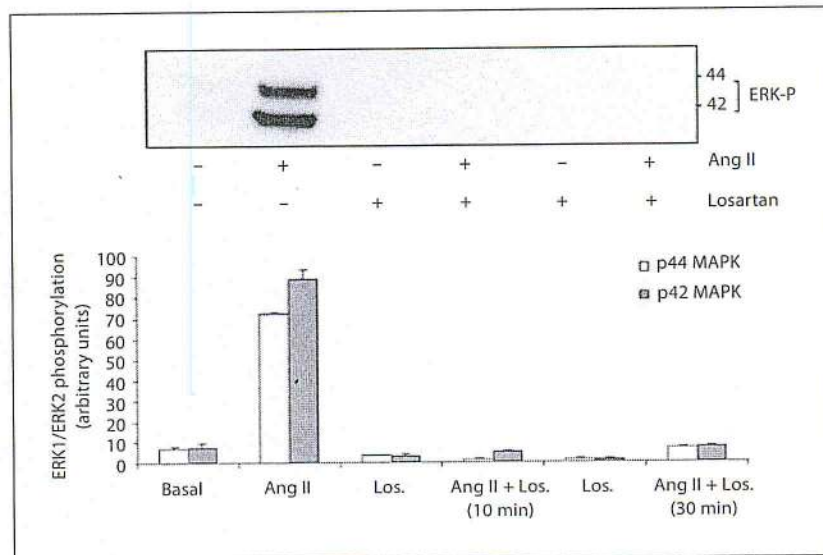
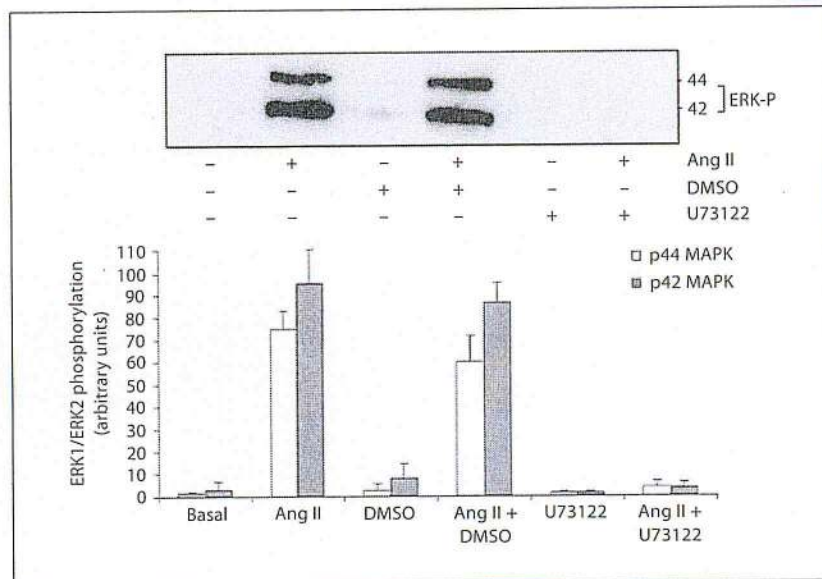


Fig. 3. Effects of U73122 on Ang II-induced p42/p44 MAPK activation in cultured VSMCs. VSMCs were pretreated with 10 μ mol/l concentrations of the PI-PLC inhibitor U73122 for 30 min and stimulated with Ang II (100 nmol/l) for 5 min. Controls of DMSO and U73122 are also shown. Top: Representative example for immunoblotting. Bottom: MAPK phosphorylation as arbitrary units. The MAPK phosphorylation was determined as described under Experimental Procedures. Blots shown are representative of five separate experiments.



pendent of Ang II-induced MAPK activation [28] but some researchers have been defending the opposite interpretation [27]. Therefore, we further examined the effect of the specific PKC inhibitor GFX (2 μ mol/l, 30 min) [27] on Ang II-induced MAPK activation in VSMCs. GFX-sensitive inhibition of PKC caused a significant decrease in MAPK activation whereas this decrease could not be observed in the basal level (fig. 4).

Roles of PLC and PKC Inhibition in Ang II-Induced MAPK Activation

We studied Ang II-induced MAPK activation in the presence of PLC and PKC inhibitors in VSMCs. Cells were incubated with U73122 (10 μ mol/l, 30 min) and GFX (2 μ mol/l, 30 min) at the same time, and ERK1/ERK2 phosphorylations were observed. We saw that MAPK phosphorylation was completely restrained after incubating the cells with both inhibitors (fig. 5).

Fig. 4. Effects of GFX on Ang II-induced p42/p44 MAPK activation in cultured VSMCs. VSMCs were pretreated with 2 μ mol/l concentrations of the specific PKC inhibitor GFX for 30 min and stimulated with Ang II (100 nmol/l) for 5 min. DMSO and GFX controls are also shown. Top: Representative example. Bottom: MAPK phosphorylation as arbitrary units. The MAPK phosphorylation was determined as described under Experimental Procedures. Blots shown are representative of five separate experiments.

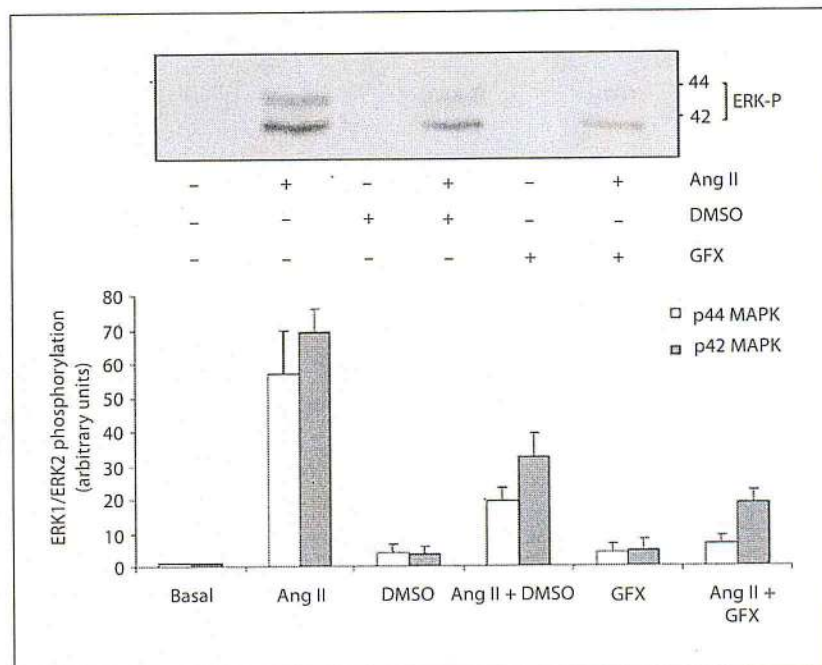
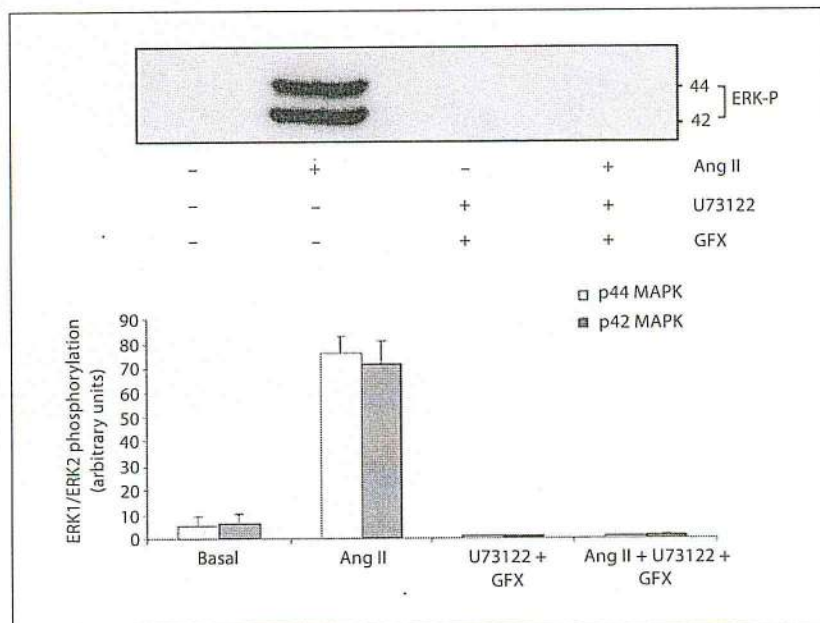


Fig. 5. Effects of U73122 and GFX on Ang II-induced p42/p44 MAPK activation. VSMCs were incubated with U73122 (10 μ mol/l, 30 min) and GFX (2 μ mol/l, 30 min) and then stimulated with Ang II (100 nmol/l) for 5 min. Top: Representative example. Bottom: MAPK phosphorylation as arbitrary units. The MAPK phosphorylation was determined as described under Experimental Procedures. Blots shown are representative of five separate experiments.

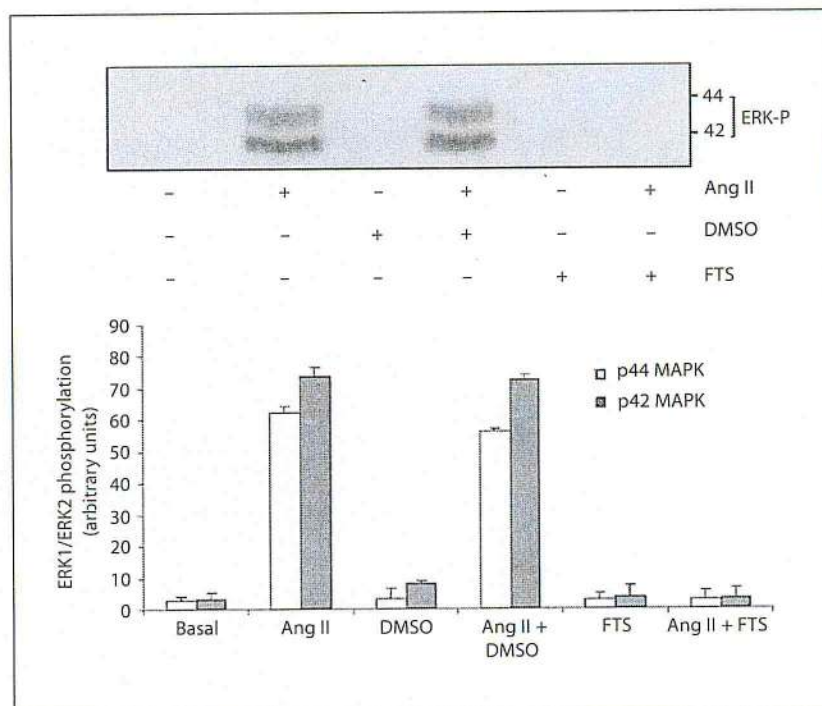


Effects of Ras on Ang II-Induced MAPK Activation

In recent studies, an isoform of PKC- ζ has been shown to pave the pathway of MAPK activation through Raf-1 [29]. Therefore, we observed the effect of Ras inhibition,

an upstream protein of Raf-1, through MAPK activation in the presence of PLC and PKC. We observed that Ang II-induced MAPK activation was completely restrained with the Ras inhibitor, FTS (10 nmol/l, 24 h) (fig. 6).

Fig. 6. Effects of FTS on Ang II-induced p42/p44 MAPK activation in cultured VSMCs. VSMCs were inhibited with 10 nmol/l concentrations of the Ras inhibitor FTS for 30 min and stimulated with Ang II (100 nmol/l) for 5 min. DMSO and FTS controls are also shown. Top: Representative example. Bottom: MAPK phosphorylation as arbitrary units. The MAPK phosphorylation was determined as described under Experimental Procedures. Blots shown are representative of five separate experiments.



Discussion

The signaling mechanism leading to MAPK activation from heterotrimeric G protein-coupled receptors has not been clearly defined yet. In this study, we proposed a novel signaling pathway from AT1 to the MAPK cascade involving p21ras activation mediated by PLC and PKC. We further showed that Ang II-induced MAPK activation was suppressed by the PI-PLC inhibitor, U73122. Although the precise site of the action of U73122 is unclear, previous studies suggest that it may be at the level of Gq or at the link between G protein and the effector enzyme [30]. Ang II-induced MAPK activation was PI-PLC-dependent in VSMCs. It has been proposed that a Gq-coupled receptor can activate MAPK through PKC activation [31, 32]. PKC is known to activate MAPK presumably by directly phosphorylating Raf-1 [33]. Since the present study emphasized these facts and Ang II has been shown to stimulate PKC activity in VSMCs through PI-PLC activation [5, 34], Ang II could activate the Raf-1-MAPK system by activated PKC. In this study, it is also shown that in case of inhibiting Ras, upstream of Raf-1, with FTS, MAPK phosphorylation is oppressed. In addition, we found that the PKC inhibitor GFX, which has been

shown to inhibit PKC- α , PKC- β I, PKC- β II, and PKC- γ [35], had no significant effect on MAPK activation by Ang II. However, we cannot exclude the possibility that GFX and isoforms of PKC, such as PKC- ζ [36], may play a role in Ang II-induced activation of MAPK.

In conclusion, for Ang II-induced MAPK activation in VSMCs, PLC and Ras-dependent pathways are essentially needed, whereas PKC is partly effective. Thus, investigating all downstream pathways of Ang II-stimulated MAPK activation can make us understand pathologies like vascular remodeling and atherosclerosis and the mechanisms laying behind them.

Acknowledgments

This work was supported in part by funding from the Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi, Project No. 2003.02.0122.05.

We thank Şakir Atalay and Erol Nizamoğlu for their collaboration and support.

References

- 1 Duff JL, Berk BC: Angiotensin II-mediated signal transduction events in vascular smooth muscle cells: kinases and phosphatases. *Blood Press* 1995;2(suppl):55-60.
- 2 Berk BC, Corson MA: Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* 1997;80:607-617.
- 3 Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE: Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 1991;351:233-236.
- 4 Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T: Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin-II type-1 receptor. *Nature* 1991;351:230-233.
- 5 Griendling KK, Rittenhouse SE, Brock TA, Ekstein LS, Gimbrone MA, Alexander RW: Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1986;261:5901-5906.
- 6 Berridge MJ: Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 1987;56:59-193.
- 7 Nishizuka Y: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988;351:662-665.
- 8 Blenis J: Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5889-5892.
- 9 Cobb MH, Goldsmith EJ: How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 1995;270:14843-14846.
- 10 Davis RJ: The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993;268:14553-14556.
- 11 Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW: Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 1990;343:651-653.
- 12 Seger R, Ahn NG, Posada J, Munar ES, Jensen AM, Cooper JA, Cobb MH, Krebs EG: Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem* 1992;267:14373-14381.
- 13 Kyriakis JM, App H, Zhang X, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J: Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 1992;358:417-421.
- 14 Howe LR, Leever SJ, Gomez N, Nakielnny S, Cohen P, Marshall CJ: Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 1992;71:335-342.
- 15 McCormick F: Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* 1993;363:15-16.
- 16 Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A: Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase. *Science* 1993;260:1658-1661.
- 17 Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA: Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 1993;74:205-214.
- 18 Molloy CJ, Taylor DS, Weber H: Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993;268:7338-7345.
- 19 Tsuda T, Kawahara Y, Ishida Y, Koide M, Shii K, Yokoyama M: Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1992;71:620-630.
- 20 Booz GW, Dostal DE, Singer HA, Baker KM: Involvement of protein kinase C and Ca²⁺ in angiotensin II-induced mitogenesis of cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 1994;267:C1308-C1318.
- 21 Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S: Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca (2+)-dependent signaling. *Circ Res* 1995;76:1-15.
- 22 Gunter S, Alexander W, Atkinson WJ, Gimbrone MA: Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cell. *J Cell Biol* 1982;92:289-298.
- 23 Papakonstantinou E, Roth M, Kokkas B, Papadopoulos C, Karakioulakis G: Losartan inhibits the angiotensin II-induced modifications on fibrinolysis and matrix deposition by primary human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:715-728.
- 24 Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD: Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993;45:205-251.
- 25 Ohnishi J, Ishido M, Shibata T, Inagami T, Murakami K, Miyazaki H: The rat angiotensin II AT1A receptor couples with three different signal transduction pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;186:1094-1101.
- 26 Smith RJ, Sam LM, Justen JM, Bundy GL, Bala GA, Bleasdale JE: Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:688-697.
- 27 Eguchi S, Matsumoto T, Motley ED, Utsonomiya H, Inagami T: Identifications of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271:14169-14175.
- 28 Assender JW, Irenius E, Fredholm BB: 5-Hydroxytryptamine, angiotensin and bradykinin transiently increase intracellular calcium concentrations and PKC alpha activity, but do not induce mitogenesis in human vascular smooth muscle cells. *Acta Physiol Scand* 1997;160:207-217.
- 29 Chao T, Foster DA, Rapp UR, Rosner MR: Differential Raf requirement for activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors, phorbol esters, and calcium. *J Biol Chem* 1994;269:7337-7341.
- 30 Yule D, Williams JA: U73122 inhibits Ca²⁺ oscillations in response to cholecystokinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 1992;267:13830-13835.
- 31 Faure M, Voyno-Yasenetskaya TA, Bourne HR: cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem* 1994;269:7851-7854.
- 32 Hawes BE, van Biesen T, Koch WJ, Luttrell LM, Lefkowitz RJ: Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 1995;270:17148-17153.
- 33 Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenceller G, Marne D, Rapp U: Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 1993;364:249-251.
- 34 Lang U, Vallotton M: Effects of angiotensin II and of phorbol ester on protein kinase C activity and on prostacyclin production in cultured rat aortic smooth-muscle cells. *Biochem J* 1989;259:477-484.
- 35 Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamel L, Charon D, Kirilovsky J: The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991;266:15771-15781.
- 36 Nakanishi H, Exton H: Purification and characterization of the zeta isoform of protein kinase C from bovine kidney. *J Biol Chem* 1992;267:16347-16354.