

1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

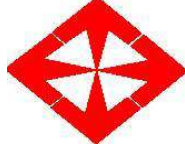
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**SIÇANLARDA HAREKET KISITLAMA STRESİNİN
TORASİK AORTANIN YAPI ve İŞLEVLERİNDE OLUŞTURDUĞU
GLİKASYON/LİPOKSİDASYON-TEMELLİ DEĞİŞİKLİKLER
ÜZERİNE DOKSİSİKLİNİN DOZLA İLİŞKİLİ ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ulya KESKİN

Ankara 2014



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**SIÇANLARDA HAREKET KISITLAMA STRESİNİN
TORASİK AORTANIN YAPI ve İŞLEVLERİNDE OLUŞTURDUĞU
GLİKASYON/LİPOKSİDASYON-TEMELLİ DEĞİŞİKLİKLER
ÜZERİNE DOKSİSİKLINİN DOZLA İLİŞKİLİ ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ulya KESKİN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ş. Remzi Erdem

Ankara 2014

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
(Proje No: DA 13/12).

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve emeklerini esirgemedi sunan, sonsuz sabır ve sevgileriyle yolumu aydınlatan saygıdeğer hocalarım; tez çalışmamın gerçekleşmesinde hiçbir desteği esirgemeyen, her zaman bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Meral Tuncer'e, bana bilimsel çalışma ilkelerini kazandıran, farmakolojiyi sevdiren, tez danışmanım Prof. Dr. Ş. Remzi Erdem'e, eğitimim yanı sıra yaşamın her alanında da desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Müge Tecder-Ünal'a, tüm sorularıma ve sorunlarıma bıkmadan çözüm bulan, tez çalışmam boyunca motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Tolga Reşat Aydos'a ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Asistanlık dönemim boyunca her türlü katkı ve desteği gönülden verdiklerini bildiğim, kardeşten öte dostlarım, Dr. Pınar Ayran Fidan, Dr. Oğuzhan Ekin Efe, Biol. Seda Kurşunlu ve Biol. Erkan Ermiş'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca sağladıkları katkı ve destek için, Prof. Dr. Attila Dağdeviren, Dr. Fatma Helvacıoğlu, Prof. Dr. E. Suna Türkoğlu, Dr. Eda Özturan-Özer, Yrd. Doç. Dr. Nilüfer Bayraktar, Doç. Dr. Erhan Kızıltan, Prof. Dr. F. Belgin Ataç, Dr. Hasibe Verdi, Doç. Dr. A. Canan Yazıcı, Dr. M. Agah Tekindal, Prof. Dr. Turgay Dalkara, Prof. Dr. Yasemin Gürsoy Özdemir, Uzm. Biol. Sevda Lüle'ye teşekkürü borç bilirim.

Evimden ayrı geçirdiğim son bir yılda sağladıkları sosyal imkanlar nedeniyle sayın hocalarım Başkent Üniversitesi Rektörü Prof. Dr. Ali Haberal ve Tıp Fakültesi Dekanı Prof. Dr. İ. Haldun Müderrisoğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerin gerçekleştirilmesi aşamasında yeri doldurulmaz teknik destek sağlayan Lab. Vet. Teknik. Adem Kurtçuoğlu ve Lab. Vet. Teknik. Sezai Kölcük'e çok teşekkür ederim.

Beni yetiştirip her zaman yanımda olan sevgili anneme ve babama, her türlü zorlukta en büyük desteği sağlayan sevgili eşime ve anneleri ile geçiremedikleri zamanlarda küçük kalplerindeki sabır için, canım yavrularım Ulukan ve Elif Beste'ye çok teşekkür ederim.

ÖZET

Keskin U.

Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık için hazırlanmıştır, Ankara, 2014.

Doksisiklin matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerini inhibe eder. MMP'ler ekstraselüler matrikste çeşitli proteinlerin yıkımına yol açan, çeşitli hastalık ve durumlarda etkili rolleri olan enzimlerdir. Doksisiklin aynı zamanda sistemik ve vasküler oksidatif stresi de azaltır.

Doksisiklinin yüksek kan glikozunun protein, lipoprotein ve/veya nükleik asitlerle *non-enzimatik* glikasyonunu engelleyerek ileri glikasyon son ürünleri (AGE; *Advanced Glycation Endproducts*)'nin oluşumunu azaltır. Karboksimetillizin (CML) AGE ve ileri lipoperoksidasyon son ürünleri (ALE) yolağının ortak son ürünlerindendir. CML oluşumunun, diyabet (DM), yaşlanma, hiperlipidemi, sigara içme, hipertansiyon, inflamasyon, Alzheimer gibi hastalıklarla da ilişkili olduğu bilinmektedir.

Doksisiklin hücreyi stres ve apoptozise karşı korur.

Stres hormonları hiperglisemik hormonlardır. Hiperglisemi oksidatif stresi tetikler. Biyokimyasal kökenli olan tüm stresler gibi davranışsal stres de oksidan hasara sebep olur. Hareket kısıtlama stresi dislipidemi, karbonhidrat metabolizmasında bozukluk, nitrik oksit (NO) üretiminde azalma, ateroskleroz ve antioksidan durumda dengesizlik sonucu oksidan hasara yol açar.

Kronik strese maruziyetin de oksidatif stresi artırarak lipit peroksidasyonunu artırması, yol açacağı yüksek kan şekeri düzeyleriyle protein glikasyonunu artırması ve sonuçta AGE ve ALE düzeylerini yükseltmesi beklenir. Bu durumda, doksisiklin, hareket kısıtlaması stresine maruz kalmış sıçanlarda oksidatif hasara ve protein glikasyonuna karşı koruyucu olacaktır.

Bu çalışma, davranışsal stresin, kardiyovasküler sistemde ileri glikasyon ve lipoperoksidasyon son ürünlerinin birikimi ile sonuçlanıp sonuçlanmadığını yapısal ve işlevsel olarak ortaya koymak ve bu süreçte doksisiklinin doza bağımlı koruyucu etkisini belirlemek amacı ile 48 adet erkek *Sprague Dawley* sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Sıçanların vücut ağırlıkları (VA), kan şekeri ve HbA1c düzeyleri değerlendirildi. İzole torasik aorta preperatları endotel ve düz kas işlevleri açısından izole organ banyosu sisteminde değerlendirildi. MMP aktiviteleri jelatin zimografi yöntemi ile ölçüldü. Oksidan/anti-oksidan durum belirteci olarak glutatyon ve malondialdehit derişimleri

saptandı. İmmunohistokimyasal boyama ile AGE/ALE varlığı, apoptozis, anjiyogenez değerlendirildi. Uygulamaların davranışlar üzerine etkisini belirlemek için Açık Alan ve Yükseltilmiş Artı Labirent testleri uygulandı.

Kronik stres uygulaması VA kaybına yol açtı. Akut stres kan şekeri değerlerini artırdı. Yapılan uygulamalar, glikasyonu artırmamaları nedeniyle HbA1c değerlerini değıştirmede. Kronik stres, sıçan izole torasik aortalarında endotel hasarı yanında düz kasta gevşemeyi artırıcı bir etki yarattı. Bu etki üzerinde doksisisiklin 15 mg/kg/gün dozunda koruyucu olurken, 30 mg/kg/gün dozunda ise stres ile benzer etkiler oluşturdu. Doksisisiklin 30 mg/kg/gün uygulaması genel olarak stres ile aynı yönde etki gösterdi. Düşük doz doksisisiklinin anti-oksidan, yüksek doz doksisisiklinin ise oksidan etki eğiliminde olduğu saptandı. Kronik stres proMMP-2 ve MMP-9 aktivitelerini artırdı. Doksisisiklinin her iki dozu MMP-2 aktivitesini inhibe etti. Yapılan davranış testleri ile stres uygulamalarının anksiyete eğilimini artırdığı 15 mg/kg/gün dozunda doksisisiklin uygulamasının ise anksiyeteye karşı koruyucu eğilim oluşturduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: Doksisisiklin, hareket kısıtlama stresi, aorta, karboksimetillizin, matriks metalloproteinazlar.

ABSTRACT

Keskin U.

**Baskent University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology,
Thesis Prepared for the Speciality Degree in Medicine, Ankara, 2014.**

Doxycycline inhibits matrix metalloproteinase (MMP) enzymes. MMPs are effective enzymes that play role in some diseases and situations and cause degradation of certain proteins in extracellular matrix. On the other hand, doxycycline decreases systemic and vascular oxidative stress.

Doxycycline also prevents non-enzymatic glycation of high blood glucose with proteins, lipoproteins and/or nucleic acids to result in a decrease in glycation end products (AGE; Advanced Glycation End-products). Carboxymethyl lysine (CML) is one of the common end products of AGE and Advanced Lipoperoxidation End-products (ALE) pathways. CML production is known to associate with diabetes, aging, hyperlipidemia, smoking, hypertension, inflammation and disease like Alzheimer. Doxycycline protects cell against stress and apoptosis.

Stress hormones are hyperglycemic hormones. Hyperglycemia triggers oxidative stress. As all of the biochemical stresses, behavioral stress also leads to oxidant damage. Restrain stress causes oxidant damage as a result of dislipidemia, defect in carbohydrate metabolism, decrease in nitric oxide (NO) production, atherosclerosis and imbalance in antioxidant state.

It is expected from chronic stress to increases lipid peroxidation by increasing oxidative stress and to causes protein glycation via elevating blood glucose level to result in increased AGE and ALE levels. Thus doxycycline is expected to be protective against oxidative damage and protein glycation in rats exposed to restrain stress.

This study was performed in 48 male Sprague Dawley rats to investigate whether behavioral stress results in the accumulation of AGE and ALE in the cardiovascular system by structurel and functional and also to examine that whether doxycycline exerts protective effects against this process. Mean body weights of the rats, blood glucose and HbA1c levels were evaluated. Isolated thoracic aort preperations were evaluated in the isolated organ bath system for endothelium - and smooth muscle - related functions. MMP

activities were determined by gelatin zymography. As an indicator of oxidant/antioxidant status, glutation and malondialdehyde levels were determined. The presence of AGE/ALE, apoptosis and angiogenesis were evaluated by immunohistochemical staining. In order to determine effects of applications on the behaviour, Open Field and Elevated Plus Maze tests were used.

Chronic stress caused body weight loss. Acute stress increased blood glucose levels. However HbA1c levels did not change. Chronic stress, caused not only endothelial damage on rat isolated thoracic aorta preparations but also lead to augmentation of the relaxant mechanism(s) in the smoot muscle. Doxycycline was found to be protective at 15 mg/kg/day dose against this effect but to cause stress-like effects at the dose of 30 mg/kg/day seen. Low dose doxycycline extented anti-oxidant but high dose doxycycline showed oxidant effects. Chronic stress increased proMMP-2 and MMP-9 activities. Both doses of doxycycline inhibited MMP-2 activity. By the help of behavioural findings, stress seemed to cause tendency to anxiety and doxycycline exented anxiolytic-like effects at 15 mg/kg/day dose.

Key words: Doxycycline, restraint stress, aorta, carboxymethyl lysine, matrix metalloproteinase.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
Teşekkür.....	iii
Özet.....	iv
İngilizce özet.....	vi
İçindekiler dizini.....	viii
Kısaltmalar ve simgeler dizini.....	xii
Şekiller dizini.....	xiv
Tablolar dizini	xvii
1. Giriş	1
1. 1. Rasyonel.....	3
1. 2. Hipotezler.....	4
1. 3. Amaç.....	4
2. Genel bilgiler.....	5
2. 1. Doksisiklin Hidroklorür.....	5
2. 1. 1. Fizikokimyasal Özellikleri.....	5
2. 1. 2. Farmakokinetik Özellikleri.....	5
2. 1. 3. Doksisiklinin Antibiyotik Dışı Etkileri.....	6
2. 1. 3. 1. MMP İnhibisyonu.....	6
2. 1. 3. 2. Antioksidan Etki.....	7
2. 1. 3. 3. Anjiyogenez Üzerine Etkiler	7
2. 1. 3. 4. Apoptozis Üzerine Etkiler.....	8
2. 2. Matriks Metalloproteinazlar.....	9

2. 3. İleri Glikasyon Son Ürünleri.....	11
2. 4. İleri Lipoksidasyon Son Ürünleri.....	12
2. 4. 1. İleri Lipoksidasyon Son Ürünlerinin Temeli.....	12
2. 4. 2. İleri Lipoksidasyon Son Ürünleri Oluşumu	14
2. 4. 2. 1. İleri Lipoksidasyon Son Ürünlerinin Oluşturduğu Moleküler Hasar.....	14
2. 4. 2. 2. İleri Lipoksidasyon Son Ürünlerinin Oluşturduğu Hücrel Adaptif Yanıtlar...15	
2. 5. AGE ve ALE olarak Karboksimetillizin.....	16
2. 6. AGE/ALE'lerin oluşumunda inhibisyon basamakları.....	16
2. 7. Stres.....	17
2. 7. 1. Stres ve Anjiyogenez.....	17
2. 7. 2. Stres ve Hormonlar.....	17
2. 7. 3. Stres ve Anksiyete.....	19
2. 7. 4. Stresin Apoptozis Üzerine Etkileri.....	19
2. 7. 5. Stres ve Endotel Disfonksiyonu.....	19
3. Gereçler ve yöntemler	21
3. 1. Proje Onayı	21
3. 2. Deney Hayvanları	21
3. 3. Deney Protokolü.....	21
3. 4. Deney Grupları	23
3. 5. Doksiziklin Uygulaması.....	23
3. 6. Stres Protokolü.....	23
3. 7. Yara Oluşturulması.....	24
3. 8. <i>In Vitro</i> Deneyler	25

3. 8. 1. Cerrahi İşlemler ve Preparatların İzole Edilmesi	25
3. 8. 1. 1. Deri preparatlarının hazırlanması.....	25
3. 8. 1. 2. Torasik Aorta Halka Preparatı	25
3. 8. 1. 3. İzometrik Gerim Değişikliklerinin Kayıt Edilmesi	26
3. 8. 1. 4. Organların İzolasyonu ve Saklanması.....	26
3. 8. 2. İzole Organ Banyosu Deney Protokolü	27
3. 9. Biyokimyasal Ölçümler.....	28
3. 9. 1. HbA1c Ölçümleri.....	28
3. 9. 2. Malondialdehit (MDA) ve Glutasyon (GSH) Ölçümleri.....	29
3. 10. İmmunohistokimyasal İncelemeler.....	30
3. 11. Jelatin Zimografi	31
3. 12. Davranış Deneyleri.....	32
3. 12. 1. Açık Alan (AA) Testleri.....	33
3. 12. 2. Yükseltilmiş Artı Labirent (YAL) Testleri.....	33
3. 13. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	33
4. Bulgular.....	35
4. 1. Stres ve/veya Doksisisiklinin Uygulamalarının Vücut Ağırlıklarına Etkisi	35
4. 2. Stres ve/veya Doksisisiklinin Uygulamalarının Kan Şekeri ve HbA1c Düzeylerine Etkisi.....	36
4. 3. İzole Organ Banyosu Deneyleri.....	39
4. 3. 1. Stres ve/veya Doksisisiklinin Uygulamalarının, Sıçan İzole Torasik Aorta Preparatlarında FE ile Oluşturulan İzometrik Kasılma Yanıtlarına Etkisi.....	39
4. 3. 2. FE ile Ön-kasılma Oluşturulmuş Preparatlarda ACh ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisisiklin Uygulamalarının Etkisi.....	41

4. 3. 3. L-NAME Varlığında, FE ile Ön-kasılma Oluşturulmuş Preparatlarda, ACh ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisiklin Uygulamalarının Etkisi.....	42
4. 3. 4. L-NAME Varlığında, FE ile Ön-kasılma Oluşturulmuş Preparatlarda, L-Arjinin ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisiklin Uygulamalarının Etkisi.....	43
4. 3. 5. L-NAME Varlığında, FE ile Ön-kasılma Uygulanmış Preparatlarda, D-Arjinin ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisiklin Uygulamalarının Etkisi.....	45
4. 3. 6. ODQ Varlığında, FE ile Ön-kasılma Oluşturulmuş Preparatlarda, ACh ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisiklin Uygulamalarının Etkisi.....	46
4. 3. 7. L-NAME Varlığında, FE ile Ön-kasılma Oluşturulmuş Preparatlarda, SNP ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisiklin Uygulamalarının Etkisi....	48
4. 3. 8. ODQ Varlığında, FE ile Ön-kasılma Oluşturulmuş Preparatlarda, SNP ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisiklin Uygulamalarının Etkisi.....	50
4. 4. Aorta, Kalp ve Deride CML, Kaspaz-3, CD31 Varlığına Yönelik İmmunohistokimyasal Boyamalar.....	51
4. 5. Matriks Metalloproteinaz Aktivitesi.....	53
4. 6. GSH ve MDA Düzeyleri.....	54
4. 7. Davranış Testleri.....	55
4. 7. 1. Açık Alan.....	55
4. 7. 2. Yükseltilmiş Artı Labirent.....	58
5. Tartışma.....	59
6. Sonuçlar ve Öneriler.....	68
7. Kaynaklar.....	70

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

AA: Açık alan

AGE: İleri glikasyon son-ürünleri

ACh: Asetilkolin

ACTH: Kortikotropin

ALE: İleri lipoksidasyon son ürünleri

CML: Karboksimetillizin

CRH: Kortikotropin salıverdirici hormon

D15: Doksisiklin (15 mg/kg/gün) grubu

D15S: Doksisiklin (15 mg/kg/gün) + stres grubu

D30: Doksisiklin (30 mg/kg/gün) grubu

D30S: Doksisiklin (30 mg/kg/gün) + stres grubu

DM: Diyabetes mellitus

E(+): Endoteli korunmuş

E(-): Endoteli uzaklaştırılmış

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz

ESM: Ekstraselüler matriks

FE: Fenilefrin

GSH: Glutasyon

HbA1c: Hemoglobin A1c

HPA: Hipotalamo-hipofizo-adrenal eksen

L-NAME: Nω-Nitro-L-arginin-metil-ester-hidroklorür

K: Kontrol grubu

MDA: Malondialdehit

MMP: Matriks metalloproteinaz

MT-MMP: Membran tipi MMP

NADPH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

ODQ: Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

O.S.H.: Ortalamanın standart hatası

PUFA: Çoklu doymamış yağ asidi (poly unsaturated fatty acid)

RCS: Serbest karbonil türleri

ROS: Serbest oksijen türleri

S: Stres grubu

SD: Sprague Dawley

SNP: Sodyum nitroprusiyat

VEGF: Damarsal endotelyal büyüme faktörü

YAL: Yükseltilmiş artı labirent

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1 Tetrasiklin molekülünün yapısı.....	1
Şekil 2. 1. Doksisiklin molekülünün kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2. 2. Matriks metalloproteinazların kontrol mekanizması.....	10
Şekil 2. 3. AGE'lerin oluşumunun şematik gösterimi.....	12
Şekil 2. 4. Lipit peroksidasyonunun aldehitik moleküler türlerinden kaynaklanan aminofosfolipit, protein ve DNA hasarı. Karbonil glioksal bileşiklerinden oluşan ileri lipoksidasyon son ürünlerine örnekler.....	14
Şekil 2.5. Karboksimetillizinin (CML) oluşum sürecinin şematik olarak gösterimi.....	16
Şekil 2. 6: Kronik stres ile ortaya çıkan hormonal etkiler.....	18
Şekil 3. 1. Sıçanlarda hareket kısıtlaması stresi uygulaması.....	24
Şekil 3. 2. A. Sıçanlarda yara oluşturulmasında kullanılan malzemeler. B. Bir sıçanda zımba biyopsi örneği.....	24
Şekil 3. 3. 10 ml.'lik izole organ banyosuna asılmış bir sıçan izole torasik aorta halka preparatı.....	25
Şekil 3. 4. Davranış deneylerinde kullanılan düzenekler. A. Açık Alan kutusu. B. Yükseltilmiş Artı Labirent.....	32
Şekil 4. 1. Deney boyunca ve stres uygulaması sırasında sıçanların vücut ağırlıklarındaki değişimin seyri.....	36
Şekil 4. 2. Sıçanlarda hareket kısıtlaması stresinin kan şekeri düzeyleri üzerine akut (2. saat) ve kronik (15. gün) etkileri.....	38
Şekil 4. 3. Sıçanlarda deney sonu (60. gün) HbA1c düzeyleri.....	38
Şekil 4. 4. Endoteli korunmuş (A) ve uzaklaştırılmış (B) sıçan izole aorta preparatlarında fenilefrin (FE; 1 nM- 30 µM) konsantrasyon-kasılma yanıtları üzerine stres ve/veya doksisiklin uygulamalarının etkisi. Endotel uzaklaştırılmasının FE kasılma yanıtları	

üzerine etkisini göstermek üzere hesaplanan FE konsantrasyon-kasılma eğrileri altında kalan alanların (EAA) farkını gösteren histogram (C).....	40
Şekil 4. 5. Fenilefrin (FE; 3 µM) ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında asetilkolin (ACh;1 nM-0,1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrileri üzerine stres ve/veya doksisisiklin uygulamalarının etkisi.....	41
Şekil 4. 6. L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin (3 µM) ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında asetilkolin (ACh 1 nM-0,1 mM) ile oluşan konsantrasyon-yanıt eğrileri üzerine stres ve/veya doksisisiklin uygulamalarının etkisi.....	42
Şekil 4. 7. L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin (FE; 3 µM) ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında L-Arjinin (1 nM-1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrileri üzerine stres ve doksisisiklin uygulamalarının etkisi	44
Şekil 4. 8. L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin (FE; 3 µM) ile ön-kasılmış sıçan izole torasik aorta halkalarında L-Arjinin (1 nM-1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrileri üzerine stres ve doksisisiklin uygulamalarının etkisi.....	45
Şekil 4. 9. ODQ (0,01 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin (FE; 3 µM) ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında asetilkolin (ACh;1 nM-0,1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrileri üzerine stres ve/veya doksisisiklin uygulamalarının etkisi.....	47
Şekil 4.10. L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin (FE; 3 µM) ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında sodyum nitroprusiyat (SNP; 1 nM – 0,1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrileri üzerine stres ve/veya doksisisiklin uygulamalarının etkisi.....	49
Şekil 4. 11. ODQ (0,01 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin (FE; 3 µM) ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halkalarında sodyum nitropursiyat (SNP; 1nM- 0,1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrileri üzerine stres ve/veya doksisisiklin uygulamalarının etkisi.....	50
Şekil 4. 12. Aortada CML immunoreaktivitesi.....	52

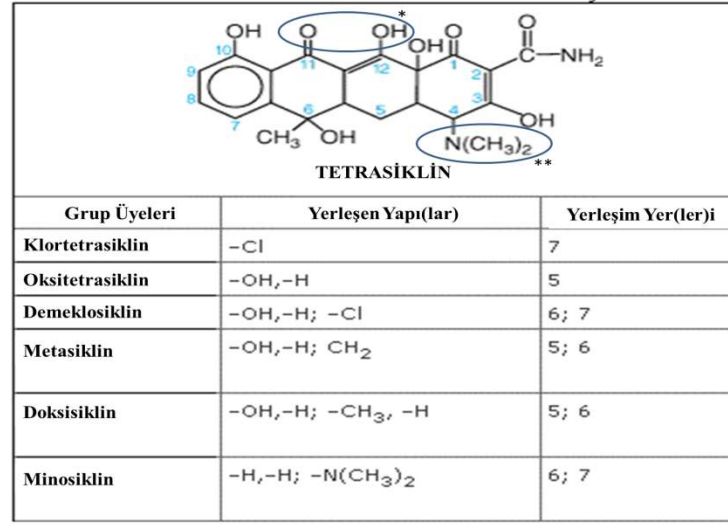
Şekil 4. 13. : Aortada Kaspaz-3 immunoreaktivitesi.....	52
Şekil 4. 14. Kalpte CML immunoreaktivitesi.....	53
Şekil 4. 15. Kalpte kaspaz-3 immunoreaktivitesi.....	53
Şekil 4. 16. A. Zimografi jeline ait örnek gösterim. B. Aorta dokusunda proMMP-2, MMP-2, MMP-9 aktiviteleri.....	54
Şekil 4. 17. Sıçanların deney sonu böbrek ve kalp dokularında ölçülen glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri.....	55
Şekil 4.18. Sıçanların Açık Alanda kat ettikleri ortalama toplam mesafe (cm), ortalama hız (cm/sn) ve orta noktaya ortalama uzaklıkları.....	55
Şekil 4.19. Stres ve kontrol gruplarının Açık Alanda 1. ve 2.dakikalardaki hızlarının zamana bağlı karşılaştırılması.....	56
Şekil 4. 20. Sıçanların Açık Alanda izledikleri yolda A. Orta 30X30 cm ² 'lik alanda bulunma yoğunluklarının karşılaştırılması. B. AA 4 kadrana bölündüğünde sıçanların giriş yaptıkları kadrان sayısı.	57
Şekil 4. 21. Sıçanların Yükseltilmiş Artı Labirentin açık ve kapalı kollarında geçirdiği süreler (sn) ve kavşaktan geçme ve dışkılama sayılarının karşılaştırılması	58

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1. Omurgalılarda tanımlanmış bazı matriks metalloproteinazlar.....	9
Tablo 3. 1. Deney protokolü.....	22
Tablo 4. 1. Gruplarda deney sürecinin başlangıcındaki (0. gün) ve sonundaki (60. gün) ortalama vücut ağırlıkları.....	35
Tablo 4. 2. Sıçanlarda stres uygulamasından önce, ilk gün 2 saatlik stres uygulamasının hemen ardından ve 15 günlük stres uygulaması bittikten hemen sonra ölçülen kan şekeri düzeyleri.....	37
Tablo 4. 3. Endoteli korunmuş [E(+)] ve sıyrılmış [E(-)] sıçan izole aorta preparatlarında fenilefrin konsantrasyon-kasılma eğrileri için A. pD_2 değerleri. B. E_{maks} değerleri.....	39
Tablo 4. 4. L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında sodyum nitroprusiyat (SNP; 1 nM – 0,1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrilerinin pD_2 değerleri.....	48

1. GİRİŞ

Tetrasiklinler antibiyotik etkilerini protein sentezini inhibe ederek gösterirler. İlk kez 1962’de Gross ve Lapiere adlı araştırmacılar tarafından matriks metalloproteinaz (MMP) aktivitesini de baskıladıkları keşfedilmiştir (1). Tetrasiklinlerin MMP’leri, direkt enzim ifadenmesinin inhibisyonu veya proMMP aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla baskıladıkları varsayılmaktadır (2). Tetrasiklin molekülünün antibiyotik etkisinden A halkasının C4 dimetilamino grubu (3), MMP inhibitörü etkisinden C12 OH ve C11 COO’daki oksijen sorumlu tutulmaktadır (Şekil 1) (4). Ayrıca, tetrasiklinlerin anti-anjiyogenik (5) anti-apoptotik (6, 7) etkilerinin olduğu bildirilmiştir.



Şekil 1. 1. Tetrasiklin molekülünün yapısı. *Anti-MMP etkiden sorumlu bölge, **Antibiyotik etkiden sorumlu bölge (8).

Tetrasiklin grubu bir antibiyotik olan doksisiklin de antibiyotik etkisinden bağımsız olarak MMP enzimlerini inhibe eder (1). Tetrasiklinler MMP’lere katalitik Zn²⁺ iyonundan bağlanırlar (9, 10). Doksisiklinin tetrasiklinler içinde en potent (11) ve geniş spektrumlu MMP inhibitörü olduğu bildirilmiştir (12).

MMP’ler anjiyogenez (5) ve embriyogenezde, ayrıca artrit, kardiyomiyopati (13), kanser (14, 15) ve miyokart enfarktüsü (16), aortik anevrizmalar (17) dahil çeşitli hastalıklarda (18, 20, 21) ve yara iyileşmesi sürecinde (22), ekstraselüler matrikste çeşitli proteinlerin yıkımına yol açarak kritik rol oynayan enzimlerdir.

Doksisiklinin hipertansif sıçanlardan izole edilen aorta endotel hücrelerinde nitrik oksit (NO) biyoyararlanımını artırdığı (18), sıçanlarda (19, 24) ve insanlarda (23) vasküler

disfonksiyonu düzelttiği gösterilmiştir. Doksisiklinin antimikrobiyal olmayan etkilerinin MMP inhibisyonu ile ilişkili olduğu bildirilse de, çalışmalar bu ilacın doğrudan süperoksit ve peroksinitrit ile reaksiyona girdiğini (18, 24), serbest oksijen türlerini (ROS) süpürücü özellikleri olduğunu, böylece sistemik ve vasküler oksidatif stresi azalttığını da göstermektedir (18). Ayrıca farelerde, miyokart (25) ve testiste (26) doksorubisin ile indüklenen ROS üretiminin doksisiklin ile önlendiği gösterilmiştir. Doksisiklinin iskemik art-koşullamada serbest radikallerin oluşumunun azalmasına ve iskemi alanında küçülmeye neden olduğu bildirilmiştir (16). Damarsal endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ile uyarılan MMP' nin doksisiklin ile inhibe edilmesinin lokal olarak NO'yu azaltarak patolojik anjiyogenezi düzelttiği de gösterilmiştir (27, 28).

Diabetes Mellitus (DM) hastalarında yapılan çok sayıda çalışmada periodontit tedavisinde doksisiklin kullanımı ile HbA1c düzeylerinde azalma olduğu gösterilmiştir (29, 30, 31, 32, 33, 34). Ayrıca, Grossi ve ark. (1997) doksisiklinin enzimatik olmayan glikozillenmeyi azalttığı ve muhtemelen bunun da HbA1c seviyesindeki azalmaya katkıda bulunduğunu ileri sürmüşlerdir (29).

Doksisiklinin, DM'de yüksek kan glikozunun karbonil gruplarının protein, lipoprotein ve/veya nükleik asitlerde bulunan azot grupları ile *non-enzimatik* glikasyonunu engelleyerek İleri Glikasyon Son-ürünleri (*Advanced Glycation End-products*; AGE)'nin oluşumunu da azalttığı ve böylece, DM'nin nefropati, retinopati (35) gibi ileri dönem komplikasyonlarına karşı koruyucu etki yaptığı bildirilmiştir (36). AGE oluşumunun, DM dışında yaşlanma, hiperlipidemi, sigara kullanımı, hipertansiyon, inflamasyon (36), Alzheimer (37) gibi durumlarla da ilişkili olduğu bilinmektedir (38, 39, 40, 41).

Şekerlerin otooksidasyonu yoluyla artan AGE'lerin yanı sıra, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) lipoksidasyonu yoluyla oluşan, reaktif karbonil bileşikleri içeren, AGE'ler de mevcuttur. Bu son ürünler daha sonra ileri lipoksidasyon son ürünü (*Advanced Lipoxidation End-products*; ALE) olarak tanımlanmıştır (42). Piralin, pentosidin, karboksimetillizin (CML) AGE'lere, CML, karboksimetilsistein ALE'lere örnek verilebilir (43). CML hem ileri glikasyon hem de ileri lipoksidasyon yolunun ortak son ürünüdür. AGE/ALE'ler geri dönüşsüz modifiye proteinlerdir ancak deglikasyon reaksiyonu oluşmaları sırasında ortaya çıkan ara ürünler olan *Maillard* bileşiklerinin çeşitli evrelerinde gerçekleşebilir (44).

AGE biyosentezinde yer alan reaksiyonların, NADPH ve glutatyonun tüketimine yol açmak suretiyle, dolaylı olarak oksidatif stresi de artırdığı öne sürülmüştür (45).

Doksisiklin mitokondriyal translasyonun geri-dönüslü inhibitörüdür. Translasyon inhibisyonu hücre aresti, apoptozis/nekroz, kaspaz 3-8-9 aktivasyonu ile ilişkilidir (6). Doksisiklin tümör hücrelerine normal hücrelere göre daha toksik etki gösterir. Doksisiklin mitokondriyal gen transkripsiyonunu selektif olarak inhibe eder. Doksurobusin ile indüklenmiş streste, doksisiklin ön tedavisinin, endoplazmik retikulum stresi ve apoptozise karşı ön-koşullamaya benzer koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir (6, 25).

Stres yanıtı mekanizmalarının aktivasyonu, hipotalamo-hipofizo-adrenal aks tarafından yönetilir. Stres uyaranından sonra, sırasıyla kortikotropin salıverdirici hormon (CRH), kortikotropin (ACTH) salıverilir. ACTH'nın sistemik dolaşıma geçmesi ve kanda katekolamin ve glukokortikoid düzeylerinin yüksek bulunması stres cevabının tipik özelliğidir. Bu hormonlar hiperglisemik hormonlardır. Hiperglisemi de çeşitli mekanizmalarla oksidatif stresi tetikler (46).

Hareket kısıtlaması stresinin dislipidemi, karbonhidrat metabolizmasında bozukluk (47), NO üretiminde eksiklik ve ateroskleroz (48), antioksidan durumda dengesizlik sonucu oksidatif stres artışına ve sonuçta oksidan hasara yol açtığı öne sürülmüştür (49, 50, 51).

Doksisiklinin MMP inhibitörü, antianjiyogenik (52, 53), yara iyileştirici, antioksidan, ROS (serbest oksijen türleri) süpürücüsü, AGE/ALE sentez ve glikasyon inhibitörü olması gibi özellikleri, bu süreçlerin tümünde ortak paydanın oksidatif stres ve onun sonuçları olduğunu düşündürmektedir.

1. 1. Rasyonel

Davranışsal stres, biyokimyasal tüm stresler gibi, vücutta çeşitli mekanizmaları tetikleyerek oksidan hasara sebep olur (54, 55, 56). Sıçan kronik hareket kısıtlama stresi modelinde ortaya çıkması beklenen olası oksidatif stres ve hiperglisemik durum nedeniyle protein glikasyonunda, CML birikiminde artış, aortada yapısal ve işlevsel değişiklikler, yara iyileşmesinde bozulma, anormal anjiyogenez ve artmış apoptozis beklenmektedir. Bu yapısal ve işlevsel bozulmalarda doksisiklinin, MMP inhibisyonu yaparak, glikasyonu azaltarak ve antioksidan dengeye katkı sağlayarak koruyucu etki göstermesi beklenir.

1. 2. Hipotezler

Sıçanlarda kronik hareket kısıtlama stresi kan glikoz düzeyini ve oksidatif stresi artırır, yapısal (protein glikasyonu artışı, anormal anjiyogenez ve apoptozis) ve işlevsel değişikliklere yol açar. Doksisiklin bu değişikliklere karşı koruyucudur.

1. 3. Amaç

Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda uzun süreli, tekrarlı ve değişmeli olarak uygulanan hareket kısıtlama stresinin, izole torasik aortanın işlevsel durumuna etkisini, bu dokunun izole organ banyosu düzeneğinde çeşitli farmakolojik ajanlara karşı verdiği izometrik gerim değişikliği yanıtları aracılığıyla incelerken, bu sürece katkıda bulunması muhtemel etkenlerden AGE-ALE değişikliğini, apoptotik değişiklikleri, anjiogenez sürecindeki değişiklikleri aorta, kalp ve deri dokularında, sırasıyla anti-CML, anti-kaspaz-3 ve anti-CD31 antikorları aracılığıyla immunohistokimyasal olarak göstermek, aorta dokusundaki MMP-2, proMMP-2 ve MMP-9 aktivitelerini jelatin zimografi yöntemi aracılığıyla saptamak, oksidan denge durumuna yönelik olarak, böbrek ve kalp dokularındaki glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ile glikasyon durumuna yönelik olarak kan şekeri ve HbA1c ilişkisini biyokimyasal yöntemlerle araştırmak ve tüm bu süreçlere doksisiklinin olası koruyucu/önleyici etkisini ve bu etkinin dozla ilişkisini (15 ve 30 mg/kg/gün, *p.o.*, 60 gün) ortaya koymaktır. Ayrıca, davranışsal stresin sıçanlardaki anksiyete durumuna etkisinin açık alan ve yükseltilmiş artı labirent düzenekleri kullanılarak gösterilmesi de amaçlanmıştır.

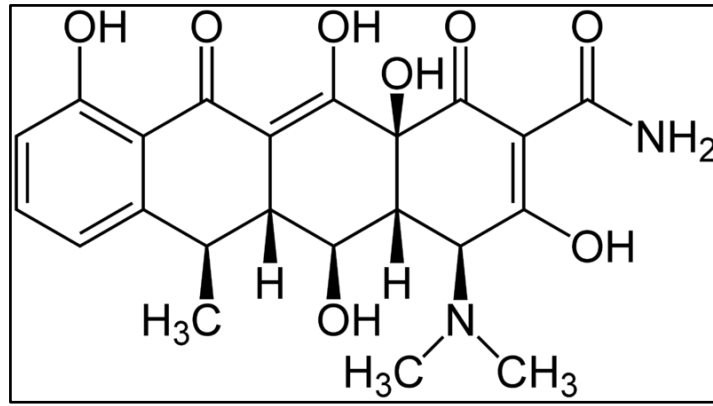
Bu çalışma ile bilindiği kadarıyla ilk kez bir davranışsal stres modelinde karboksimetillizin oluşumunun olası artışı ve beraberinde ortaya çıkan aortadaki yapısal ve işlevsel değişiklikler, değişen oksidatif durum ve doksisiklin tedavisinin bu duruma karşı koruyucu etkileri araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Doksisiklin Hidroklorür

Doksisiklin, tetrasiklin grubu, geniş spektrumlu oksitetrasiklin molekülünden elde edilmiş yarı sentetik bir ilaçtır. Antibiyotik etkisini bakteri ribozomunun 30S alt ünitesine geri dönüşlü bağlanıp, 50S alt ünitesindeki akseptör noktaya aminoasıl tRNA bağlanmasını bloke ederek gösterir ve protein sentezini durdurur. Literatürde bilinen antibiyotik etkisi dışında diğer pek çok biyolojik etkileri ile ilgili de çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

2. 1. 1. Fizikokimyasal Özellikleri



Şekil 2. 1. Doksisiklin molekülünün kimyasal yapısı (C₂₂H₂₄N₂O₈)

Doksisiklin Hidroklorür 512.94 molekül ağırlığında, sarı renkli toz yapıdadır. Suda ve alkolde çözünür.

2. 1. 2. Farmakokinetik Özellikleri

Doksisiklinin gastrointestinal sistemden absorpsiyonu yüksektir (%90). Plazma proteinlerine % 90 oranında bağlanır. Lipofilik özelliktedir, dokulara dağılımı yüksektir. Karaciğerde sitokrom p450 enzim sistemi ile metabolize olur. Yarılanma ömrü diğer tetrasiklinlere göre uzundur (15-19 saat). Enterohepatik döngüye girer ve feçes ile inaktif metabolit veya şelat halinde vücuttan atılır. Böbrekten elimine olmaması böbrek hastalarında seçim nedenidir.

2. 1. 3. Doksisisiklinin Antibiyotik Dışı Etkileri

2. 1. 3. 1. MMP İnhibisyonu

Doksisisiklinin antibiyotik etkisinden bağımsız olarak matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerini inhibe ettiği kanıtlanmıştır (9). MMP inhibisyonu etkisi ilk olarak periodontit tedavisinde antibiyotik olarak kullanımı sırasında kollajenaz enziminin baskılanması ve bu durumun tedavi sürecine katkıda bulunması ile ortaya çıkmıştır (1). Doksisisiklin tetrasiklinler içinde en potent ve geniş spektrumlu MMP inhibitörüdür (12).

Tetrasiklinlerin MMP'leri inhibe etme mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşmamıştır ancak olası mekanizmalar aşağıdaki gibidir:

1. Tetrasiklinin gerçekleştirdiği transkripsiyonel inhibisyon, aktive edici protein faktör-1(AP-1)'in blokajına bağlı olabilir. Tetrasiklinler protein kinaz C inhibisyonuna neden olurlar, bu transkripsiyon faktörlerinden AP-1 kompleksine giden hücre içi sinyal yolağının bir parçasıdır. Transkripsiyon-stimüle edici faktör MMP *promoterına* bağlanır. MMP-2 mRNA'sının birikiminin doksisisiklin tarafından engellendiğini bildiren diğer çalışmalar, transkripsiyonel seviyede MMP'lerin inhibitör düzenlenmesinden bahsetmektedir. Tetrasiklinlerin, inhibitörlerin transkripsiyon faktörlerini aktive edip etmediği veya kendi başına DNA *promoterına* bağlanıp bağlanmadığı ve sinyal yollarını bloke edip etmediği açık değildir. MMP-2 mRNA'sının post-transkripsiyonel destabilizasyonu da açıklığa kavuşturulması gereken bir konudur (3).

2. Doksisisiklin proteazlarla ilişkili Zn^{2+} veya Ca^{2+} iyonlarına bağlanabilir, böylece enzimin aktif noktasını bloke edebilir veya konformasyonel değişiklikleri indükleyerek proenzimi aktivasyon esnasında kırılmaya açık hale getirebilir (2).

3. MMP-2 ve MMP-9'un aktif formlarının doksisisiklin tedavisi sonrasında azaldığı bildirilmiştir. Doksisisiklinin bu azalmayı zimojenlerin *in vivo* aktivasyonunu önleyerek gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Bu MMP inhibisyon mekanizması Lee ve arkadaşları (2001) tarafından ortaya konmuştur.

4. Doksisisiklinin MMP aktivitesini plazminojen/plasmin sistemi aracılığı ile önlediği de öne sürülmüştür (57).

Doksisisiklin, periodontal hastalıklarda, artrit ve tendinitlerde kullanılmaktadır (29, 30, 31, 32, 33, 34). Ayrıca, akut koroner sendromda proflaktik olarak, abdominal aorta

anevrizmalarında matriks yıkımını inhibe ederek ve damar duvarında tip I kollajen fibrillerinin organizasyonunu önleyerek, anevrizmanın büyümesini engellediği bilinmektedir (23). Doksisiklinin ayrıca, düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonunu inhibe ettiğini gösteren çalışmalar da vardır (4). Doksisiklinin diyabetik sıçanlarda protein glikasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (10) Özellikle periodontit tedavisi sırasında subantimikrobiyal dozda kullanılan doksisiklinin diyabetik sıçanlarda HbA1c düzeyini azalttığı bildirilmiştir (29, 31).

2. 1. 3. 2. Antioksidan Etki

Kardiyovasküler sistemin verimli çalışmasında, oksidan dengenin korunması temel mekanizmalardan biridir (58). Çeşitli biyolojik sistemlerde doksisiklinin antioksidan etkileri gösterilmiştir. Doksisiklin indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ifadenmesini inhibe eder, mürin akciğer alveol epitel hücrelerinde NO üretimini azaltır (59). Etkisini iNOS mRNA'sını yıkarak gösterir. Doksisiklinin serbest radikal miktarını da azalttığı gösterilmiştir. Radikal süpürücü özelliği kimyasal yapısındaki terminal fenol halkasına bağlanmıştır (60). Doksisiklinin nöroprotektif özellikleri de mevcuttur (61, 62, 63). Spontan hipertansif sıçanlarda doksisiklin kullanımı MMP inhibisyonu, antioksidan etki, azalmış proteaz aktivitesi ve antihipertansif etki oluşturmuş ancak bu sonuçlar hipertansiyonun oluşturduğu vasküler *remodeling* ile ilişkili bulunmamıştır (64).

2. 1. 3. 3. Anjiyogenez Üzerine Etkiler

Anjiyogenez var olan damardan yeni kapillerlerin gelişmesidir. Yeni damar oluşumu çok basamaklı bir süreçtir. Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması, endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü, tubul oluşumu ve olgunlaşma, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin (ESM) yeniden şekillenmesi bu basamakları oluşturur. Fizyolojik anjiyogenez gebelik, laktasyon, embriyogenezde doku farklılaşması, yara iyileşmesi gibi doku iyileşmesi durumlarında gerçekleşmektedir (65). Proanjiogenik ve anti anjiogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiogenez kontrol edilemez. Romatoid artrit, arterit, diyabetik retinopati, psöriyazis, hemanjiyom, kanser, kronik stres durumlarında anjiyogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır (66). Bu patolojik durumların tedavisi için normal ve anormal anjiyogenezi ayırımını yapmak gerekir (66). Periferik arter hastalıklarında ve gecikmiş yara iyileşmesinde ise anjiyogenezin yetersizliği söz konusudur.

MMP'ler anjiyogenezde, endotel hücrelerinin çevre dokulara migrasyon ve invazyonunda kritik rol oynarlar, son zamanlarda MMP'lerin rolünün ESM yıkımından daha kompleks olduğu açıklanmıştır (66). MMP'lerin anjiyogenez üzerindeki etkisi etkinin dönemi ve uzunluğu açısından değişiklik gösterebilir ve anjiyogenez üzerinde kolaylaştırıcı veya inhibe edici etki gösterebilirler (66). Endotel hücre çoğalmasından sonra ESM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Kapiller tomurcuklanma oluşuktan sonra yine bu tomurcuklanmanın ucunda yeni oluşmuş ESM'de yıkılma ortaya çıkar ve anjiyogenezin yayılımı sağlanır. Bazal membranın yıkılması ise endotel hücrelerinin göçünü ve tomurcuk oluşumunu kolaylaştırır. Endotelin uzaması ile hücre içi ve hücreler arası boşlukta, damarları oluşturacak lümenler ortaya çıkar. Böylece, ESM yıkımının aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapiller oluşumu sağlanır (67).

Minosiklin ve doksisisiklinin tavşan korneasında tümör implantasyonu ile uyarılan anjiyogenezi inhibe ettiği bildirilmiştir (68). Doksisisiklin başta olmak üzere, tetrasiklinler endotel hücrelerinde MMP (MMP-8, MMP-9) sentezini inhibe ederler. mRNA düzeyindeki bu inhibisyon, anjiyogenez sırasında endotel hücrelerinin migrasyonunu etkileyebilir (69).

2. 1. 3. 4. Apoptozis Üzerine Etkiler

Apoptozis, organizmanın gelişimi ve homeostaz için temel öneme sahiptir. Apoptozis düzenlenmesinin bozulması kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli durumlarla sonuçlanır. Memelilerde apoptotik yolağın en önemli bileşenleri kaspazlar olarak bilinen proteaz ailesidir (70).

Kaspaz-1, interlökin 1 β (IL-1 β) -dönüştürücü enzim olarak bilinir ve IL-1 β 'nın öncüsünü matür hale dönüştürür, farelerde deneysel travmatik beyin hasarında önemli rolü vardır. Azalmış matür IL-1 β üretimi nörolojik fonksiyonlarda iyileşme ve doku hasarında azalma ile ilişkilidir (70, 71, 72). Deneysel veriler tetrasiklinlerin anti-apoptotik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir (62, 63). Travmatik beyin hasarından 12 saat önce veya 30 dakika sonra intraperitoneal minosiklin uygulanmasının kaspaz-1 inhibisyonu yolu ile nöronal hücre ölümünü önlediği bildirilmiştir (73). Bunun klinik sonucu olarak nörolojik kayıplar ve doku hasarı azalır. Nörolojik fonksiyonların düzelmesi azalmış lezyon boyutu ve kaspaz-1 aktivitesi ile orantılıdır, matür IL-1 β düzeyi ile ilişkilidir. Minosiklinin aynı

zamanda Huntington hastalığı (74) ve Amyotrofik Lateral Skleroz (75) gibi nörodejeneratif hastalıklarda da yararlı olabileceği öne sürülmüştür.

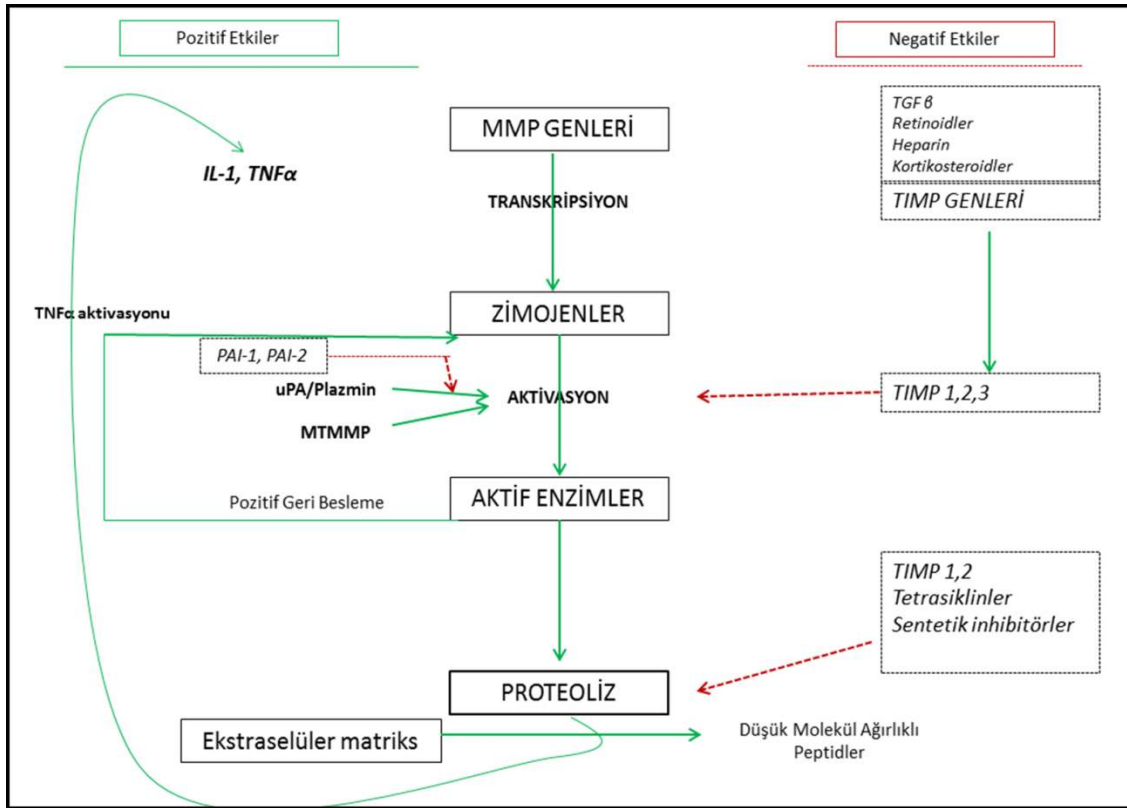
2. 2. Matriks Metalloproteinazlar

MMP'ler ESM'nin çeşitli bileşenlerini yıkabilen, Zn^{+2} içeren endopeptidaz grubu enzimlerdir. Omurgalılarda 20'den fazla MMP bulunduğu bildirilmiştir (Tablo 2. 1) (76).

Tablo2. 1. Omurgalılarda tanımlanmış bazı MMP'ler (76).

Matrilizinler	Matrilizin (MMP-7) Matrilizin-2 (MMP-26)
Kollajenazlar	Kollajenaz-1 (MMP-1) Kollajenaz-2 (MMP-8) Kollajenaz-3 (MMP-13)
Stromelizinler	Stromelizin-1 (MMP-3) Stromelizin-2 (MMP-10) Metalloelastaz (MMP-12) Stromelizin-3 (MMP-11)
Jelatinazlar	Jelatinaz-A (MMP-2) Jelatinaz-B (MMP-9)
Membran-tipi MMP'ler	MT1-MMP (MMP-14) MT2-MMP (MMP-15) MT3-MMP (MMP-16) MT4-MMP (MMP-17) MT5-MMP (MMP-24) MT6-MMP (MMP-25)

MMP'lerin en basit yapısal alt sınıfı matrilizindir ve bir sinyal peptidi, bir propeptid bölge ve çinko bağlayıcı alanı kapsayan katalitik bölgeden oluşur (66). Tüm MMP'ler proenzim olarak sentezlenir ve çoğu inaktif proMMP'ler olarak salınırlar. MMP'lerin katalitik bölgeleri enzim aktivitesinin açığa çıkması ve stabilitesi için gerekli ek bir yapısal Zn^{+2} ve iki-üç adet Ca^{+2} içerir (76). Katalitik bölgeler diğer substratlara karşı proteolitik aktiviteyi sağlar. Hemopeksin bölgesi ise kollajenazların üçlü sarmal interstisyel kollajenleri toplaması için gerekmektedir. Katalitik ve hemopeksin bölgeleri bağlayan prolinden zengin bağlayıcı peptidin fonksiyonu bilinmemekle birlikte, moleküler modele dayanarak üçlü sarmal kollajenle etkileştiği varsayılmaktadır (76).



Şekil 2. 2. MMP'lerin kontrol mekanizması (77).

Organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde MMP aktivitesi çok sayıda endojen madde ile kontrol altında tutulur (Şekil 2. 2) (77). Özellikle MMP'ler ile onların özgül endojen doku inhibitörleri (TIMP) arasında sürekli bir denge vardır. Kemiğin yeniden modellenmesi, yara iyileşmesi, anjiyogenez, inflamasyon, apoptozis, immün cevap gelişimi, embriyonik gelişim, blastosist implantasyonu, organ morfogenez, sinir hücresi gelişimi, ovulasyon, servikal dilatasyon, postpartum uterin involüsyon, endometriyal döngü ve saç folikülü döngüsü gibi pek çok biyolojik süreçte MMP ve TIMP'ler sürekli ve düşük düzeyde ekspresyonları ile kritik rol üstlenmişlerdir (76).

Matriks metalloproteinazların aktivitesi kontrol altında tutulmazsa bütün ESM bileşenlerini yıkabilirler. Bu kontrol mekanizması transkripsiyon, latent proenzimlerin aktivasyonu ve proteolitik aktivitenin inhibisyonu olmak üzere üç ayrı mekanizma ile gerçekleşir (Şekil 2. 2) (77).

MMP'lerin aktivitelerindeki kontrolsüz değişikliklerin ESM yıkımı ile kardiyak hastalıklar, ateroskleroz, periodontal hastalıklar, tümör metastazı ve artrit gibi pek çok hastalığın patogenezinde rol oynadığını bildiren yayınlar mevcuttur (66, 78).

2. 3. İleri Glikasyon Son Ürünleri

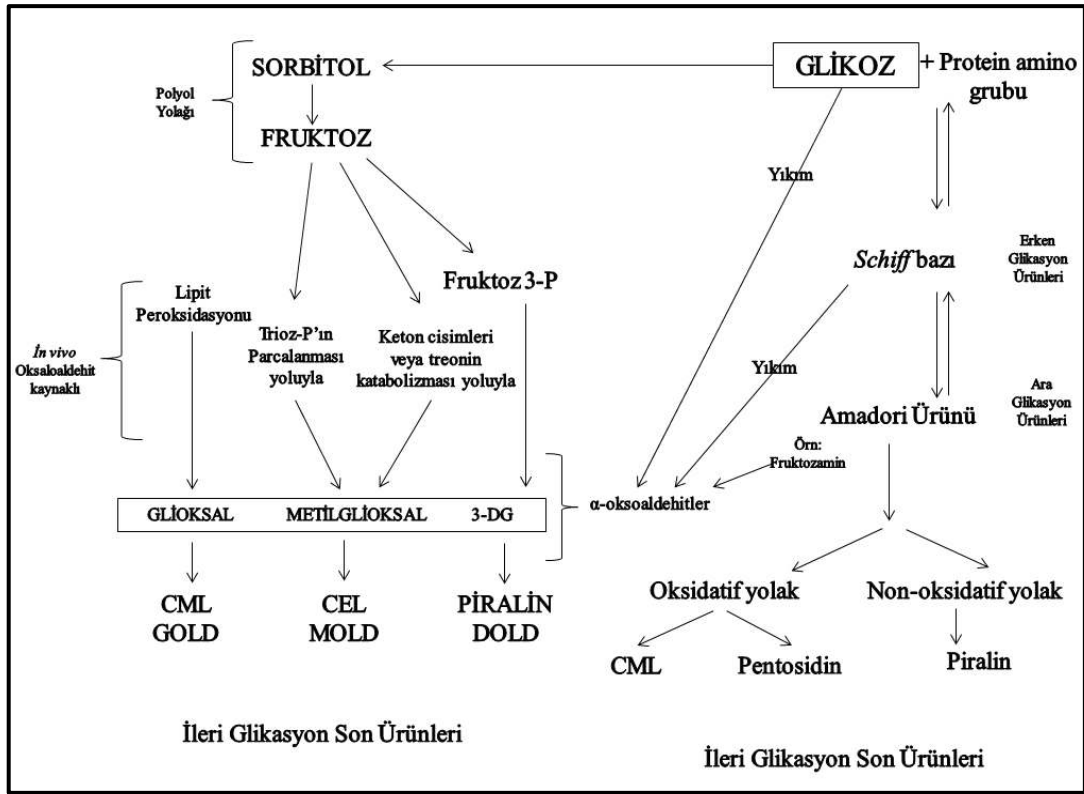
AGE'ler, protein, lipoprotein ve/veya nükleik asitlerde bulunan azotlu gruplar ile indirgeyici şekerlerin karbonil grupları arasında *non*-enzimatik bir glikasyon gerçekleşmesi sonucu ortaya çıkarlar. AGE ürünleri ilk kez 1912 yılında, AGE oluşumundaki ara bileşikleri isimlendiren Louis Camille Maillard tarafından tanımlanmıştır (79). Protein glikasyonunun klinikte en yaygın değerlendirme ölçütü olarak kullanılan HbA1c'nin ortaya çıkışı AGE ile ilgili araştırmaları başlatmıştır (80).

Proteinlerin glikasyonu sürecinde önce şekerdeki karbonil grubu ile proteinin serbest amino grubu *Schiff* bazını oluşturur, bu olay birkaç saatte gerçekleşir. *Schiff* bazı ise günler içinde *Amadori* ürünlerine, onlar da dikarbonil bileşiklerine dönüşür. Bu evreden sonra, AGE'ye dönüşüm süreci ise haftalar içinde gerçekleşir. *Amadori* ürünlerinin oluşumundan sonra, reaksiyonlar geri dönüşsüz döneme girer. Glikasyon, özellikle erken dönemlerde daha fazla olmak üzere, şeker konsantrasyonuna bağlıdır, bu nedenle diyabette AGE yapımı artar (81). Ancak, AGE oluşumunun, diyabetes mellitus (DM) dışında yaşlanma (39), hiperlipidemi, sigara içme, hipertansiyon, inflamasyon, Alzheimer (44) gibi durumlarla da ilişkili olduğu bildirilmiştir (23, 27, 48, 50).

Oksidatif stres artışına bağlı olarak şeker veya lipitlerin oksidasyonunda artış olur (81), AGE oluşumu da lipit peroksidasyonunu artırır (80).

Metilglioksal keton cisimlerinin metabolizması ve treonin yıkımıyla da oluşabilmektedir. Bu dikarbonil bileşikleri çok reaktif yapıdadırlar ve proteinlerin terminal uçlarındaki aminoasit kalıntılarıyla reaksiyona girerek AGE'leri oluştururlar (82).

Ayrıca, yüksek düzeyde kan glikozunun bir kısmı polyol yolağı ile önce sorbitole daha sonra 3-deoksi-glukozon'a dönüşüp AGE oluşumuna katılmaktadır (Şekil 2. 3) (81).



Şekil 2. 3. AGE'lerin oluşumunun şematik gösterimi (33).

Bu reaksiyonlar da NADPH ve glutatyonun tüketimine yol açarak oksidatif stresi artırır. AGE oluşumundaki mekanizmaların çeşitliliği AGE yapısındaki heterojenitenin kaynağıdır.

2. 4. İleri Lipoksidasyon Son Ürünleri

Hücrede kimyasal reaksiyonlar homeostaz bakımından sıkı kontrol altındadır. Ancak fizyolojik durumlarda bile bazı zararlı kontrolsüz reaksiyonlar da gerçekleşmektedir (43).

Çeşitli hücrelerde oluşan ROS ve serbest radikaller, çok reaktif ve zararlı etkilere sahiptir. Süperoksit anyon radikali en yaygın ROS öncüsü ve oksidatif zincir reaksiyonlarında bir araçtır (83,84).

Yaşayan hücrelerde fizyolojik ROS oluşumunun en büyük kaynağı mitokondriyal transport zincirindeki kompleks 1 ve 3'tür.

2. 4. 1. İleri Lipoksidasyon Son Ürünlerinin Temeli

Biyolojik membranlar çift fosfolipit tabakasından oluşan dinamik yapılardır. *Non*-kovalent bağlarla bağlı amfipatik moleküller içerirler (85). Membran çift tabaka halinde bulunur. Ökaryotlarda membran lipitlerini daha çok fosfolipitler oluştururlar. Fosfolipitler hidrofilik

bir baş ve hidrofobik bir açıl grubu içerirler. Çoklu Doymamış Yağ Asidi (Poly Unsaturated Fatty Acid; PUFA) içeriği ökaryotlarda esansiyeldir ve hücreye akışkanlık, esneklik, seçici geçirgenlik gibi özellikleri kazandırır (86). Fosfolipit membranın oksidatif değişikliklere duyarlılığı ile ilişkili olan başlıca iki etken vardır:

1. İçerdiği çift tabakalı membranın fizikokimyasal özellikleri: Oksijen ve serbest radikaller çift tabaka akışkan lipitte sulu çözeltiden daha iyi çözünür. Böylece oksijen iç organik fazda birikmeye eğilimli olabilir. Organik bölgeler sulu bölgelere göre daha fazla serbest radikal içermeye eğilimlidir. Sonuç olarak lipit membranlar oksidatif hasarın birincil hedefi haline gelebilir (83).

2. Yağ asitlerinin kimyasal reaktivitesi: PUFA rezidüleri oksidasyona çok duyarlıdır. Fosfolipit membran gliserolün 2-hidroksi grubu ile esterleşmiş bir doymamış yağ asidi kalıntısı içerir. Bu yağ asidi metilen grupları arasında çift bağ içerir. ROS ile oluşan hasara duyarlıdır. Yağ asitlerinin içerdiği çift bağ sayısı oksidasyona duyarlılığını artırır (87).

Sonuç olarak, fosfolipitlerdeki PUFA konsantrasyonunun fazla olması onları sadece oksitleyici ajanların birincil hedefi yapmakla kalmaz, aynı zamanda serbest radikallerin zincir reaksiyonuna katılmalarını sağlar. Reaktif serbest radikaller hidrojen atomlarını PUFA yan zincirlerinden elde edebilir. Bir hidrojen atomu sadece 1 elektron içerir. Bu yağ asidi iskeletindeki bir karbona kovalent bağla bağlanır. Sonuçta, karbon hidrojenin eşlenmemiş elektronu ile birleşir. PUFA yan zincirleri radikallerle kolayca reaksiyona girer. Karbon radikali membranın iç kısmında oluşur ve genellikle membranda çözülmüş oksijenle birleşir. Sonuçta oluşan peroksil radikali yüksek derecede reaktiftir; membran proteinleri ve PUFA yan zinciri ile kolayca bağlanabilir (43). Bu reaksiyonlar tekrarlanır, bir serbest radikal zincir reaksiyonu süreci içinde lipit hidroperoksit oluşur. Lipit hidroperoksitler peroksidize olmamış yağ asidi yan zincirlerinden daha hidrofiliktirler.

Bu karbonil bileşikler biyolojik sistemlerde yaygın bir şekilde oluşurlar ve serbest radikallerden farklı özellikleri vardır. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerine göre reaktif aldehitler daha uzun yarılanma ömrüne sahiptir. Aldehitlerin yüksüz olması hidrofobik membranlara ve hidrofilik sitozole göçlerini kolaylaştırır. Böylece üretildikleri bölgeden uzağa etki edebilirler. Bu özelliklerine dayanılarak karbonil bileşiklerin ROS'a göre daha yıkıcı, membran içi veya dışı alanlarda daha uzun erimli zararlar verebilecekleri öne sürülebilir.

3. Enzim aktivitesi ve büyüme faktörlerinin azalması / inhibisyonu,
4. Protein yıkımında değişiklikler,
5. ESM özelliklerinde modifikasyonlar ve hücre-matriks etkileşiminde modifikasyonlar,
6. Otoimmün yanıtların stimülasyonu

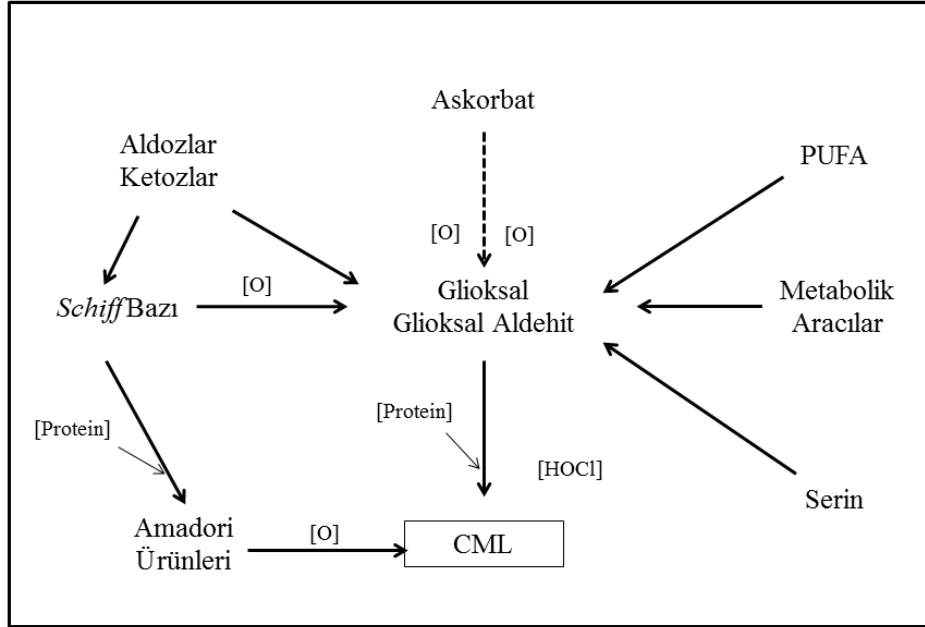
gibi fonksiyonel ve yapısal durumlarda değişikliklere yol açar (42).

Bu *non-enzimatik* protein modifikasyonları spontan, rasgele ve programlanmamış kimyasal reaksiyonlardır. Tüm proteinler serbest karbonil türleri (RCS)'nin hedefi olabilir. Sonuçta, aminofosfolipitlerin amino grupları karbonil bileşiklerle reaksiyona girebilir. Proteinlerde bazı olumsuz biyolojik etkileri olan *non-enzimatik* modifikasyonları başlatabilir. Aminofosfolipitler bu biyolojik süreçten etkilenebilir. Bu süreçte hücrel ve hücre-altı membranlardaki aminofosfolipitlerin asimetrik dağılımı, membranın fizyolojik özellikleri, membran fosfolipitlerinin döngü ve biyosentezi, işlevsel olarak aminofosfolipit gerektiren, membrana bağlı proteinlerin aktivitesi önemli olabilir.

2. 4. 2. 2. İleri Lipoksidasyon Son Ürünlerinin Oluşturduğu Hücrel Adaptif Yanıtlar

Fosfolipitlerin PUFA zincirlerinin peroksidasyonu, karbonil bileşiklerin karışımı olan bir kompleksi oluşturur. Başlarda bu yapı içindeki aldehytlerin oksidatif hasarla bağlantılı olarak sadece sitotoksik olduğu bilinirken (83), kanıtlar bu bileşiklerin oksidatif hasar ve antioksidan savunma durumlarında, uyum sürecinde sinyal tetikleyici olarak da etki ettiklerini göstermiştir.

2. 5. AGE ve ALE olarak Karboksimetillizin



Şekil 2.5. Karboksimetillizinin (CML) oluşum sürecinin şematik olarak gösterimi. [O]: Oksijen, [HOCl]: hipokloröz asit, PUFA: Çoklu Doymamış Yağ Asidi (42).

Glikooksidasyon ürünleri glikasyon ve oksidasyon reaksiyonlarının ardışık gerçekleşmesi ile meydana gelir. Bazı glikoz kaynaklı glikooksidasyon ürünleri *non*-oksidatif yollarla oluşabilir. CML ise karbonhidrat içermeyen lipid veya amino asit oksidasyon ürünlerinden de kaynaklanabilir (Şekil 2. 5). CML lipid kaynaklıysa ileri lipid peroksidasyon son ürünü olarak tanımlanır. CML, Karboksietillizin (CEL), Glioksal lizin dimer (GOLD), Metil glioksal lizin dimer (MOLD) bu özelliği gösteren AGE/ALE'lerdendir (42). CML'den zengin proteinler redoksu aktive ederler ve oksidatif hasarı kolaylaştırırlar (88).

2. 6. AGE/ALE'lerin oluşumunda inhibisyon basamakları

Maillard reaksiyonuna karşı çeşitli aşamalarda inhibisyon gelişebilir:

Reaktif dikarbonil türlerinin yakalanması,

Metal şelasyonu ile antioksidan aktivite,

Serbest radikal süpürücü etki ile antioksidan aktivite,

AGE *cross-link* klevajı,

AGE reseptörünün blokajı,

Antidiyabetik tedavi ile gliseminin azaltılması,

Aldoz redüktaz inhibisyonu,

Trans ketolaz aktivasyonu ile trioz-fosfat şantının pentoz-fosfata kayması.

2. 7. Stres

Modern stres teorisinin öncülerinden kabul edilen Selye (1936), stresi “organizmayı zorlayıcı olayların neden olduğu veya bu olaylar sonucunda vücutta ortaya çıkan ihtiyaçlara verilen tepkiler” olarak tanımlamıştır (89).

İç veya dış kaynaklı stres uyarını hipotalamo-hipofizo-adrenal (HPA) aksı aktive eder ve sempatik sinir sistemini uyarır. Stres santral ve periferik sinir sisteminde pek çok adaptif yanıtın uyarılmasını sağlar; büyüme metabolizma, dolaşım, üreme ve immün yanıtlardaki yetersiz, aşırı veya uzun süreli uyarılma fizyolojik olarak olumsuz sonuçlar doğurabilir (90). Uzun süreli stres davranışsal olarak depresyon (91), postravmatik stres bozukluğu (92) ve anksiyete (93) gibi çeşitli rahatsızlıklara neden olabilir. Beyin farklı stres uyarınları için hedeftir, stresle indüklenen durumlara karşı yüksek duyarlılığı vardır. Beyinde PUFA miktarı yüksek olduğundan serbest radikal ataklarına açıktır (86).

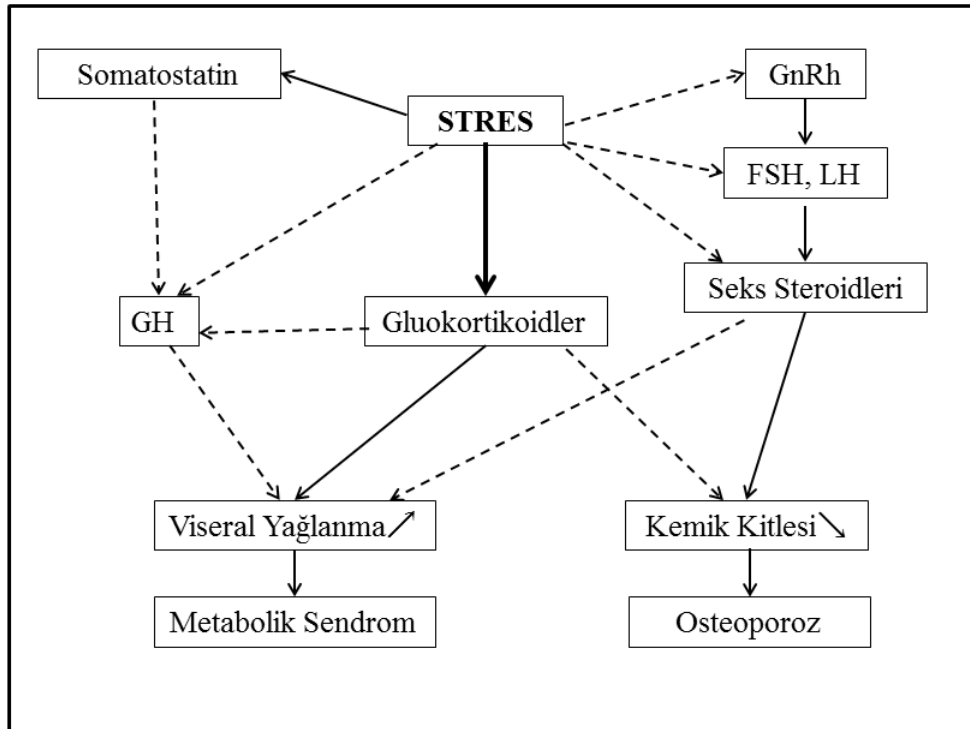
2. 7. 1. Stres ve Anjiyogenez

Tümör büyümesinde kronik stresin aracılık ettiği çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır; tümör damarlanması ve proanjiyogenik faktörlerin ekspresyonunun artışına yol açan cAMP-PKA sinyal yolağının β adrenoseptör (AR) antagonistleriyle inhibe olduğu bilinmektedir (90).

2. 7. 2. Stres ve Hormonlar

Stres organizmanın homeostaz ve hayatta kalma yeteneğini ayarlamak için davranışsal ve hormonal değişikliklere yol açar (94). CRF ön hipofizden ACTH sekresyonunun primer aktivatörüdür (95). Hipofizden salıverilen adrenokortikotropik hormon (ACTH) adrenal kortekste steroid hormon üretimine yol açar (95). Bu ACTH uyarısı, stres uyarısına yanıt olarak hipotalamustan salıverilen CRH tarafından kontrol edilir ve stres uyarısına yanıt olarak salıverilir. CRH'nın aşırı aktivasyonu anksiyetenin fizyopatolojisini oluşturur (89). CRH streste gonadotropin salıverdirici hormon sekresyonunu inhibe eder. Aynı zamanda somatostatin üzerinden büyüme hormonu, TRH, tirotropini inhibe eder ve böylece üreme,

büyüme, tiroid fonksiyonları bozulur. Kronik stres visceral yağlanmayı artırır, kas kemik kitlesini azaltır, osteoblastik aktiviteyi baskılar (96). Glukokortikoidler gonadotropin, büyüme hormonu, tiotropini inhibe ederler, osteoporoza yol açarlar (94). Strese yanıt veren sistemler birbiriyle ilişkilidir ve HPA aksın aktivasyonu beyinde hipokampus ve amigdala gibi çeşitli bölgelerde stresle indüklenen noradrenalin (NA)'ın salıverilmesi ile artar (97). Bu sistemlerdeki herhangi bir bozukluk komplikasyonlara neden olur. HPA aksının aktivasyonu ve glukokortikoidler organizmanın strese yanıt verebilirliğinde rol oynarlar (98). Stres ve glukokortikoidler insan ve hayvan modellerinde kognitif fonksiyonlar üzerine etkilidir. Adrenal steroidler ve stresli durumlar epizodik ve uzaysal bellekte kayıplara yol açarlar. Akut etki birkaç saatten birkaç güne kadar geri dönüşlü ve belirli durumlarda seçicidir (99). Glukokortikoidlerin indüklediği insülin rezistansı glisemik kontrolün bozulmasına neden olur (100, 101). Ayrıca kronik stresle ortaya çıkan santral obesite, melankolik depresyon, kronik anksiyete bozukluğu, metabolik sendrom (viseral obesite, insülin rezistansı, dislipidemi, hipertansiyon) ile karakterize olan *Pseudo Cushing* sendromu tanımlanmıştır (96, 101). Kronik stres ile ortaya çıkan hormonal etkiler şekil 2. 6'da gösterilmektedir.



Şekil 2. 6: Kronik stres ile ortaya çıkan hormonal etkiler. GH: Büyüme hormonu, GnRH: Gonadotropin salıverici hormon, FSH: Folikül stimülan hormon, LH: Luteinleştirici hormon, Kesikli ok: Baskılayıcı, Düz ok: Artırıcı (101).

2. 7. 3. Stres ve Anksiyete

Stres anksiyete benzeri davranışları tetikler (102). Kronik stres beyinde CRH'nın ekspresyonunu artırır. (103). Oksidatif stres santral sinir sisteminde nöronal dejenerasyon yapar (104). Toksik stres durumlarında ROS üretimi belirgin olarak artar. Serbest radikallerin stresle indüklenen oluşumunun bir sebebi NO üretiminin artışı olabilir. Stres aynı zamanda glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi serbest radikal süpürücü enzimleri baskılar ve oksidatif stres daha da artar. Beynin PUFA içeriği yüksek olduğundan ve oksidatif stresin önemli sonuçlarından biri membran lipidlerinin peroksidasyonu olduğundan bu dokulardaki yapı ve fonksiyonları bozulabilir (105).

2. 3. 4. Stresin Apoptozis Üzerine Etkileri

Kardiyovasküler sistem stresin primer hedef organıdır. Hipertansiyon, ateroskleroz, koroner arter hastalıkları miyokard infarktüsü gibi başlıca kardiyovasküler hastalıklar stres yanıtlarının hedefleri ile yakından ilişkilidir. Bunun yanında stres uygulanan deney hayvanlarının kardiyomiyositlerinde şiddetli apoptozis ve nekroz gösterilmiştir (106). Kronik hareket kısıtlaması stresi hipotalamusta da apoptozis hızını artırıcı etki gösterir, ayrıca öğrenmenin de bozulmasına neden olur (107). Farelerde yapılan çalışmalarla kronik stresin timusta(108) ve lenfositlerde (109) de apoptozise yol açtığı gösterilmiştir.

2. 7. 5. Stres ve Endotel Disfonksiyonu

Stres aterosklerozla ilişkili hastalıklarda önemli bir etkidir. Yüksek yağlı diyet ateroskleroza indükler ve psikososyal strese son derece duyarlı olan orta düzeyde hiperlipidemi, ateroskleroza neden olur (110) Oksidatif stres endotel disfonksiyonu ve hasarını indükleyerek aterogenezi başlatan etken olarak kabul edilmektedir (111). Ayrıca oksidatif stres/serbest radikal aktivitesi ateroskleroz patofizyolojisinde rol oynar (112). NO'nun endotel disfonksiyonu ve aterosklerozda büyük önemi vardır. NO ağırlıklı olarak koruyucu gibi görünmekteyse de zararlı etkiler ortaya çıkarabilir. NO genellikle vazodilatasyonu indükler, endotelin ise fizyolojik olarak NO ile ters yönde çalışır, tipik olarak güçlü bir vazokonstriktördür (110). Her ikisi de endotelde sentezlenir ve vazomotor düzenlemede aralarında doğal bir denge kurulmuştur. Endotel disfonksiyonunda bu denge önemli ölçüde bozulur (113, 114). Böylece ateroskleroz endotel hücresi ile ilişkili NO sentezi ve NO'ya bağımlı vazodilatasyonun bozulması ile oluşur (114). Doğal (LDL-) kolesterol oksitlendiğinde ateroskleroza zemin hazırlar. Endotelyal-NOS (e-NOS) ve

NO'yu tüketir. Böylece damar ihtiyaç halinde gevşeyemez ve endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz gelişir (115). Aksine NO biyoyararlanımındaki artış önceden varolan aterosklerotik lezyonların gerilemesine neden olabilir, e-NOS ve NO antiaterojen bir aktiviteye de sahiptir (116). Bu özellik hiperkolesterolemili hastalar için önemli olabilir (115). Okside LDL sitotoksik ve kemotaktiktir; makrofajları çeker ve köpük hücreleri, yağlı çizgilenmeler, plak oluşumu ve sonuçta ateroskleroza neden olur (115). Bu nedenle ateroskleroz oksidatif stres, LDL kolesterol, endotel disfonksiyonu, yapısal NO'nun yetersiz mobilizasyonu ve aktive olmuş proinflamatuvar yolakların neden olduğu lokal bir inflamasyon olarak yorumlanabilir.

3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

3. 1. Proje Onayı

Bu tez çalışması kapsamındaki deneylere, Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kuruluna sunulan ve onaylanan proje önerisinin, Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından da onaylanmasından sonra başlandı (Proje Tarihi: 30.04.2013; Proje No: DA 13/12). Bu çalışma Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklendi. Deneysel çalışmalar, Helsinki Deklarasyonu ve Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü (USA NIH) tarafından yayınlanan Laboratuvar Hayvanlarının Kullanımına ve Bakımına İlişkin Rehber'e uygun olarak gerçekleştirildi.

3. 2. Deney Hayvanları

Bu tez çalışmasında erkek, Sprague Dawley (SD) sıçanlar ($n=48$, $394,8 \pm 14,8$ g) kullanıldı. Sıçanlar Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Ortama alışmalarını sağlamak için deneylerin başlamasından 7 gün önce Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi, Araştırma Ünitesine getirilen sıçanlar, sıcaklığı ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) ve bağıl nemi ($\%32 \pm 7$) sabit, vantilatör ile havalandırılan, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsü uygulanan bir odada, 8'erli gruplar halinde, standart sıçan kafeslerinde barındırıldı.

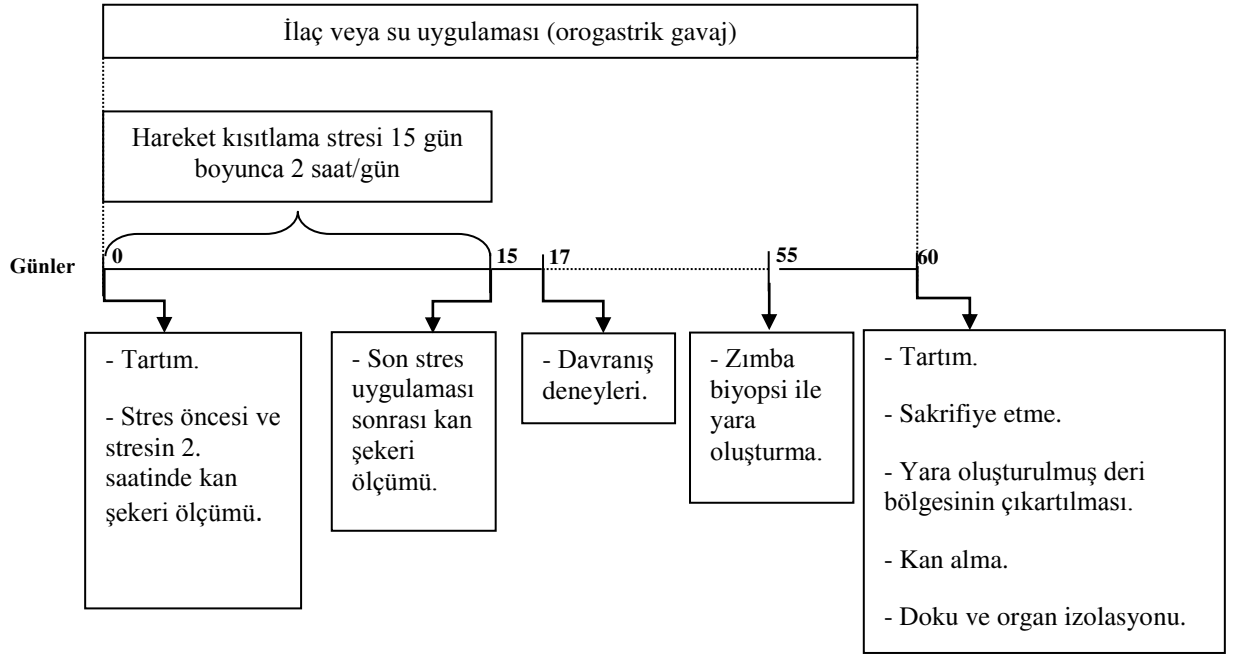
Tüm gruplara standart sıçan yemi ve musluk suyu verildi. Sıçanlara, hareketsizlik stresine maruz bırakıldıkları süre dışında yem ve su kısıtlaması uygulanmadı (*ad libitum*).

3. 3. Deney Protokolü

İzole organ banyolarına günde en fazla 3 sıçandan izole edilen ikişer adet preparat olmak üzere toplam 6 adet preparatın asılabileceği ve çıkabilecek aksaklıklar (sıçan ölümü, teknik aksaklıklar) göz önünde bulundurularak deney tasarımı haftada 4 gün, günde 3 sıçan deneye alınacak şekilde yapıldı (Tablo 3. 1. A, B). Sıçanların deneye hangi sırayla alınacakları rasgele olarak belirlendi.

Tablo 3. 1. Deney protokolü

A. Deney süresince yapılan uygulamalar takvimi



B. Her bir sıçan için deneye alınma takvimi

Günler	Deneye Giren Sıçanlar		
1.	K1	D151	S1
2.	K3	D153	D15S1
3.	D155	D301	D1S3
4.	K5	D157	D15S5
8.	D23	D303	D30S1
9.	S5	D305	D30S3
10.	K7	S7	D30S5
11.	D307	D30S7	D15S7
16.	K2	D152	S2
17.	K4	D154	D15S2
18.	D156	D302	D15S4
19.	K6	D158	D15S6
23.	D304	D30S2	S4
24.	S6	D306	D30S4
25.	K8	S8	D30S6
26.	D308	D30S8	D15S8

Stres uygulaması deney takviminin ilk 15 günü boyunca gerçekleşti. Her bir sıçanda deneye girişinin 55. gününde yara oluşturuldu, sıçanlar deneyin 60. gününde sakrifiye edildi. Her sıçana deneye girişten sakrifiye edilinceye kadar toplam 60 gün orogastrik gavaj uygulandı.

3. 4. Deney Grupları

Sıçanlar, rasgele olarak altı gruba ayrıldı:

1. Kontrol grubu (K, $n=8$)
2. Stres grubu (S, $n=8$)
3. Stres ve doksisisiklin 15 mg/kg/gün grubu (D15S, $n=8$)
4. Stres ve doksisisiklin 30 mg/kg/gün grubu (D30S, $n=8$)
5. Doksisisiklin 15 mg/kg/gün grubu (D15, $n=8$)
6. Doksisisiklin 30 mg/kg/gün grubu (D30, $n=8$)

Sıçanların VA'ları deney boyunca her hafta başında ölçüldü. D30S grubundan bir sıçan deneyin 47. gününde öldüğünden bu grubun değerlendirmeleri daha sonra $n=7$ olarak yapıldı.

3. 5. Doksisisiklin uygulaması

Doksisisiklin (*Doxycycline hyclate*, Sigma D9893, Almanya) 60 gün boyunca, 15 veya 30 mg/kg/gün dozlarında orogastrik gavaj ile uygulandı. Doksisisiklin çözeltisi distile su içinde seyreltilerek, uygulama hacmi 1 ml/kg VA olacak şekilde her gün taze hazırlandı. İlaç uygulanmayan gruplara da aynı yoldan, eşit hacimde distile su verildi.

3. 6. Stres protokolü

Stres gruplarına deneyin ilk 15 günü boyunca, her gün bir öncekinden farklı saatlerde olmak üzere günde 2 saat, değişmeli hareket kısıtlaması stresi uygulandı. Bu amaçla, sıçanlar alışkın oldukları barınak ortamında, kendi büyüklüklerine göre ayarlanabilen, pleksiglastan yapılmış, havalandırma delikleri olan, 7 x 7 x 18/20/22 cm boyutlarında, dikdörtgen prizma şeklindeki hareket kısıtlayıcı kutularda (*restrainer*) tutuldu (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. Sıçanlarda hareket kısıtlaması stresi uygulaması.

Stres uygulamasının ilk ve son günlerinde, ikinci saatin sonunda *restrainer*dan çıkmadan önce sıçanların kuyruk veninden kan alınarak glukometre (*Accu-Chek, performa nano*) ile kan şekeri düzeyleri ölçüldü. Hareket kısıtlaması boyunca kan şekeri düzeylerindeki değişiklikleri saptayabilmek amacıyla, rasgele seçilen üç sıçanda *restrainer* içinde bulundukları sırada 30. veya 45. dakikalarda da kan şekeri düzeyleri ölçüldü.

3. 7. Yara oluşturulması

Deneyin 55. gününde sıçanlar hafif anestezi (ketamin; 50 mg/kg, *i.p.*, ksilazin; 5 mg/kg, *i.p.*) altına alındı. Sıçanların sırt bölgesi tıraş edildi ve dezenfektan solüsyon (Povidon iyot %10, İsolol, Türkiye) ile temizlendi. Bir biyopsi zımbası ile sıçanların skapulalarının üst hizasında, bir eşkenar üçgenin köşelerini oluşturacak şekilde 3'er adet 3 mm çapında düzgün kenarlı yara oluşturuldu (Şekil 3. 2).

A.



B.



Şekil 3. 2. A. Sıçanlarda yara oluşturulmasında kullanılan malzemeler. **B.** Bir sıçanda zımba biyopsi örneği.

3. 8. *In Vitro* deneyler

Bu deneyler, izole organ banyosu düzeneğinde torasik aorta preparatlarının işlev yönünden incelenmesini, kalp ve böbrek dokusunda malondialdehit ve glutatyon derişiminin saptanmasını, deri preparatlarında anjiyogenezin immunohistokimyasal yöntemler ile değerlendirilmesini, kalp ve aorta dokusunda karboksimetillizin birikimini ve aktif kaspaz boyanmasını, jelatin zimografi ile matriks metalloproteinaz aktivitesinin gösterilmesini kapsamaktadır.

3. 8. 1. Cerrahi İşlemler ve Preparatların İzole Edilmesi

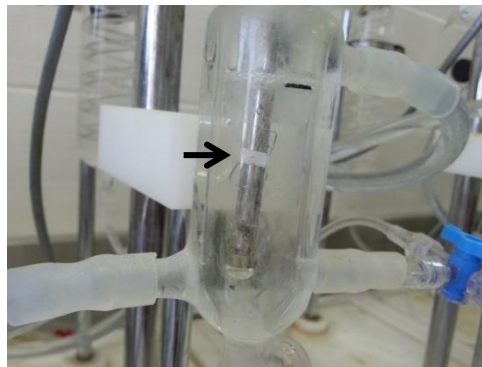
Sıçanlarda cerrahi işlemlere ketamin (60 mg/kg, *i.p*) ve ksilazin (8 mg/kg, *i.p*) kombinasyonu ile cerrahi anestezi derinliğine ulaşıldıktan sonra başlandı. Bu düzey her deney hayvanında anestezi uygulamasından sonra yapılan refleks kaybı kontrolleri ile saptandı.

3. 8. 1. 1. Deri preparatlarının hazırlanması

Anestezi altındaki sıçanın sırt bölgesi tıraş edildi. Zımba biyopsi uygulanmış alanlar 2x2 cm'lik kareler şeklinde, cilt ve cilt altını kapsayacak biçimde eksize edildi. Bu dokular karton üzerine sabitlendi, alüminyum folyoya sarıldı, sıvı azotta dondurularak inceleme zamanına kadar, doku preparatları için uygun sıcaklık olan, -30°C' da saklandı.

3. 8. 1. 2. Torasik Aorta Halka Preparatı

Sıçanlarda orta hat abdominal insizyon yapıldıktan sonra, sternumun her iki yanındaki kırkırdakların kesilmesi ile toraks boşluğuna ulaşıldı. Kalbin sol ventrikülünden 6-8 ml. kan alındı. Torasik aorta, aortik arkten itibaren diseke edilerek çıkartıldı, 1 cm'lik proksimal bölümü, içinde soğuk *Krebs-Henseleit* çözeltisi bulunan petri tabağına alındı.



Şekil 3. 3. 10 ml.'lik İzole organ banyosuna asılmış bir sıçan izole torasik aorta halka preparatı (→).

Etrafındaki yağ ve bağ dokuları dikkatlice temizlendi, 4 mm uzunluğunda ikişer adet halka preparatı hazırlandı. Preparatlardan birinin endoteli, damar lümeninden geçirilen bir cam çubuğun kendi eksenini etrafında, her iki yöne 20'şer kez çevrilmesi suretiyle nazikçe sıyrıldı. İzole organ banyosu düzeneğinde 0,01 mM ACh'in oluşturduğu gevşeme yanıtlarının FE ön-kasılmasının %20'sinden fazla olduğu preparatlarda endotelin korunduğu kabul edilerek, bu preparatlar deneye dahil edilmedi. Endoteli korunmak istenen preparatlarda, endotelin zedelenmemesi için cerrahi işlemler dikkatle gerçekleştirildi.

3. 8. 1. 3. İzometrik Gerim Değişikliklerinin Kayıt Edilmesi

İzole edilen torasik aorta halka preparatları, içinden geçirilen üçgen şeklindeki iki adet çelik tel aracılığıyla, Krebs-Henseleit çözeltisi ([mM]: NaCl, 118,2; KCl, 4,7; MgSO₄. 7H₂O, 1,2; CaCl₂, 2,5; KH₂PO₄, 1,2; NaHCO₃, 25; glikoz, 11,1) içeren, 10 ml'lik çift ceketli cam organ banyolarında, bir ucu izometrik kuvvet-yer değiştirme transdüsörüne (BioPac, FDT 05, MAY, Türkiye) bağlı, diğeri ise organ askısına sabitlenmiş şekilde yatay olarak asıldı (Şekil 3.3). İndometazin (0,01 mM) de içeren çözelti, deney boyunca sürekli olarak %95 O₂ ve %5 CO₂ karışımı ile gazlandırıldı ve termostatik kontrollü bir su sirkülatörü (WBC3044V3, MAY, Türkiye) aracılığıyla 37°C sabit sıcaklıkta tutuldu. İzole organ banyoları içine eklenerek uygulanan test maddelerine yanıt olarak düz kas preparatlarında oluşan izometrik gerim değişiklikleri, bilgisayar aracılı bir fizyolojik veri toplama ve kaydetme sistemi (BIOPAC MP100, MAY, Türkiye) aracılığıyla kaydedildi. Tüm preparatların, izole organ banyolarına yerleştirildikten sonra, 1 g dinlenme gerimi altında, 15 dakikada bir, taze çözelti ile yıkanarak, 60 dakika süresince dinlendirilerek dengelenmeleri sağlandı. Kullanılan test maddelerinin konsantrasyonları organ banyosundaki son konsantrasyon olacak biçimde hesaplandı.

3. 8. 1. 4. Organların çıkartılması ve saklanması

Kalp

Aortanın çıkartılmasından sonra, kalp çevre yağ ve bağ dokularından ayrılarak çıkartıldı. Apeksi dikkatlice 3x3x4 mm boyutlarında kesilerek ayrıldı, immunohistokimyasal çalışmalar için alüminyum folyo ile sarıldı ve sıvı azotta hızlıca dondurularak -30°C'da saklandı. Kalbin kalan kısmı biyokimyasal çalışmalar için derin dondurucuda (-80°C) saklandı.

Böbrek

Böbrek çevre yağ ve bağ dokularından ayrılarak çıkartıldı. Kapaklı plastik kutular içerisinde alındı, sıvı azotta hızlıca dondurularak, biyokimyasal inceleme zamanına kadar derin dondurucuda (-80°C) saklandı.

3. 8. 2. İzole Organ Banyosu Deney Protokolü

Endoteli korunan ve sıyrılan tüm preparatlara aynı protokol uygulandı.

Deney süresince yanıtlara prostanooidlerin olası katkısını ekarte etmek üzere, çözeltiye siklooksijenaz enzim inhibitörü indometazin (0,01 mM) eklendi. Preparatlara önce artan konsantrasyonlarda fenilefrin kümülatif olarak (FE; 1 nM-0,03 mM) uygulandı, FE'nin submaksimal (%60-80) kasılmaya neden olan konsantrasyonunun 3 µM olduğu saptandı ve protokolde yer alan FE ön-kasılmaları bu konsantrasyonla oluşturuldu.

Kümülatif FE uygulamasının ardından dokular 5'er dakika aralarla 3 kez yıkandı ve submaksimal FE kasılmasını sağlamak için 3 µM FE ortama eklendi. Kasılma yanıtı platoya ulaştığında, artan konsantrasyonlarda asetilkolin (ACh) kümülatif olarak (1 nM-0,1 mM) uygulandı, ardından dokular yıkandı.

NO'nun intrinsik katkısının aydınlatılması için ACh ile elde edilen gevşeme yanıtları endotelial NO sentaz (eNOS) inhibitörü *Nω-Nitro-L-arginine-methyl-ester-hydrochloride* (L-NAME; 1 mM) ve takip eden protokolde de çözünebilir guanilat siklaz inhibitörü *oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one* (ODQ; 0,01 mM) ile 20'şer dakika inkübasyon ardından tekrar edildi. NO'nun ekstrinsik katkısının değerlendirilmesi için aynı protokol ACh yerine sodyum nitroprusiyat (SNP; 1 nM- 0,1 mM) ile tekrar edildi.

L-NAME ile inkübasyon sonrası FE ile ön-kasılma oluşturulan preparatlarda NOS substratı L-Arginin (1 nM-1 mM) ve onun stereoizomeri D-Arginin (1 nM-1 mM) ile oluşan yanıtlar kaydedildi.

Gevşeme yanıtları submaksimal FE kasılmasının yüzdesi (%) olarak hesaplandı.

İzole Organ Banyosunda Kullanılan Test Maddeleri

Fenilefrin hidroklorür (FE; α_1 -adrenoseptör agonisti, Sigma, Almanya)

Asetilkolin klorür (ACh; seçici olmayan kolinerjik agonist, Sigma, İsviçre)

N ω -Nitro-L-arginin-metil-ester-hidroklörür (L-NAME; endotelial NO sentaz inhibitörü, Sigma, Almanya)

Sodyum nitroprusiyat (SNP; direkt nitrik oksit vericisi, Fluka, Almanya)

L-Arginin (Nitrik oksit sentaz substratı, Sigma, Almanya)

D-Arginin (L- arginin stereoizomeri, Sigma, Almanya)

Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; çözünebilir guanilat siklaz inhibitörü, Sigma, Almanya)

İndometazin (Siklooksijenaz inhibitörü, Sigma, İtalya)

İndometazin ve ODQ, dimetil sülfoksit (DMSO)'te çözüldü. Diğer test maddeleri ise distile su içinde çözünerek stok çözeltiler hazırlandı. Kullanılan test maddeleri stok çözeltilerden seyreltilerek her deney gününde taze olarak hazırlandı ve konsantrasyonları organ banyosundaki son konsantrasyon olacak şekilde hesaplandı.

3. 9. Biyokimyasal ölçümler

3. 9. 1. HbA1c ölçümleri

Yaklaşık son 3 aylık kan şekeri düzeylerini yansıtan HbA1c ölçümü ile stres ve doksisisiklinin bu süreçte glikasyon üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı. İntrakardiyak olarak alınan 6-8 ml kanın 1,5 ml'si EDTA içeren tüplere koyularak hızlı bir şekilde Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvarına ulaştırıldı.

Tam kan örneği önce hemogloblin denaturanı (MULTIGENT) ile ön hazırlığa tabi tutuldu. Eritrositler lize edildi ve hemogloblin bir hemolizat oluşturmak üzere proteolitik enzim olan pepsin ile muamele edildi.

HbA1c konsantrasyonu bir mikropartikül aglütinasyon inhibisyon yöntemi kullanılarak immuniturbidimetrik olarak ölçüldü.

3. 9. 2. Malondialdehit (MDA) ve Glutasyon (GSH) ölçümleri

Stres ve doksisisiklin uygulamalarının oksidan/anti-oksidan durum üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla kalp ve böbrek dokularında MDA ve GSH derişimleri saptandı. Bu ölçümler BÜTF Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı.

Doku MDA ve GSH Derişiminin Saptanması

Dokular 0,15 M potasyum klorür içinde cam-cam homojenizatör kullanılarak (1/10; w/v) homojenize edildi.

Doku örneklerinde MDA derişimi Buege ve Aust'un yöntemi kullanılarak saptandı (117). Yöntem MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile yaptığı kompleksin kolorimetrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır. Homojenat örnekleri 0,13 mM TBA ve %7,5 (v/v) trikloroasetik asit (TCA) içeren ayraç ile kaynar su banyosunda 15 dk. inkübe edildi. Tepkime sonrası elde edilen örnekler soğutulduktan sonra, 1500xg'de santrifüj sonrası elde edilen süpernatantların absorbansı spektrofotometre (Shimadzu-1601, Japonya) ile 535 nm'de örnek körüne karşı ölçüldü. MDA derişimleri molar ekstinksiyon katsayısı ($1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı ve nmol/g doku olarak ifade edildi.

Doku GSH derişimleri Ellman'ın doku sülfidril grup analizi yöntemi ile gerçekleştirildi (118). Homojenat örneklerinin % 1.76 metafosforik asit (w/v) çözeltisi ile deproteinizasyonu sonrası 4°C'da, 1500xg'de 10 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen süpernatantın Ellman belirteci ile oluşturduğu renkli kompleksin absorbansları 412 nm'de köre karşı saptandı. Glutasyon derişimleri standart eğri kullanılarak hesaplandı ve $\mu\text{mol/g}$ doku olarak ifade edildi.

3. 10. İmmunohistokimyasal incelemeler

Sıçanlarda yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, *Anti-CD31 antibody* anjiyogenez, *Anti-Carboxymethyl Lysine antibody* (CML26) AGE/ALE birikimi, *Anti active Caspase 3* primer antikorları apoptozis değerlendirilebilmesi için kullanıldı. Bu deneyler BÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı.

İmmunofloresan Yöntemi:

Örneklerin Hazırlanması:

Alınan doku örnekleri en hızlı biçimde (1-25 dakika içinde) -196 °C sıvı azot içerisinde donduruldu. Antijenitesi bozulmadan kesitlerin elde edilebilmesi için kesit alınana kadar doku örnekleri -30 °C derin dondurucuda bekletildi. Kriyostat (*Leica* CM1850 UV) ile 7 mikrometre kalınlığında seri kesitler *Poly-L-Lysinli* lamlara alındı. Oda sıcaklığında kurutulduktan sonra silikajel (*Merck*, 1.01925) kullanılarak nemi alınmış kapalı kutularda immün işaretleme uygulanana kadar saklandı.

İndirekt İmmunofloresan Boyama Yöntemi:

1. Kesitler, “moleküler sieve”(Merck, K. No: 5704) eklenerek suyu alınmış saf asetonunda, oda sıcaklığında 10 dakika tespit edildi.
2. 30 dakika kurutulduktan sonra kesitlerin etrafı *pap-pen* (*Zymed Laboratories Inc.* K. No:71310) ile sınırlandırıldı.
3. Uygun şekilde dilüsyonu yapılmış primer antikorlar [*Anti-CD31 antibody* (P2B1) (ab24590), *Anti-Carboxymethyl Lysine antibody* (CML26) (ab125145), *Anti-active Caspase 3* (ab13847)] kesitlere damlatıldı ve oda sıcaklığında nemli ortamda (üzeri kapakla kapatılmış, ıslatılmış gazlı bez içeren nemli küvet içinde; *humidity chamber*) 1 saat inkübe edildi.
4. Primer antikor ile 1 saat inkübasyon sonrası lamalar *Phosphate Buffered Saline* (PBS) yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı.
5. Uygun şekilde hazırlanan sekonder antikor [*Goat polyclonal Secondary antibody to Mouse IgG- H&L* (FITC) (ab97022), *Goat polyclonal Secondary antibody to rabbit IgG- H&L* (FITC) (ab97050)] yaymaların üzerine damlatıldı ve 30 dakika süreyle nemli ortamda inkübe edildi.
6. İnkübasyon süresi dolunca lamalar tekrar PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı.
7. Çekirdek boyası olarak etidyum bromür (10 µg/ml) kesitlerin üzerine birer damla damlatıldı.

8. Lamların üzerine *mounting medium* damlatıldı ve lamelle kapatıldı.

9. Preparatlar ışıktan korunarak saklandı.

İmmunofloresan Kontrol boyaması:

Kontrol amacıyla boyanan kesitlerde, primer antikör basamağı atlanarak, izleyen basamaklar aynen uygulandı.

İmmunofloresan Boyamasının Değerlendirilmesi:

İmmunofloresan yöntemi kullanılarak immün boyama uygulanmış aort, deri ve kalp kriyostat kesitleri floresan mikroskobu (*Leica DM 3000*) ile değerlendirildi ve mikroskoba entegre dijital kamera ile fotoğraflandı.

3. 11. Jelatin Zimografi

Jelatin zimografi ile sıçan aortlarında MMP-2 ve 9 aktivitesi ölçüldü. Deneyler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nörobilim Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Deney boyunca tüm işlemler buz üstünde uygulandı.

RIPA tampon (Tris-HCl pH 7,4 50 mM, NP-40 % 1, Na-deoksikolat % 0,5, SDS % 0,1, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM NaF 50 mM) içerisine 1/50 oranında proteaz inhibitörü kokteyli (Sigma) eklendi. Standart büyüklükte alınan aortlar üzerine bu karışımdan 800 µl eklenerek sonikatörde aortlar homojenize edildi. 14.000 rpm, +4°C'da 15 dakika santrifugasyon yapıldı. Oluşan süpernatant (protein fazı) yeni tüplere alındı. Örneklerde protein miktar ölçümü için BCA protein miktar tayin kiti (Pierce) kullanıldı. Hazır zimogram jeli (%10 Zymogram (Gelatin) Gel 1,0 mm X 12 well, Invitrogen) üzerindeki her kuyucuğa eşit miktarda total protein içerecek şekilde yükleme yapıldı. Yüklemenin içeriği 75 µg protein olacak şekilde ayarlandı. 1/2 oranında *Sample buffer* (Novex TrisGlycine SDS Sample buffer 2X, Invitrogen) eklenen örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra jellere yüklendi. Hazır zimogram jelleri dikey elektroforez sistemine takıldıktan sonra sisteme *running buffer* (Novex TrisGlycine SDS Running buffer 10X, Invitrogen) eklendi ve +4°C'da 3,5 saat 120 V'da yürütüldü. Jeller sistemden çıkartıldı. Oda sıcaklığında, 30 dakika boyunca, sallayıcı üzerinde, renatüre edici tampon çözeltinin içerisinde (*Novex SDS Renaturing buffer* 10X, Invitrogen) bekletildi. Jellerin içerisinde bulunduğu renatüre edici tampon çözelti dökülerek yerine geliştirici tampon

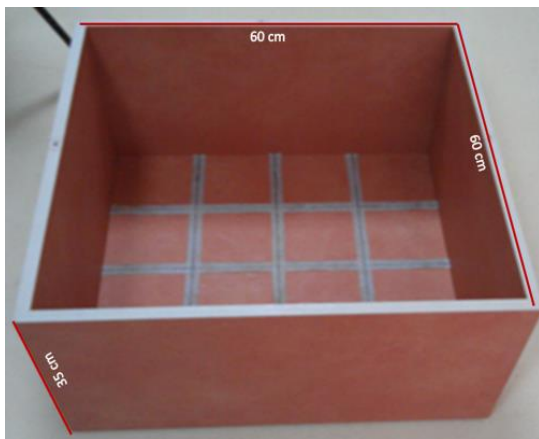
  zeltisi (*Novex SDS Developing buffer 10X*, Invitrogen) konularak, jeller yine oda sıcaklığında 30 dak boyunca, sallayıcı üzerinde bekletildi. *Developing buffer* tazelenerek, jeller 37 C'lik etüvde gece boyu, sallayıcı üzerinde bırakıldı. Etüvden  kartılan  rnekler *Coomassie Brilliant blue R250* %0,5'lik çözeltisi içinde jel tamamen boyanıncaya kadar bekletildi. *Destaining* solüsyonuna (metanol : asetik asit : su (50 : 10 : 40) alınarak bantlar belirlenip yüksek düzeyde bir kontrast yakalanıncaya kadar bekletildi. Çözelti 4-6 saatte bir tazelendi.

Kodak Gel Logic cihazında digital görüntüleme yapıldı. Elde edilen görüntülerdeki bantlar *Image J* programında analiz edildi.

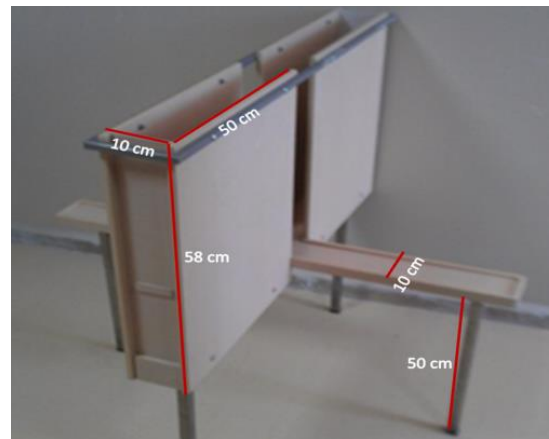
3. 12. Davranış deneyleri

Deneyler B T F Tıbbi Farmakoloji ve Fizyoloji dallarına ait düzeneklerin bulunduğu Davranış Deneyleri Laboratuvarında yapıldı. Bu deneyler sıçanların anksiyete durumlarının değerlendirilmesi amacıyla uygulanan Açık Alan (AA) ve Yükseltilmiş Artı Labirent (YAL) testlerini kapsamaktadır. Sıçanlar deney düzeneklerine alıştırılmak üzere testlerin uygulanmasından bir gün önce, birer dakikalığına düzeneklere kondu. Bu testler kronik stresin akut etkisini dışlamak amacıyla stres bitiminden 2 gün sonra, sıçanların deneye girişinin 17. gününde uygulandı. Tüm davranış testleri saat 14.00'da başlatıldı. Her sıçanın düzeneğe yerleştirilmesinden önce, koku değişkeninin etkisini dışlamak amacıyla deney düzenekleri önce alkollü, sonra kuru pamukla temizlendi.

A.



B.



şekil 3. 4. Davranış deneylerinde kullanılan düzenekler. A. Açık Alan kutusu B. Yükseltilmiş Artı Labirent

3. 12. 1. Açık Alan (AA) testleri

Taban kenarları 60X60 cm, yüksekliği 35 cm olan, üstü açık, tahtadan yapılmış kare prizma şeklindeki AA düzeneğinde, tam orta noktaya bırakılan her sıçan 120 saniye boyunca izlendi (Şekil 3. 4. A). Görüntüler orta noktadan 70 cm yükseğe yerleştirilen bir kamera (USB PC Kamera; *Shiny*) ile kaydedildi. AA düzeneği, kameranın arkasına yerleştirilen ve AA'a dik uzaklığı 85 cm olan, 40 W gücünde bir ampulle aydınlatıldı. Deney sırasında sıçanların düzeneğin içinde katettiği mesafe, bulunmayı tercih ettiği bölgeler (orta veya kenarlar), merkeze anlık uzaklık ve hız değerlendirildi. Deney sonunda hareketle ilgili veriler *Delphi® Borland™* yazılımı ile *Windows* tabanlı bir görüntü işleme programı aracılığıyla değerlendirildi.

3. 12. 2. Yükseltilmiş Artı Labirent (YAL) testleri

Yerden yüksek bir “artı” işareti şeklinde, kenarları ikişer adet açık ve kapalı olan koldan oluşan, açık ve kapalı kolların uzunluğu 50’şer cm, genişliği 10’ar cm, yerden yüksekliği 50 cm, kapalı kolların duvar yüksekliği 58 cm olan YAL düzeneği kullanıldı (Şekil 3. 4. B). Test sırasında her sıçan, yüzü kapalı kollardan birinin girişine bakacak şekilde, açık ve kapalı kolların kesiştiği kavşak noktasına bırakılarak 120 saniye boyunca izlendi. Sıçanların açık ve kapalı kollarda geçirdikleri süre, kavşaktan geçme ve dışkılama sayıları saptandı. Sıçanın bulunduğu yere karar vermek için dört ekstremitesinin temas ettiği bölgenin esas alınması standart ölçüt olarak belirlendi.

3. 13. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

İzole Organ Banyosu

Değişkenler küresellik ve varyansların homojenliği ön şartlarının kontrolü sonrası faktöriyel düzende faktörlerden ikisi tekrarlanan "Tekrarlanan Ölçümler Varyans Analizi" (*Repeated Measures Analysis of Variance*) yöntemi ile değerlendirildi. Parametrik test varsayımlarını sağlamayan bazı değişkenler için değerlendirme öncesi *Box-Cox* veri transformasyonu yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar için düzeltilmiş LSD testi kullanıldı. Veriler SPSS (*Version 17, Chicago IL, USA*) paket programında değerlendirildi.

Diğer Yöntemler (Biyokimyasal ölçümler, Jelatin Zimografi, Davranış Testleri)

Değişkenler normallik varyansların ön şartlarının kontrolü yapıldıktan sonra (Shapiro Wilk ve Levene Testi) değerlendirildi. Veri analizi yapılırken iki grup karşılaştırması için

bağımsız iki grup t testi (Student's t testi) kullanıldı. Ön şartlar sağlanmadığında Mann Whitney U Testi, üç veya daha fazla grup karşılaştırması için Tek Yönlü Varyans Analizi ve çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey HSD testi, Kruskal Wallis veya çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferonni-Dunn testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $\alpha=0,05$ olarak gösterildi. Veriler (MS Excel 2010, Graph Pad versiyon 5.01) paket programında değerlendirildi.

4. BULGULAR

4. 1. Stres ve/veya Doksisiklinin Uygulamalarının Vücut Ağırlıklarına Etkisi

Tablo 4. 1. Gruplarda deney sürecinin başlangıcındaki (0. gün) ve sonundaki (60. gün) ortalama vücut ağırlıkları.

Gruplar (n)	Ortalama Vücut Ağırlıkları (g)		
	Deney Başlangıcı (0. gün)	Stres Sonu (15. gün)	Deney Sonu (60. Gün)
K (8)	392,8 ± 11,17	388,8 ± 9, 37	393,5 ± 13,37
S (8)	404,8 ± 17,20	388,1 ± 16,31	397,4 ± 13,76
D15S (8)	402,5 ± 20,76 500	384,1 ± 18,11	385,6 ± 20,49
D30S (7)	357,0 ± 15,36	336,2 ± 17,52	304,3 ± 12,64
D15 (8)	403,6 ± 14,63	403 ± 14,72	391,1 ± 13,99
D30 (8)	395,8 ± 14,60	400,8 ± 15,25	402,5 ± 13,00

K; Kontrol, S; Stres, D15S; doksisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, D30S; doksisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, D15; doksisiklin (15 mg/kg/gün), D30; doksisiklin (30 mg/kg/gün).

Deney boyunca haftalık olarak yapılan ağırlık takibinde D30S grubundaki sıçanların VA'larındaki azalmanın, özellikle son 4 haftada belirginleştiği saptandı (Tablo 4. 1, Şekil 4. 1).

Kullanılan stres modelinin geçerliliğini değerlendirmek üzere, sıçanların VA'larındaki değişim ilk 2 hafta süresince incelendiğinde stres uygulanan gruplarda VA'nın azaldığı, stres uygulanmayan gruplarda ise değişmediği gözlemlendi. Özellikle D30 grubunda VA artışı stres uygulanan eşleniklerinden fark gösterdi (D30'a göre D30S; sırasıyla, 400,8 ±15,25, 336,2 ± 17,52, $p<0.05$).

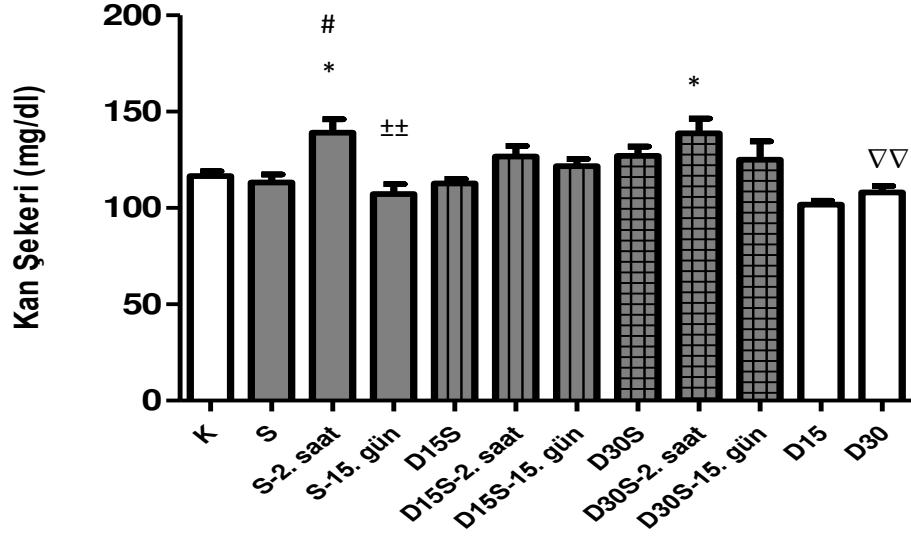
grubundan 2, D30S grubundan ise 1 sıçan henüz ilk doz doksisiklin uygulamasını almadan ilk stres uygulamasına girdi. Bu nedenle bu sıçanlara ait “bazal” ve “stresin 2. saati” kan şekeri ölçüm sonuçları değerlendirme dışı bırakıldı. Stresin değişken saatlerde uygulanmış olması nedeniyle ilk doksisiklin uygulaması ile ilk stres uygulaması arasındaki süre sabit tutulamadı. Bu süre tüm uygulamalarda 1-4 saat olmak üzere değişti.

Tablo 4. 2. Sıçanlarda stres uygulamasından önce, ilk gün 2 saatlik stres uygulamasının hemen ardından ve 15 günlük stres uygulaması bittikten hemen sonra ölçülen kan şekeri düzeyleri.

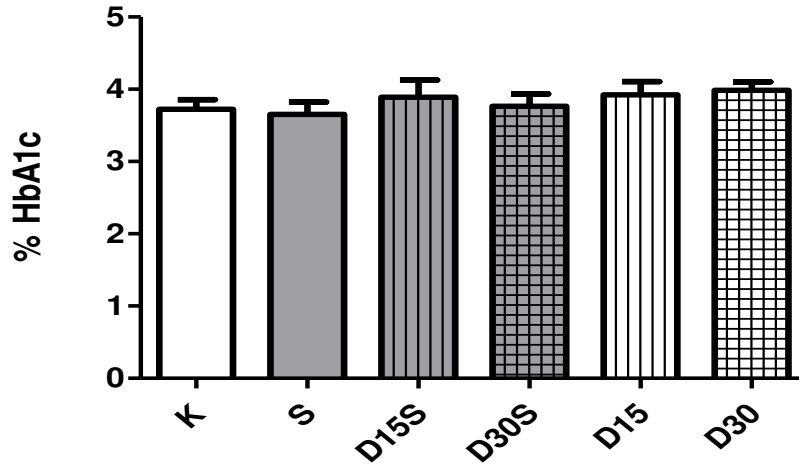
Gruplar (n)	Kan Şekeri Düzeyi (mg/dl)		
	Bazal	Stresin 2. Saati	Stresin 15. Günü
K (8)	116,5 ± 0,58	-	-
S (8)	113,25 ± 1,47	139 ± 2,52 ^{#*}	107,25 ± 1,81 ^{±±}
D15S (6)	112,75 ± 0,80	126,75 ± 1,94	121,75 ± 1,31
D30S (6)	127 ± 1,76	138,75 ± 2,68 [*]	125,125 ± 3,35
D15 (8)	101,75 ± 0,69	-	-
D30 (8)	108,125 ± 1,14 ^{∇∇}	-	-

K; Kontrol, S; Stres, D15S; doksisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, D30S; doksisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, D15; doksisiklin (15 mg/kg/gün), D30; doksisiklin (30 mg/kg/gün). * $p < 0.05$ K’e göre, # $p < 0.05$ S’e göre, ∇∇ $p < 0.01$ D30S 2. saat’e göre, ±± $p < 0.01$ S 2. saat’e göre.

İki saatlik hareket kısıtlaması stresi akut dönemde kan şekeri düzeylerini artırdı ancak 15. gün tekrarlı stres uygulaması bittikten sonra yapılan ölçümlerde kan şekeri değerlerinin bazal değerlerden farklı olmadığı saptandı (Tablo 4. 2, Şekil 4. 2). Stresin kan şekerinde artışa neden olan akut etkisinin tek doz 15 mg/kg/gün doksisiklin uygulaması ile engellendiği, 30 mg/kg/gün dozda ise engellenmediği saptandı (Şekil 4. 2). Doksisiklin uygulamalarının 15 gün sonunda saptanan kan şekeri değerlerinde de gruplar arasında bir farka neden olmadığı belirlendi (Şekil 4. 2).



Şekil 4. 2. Sıçanlarda hareket kısıtlaması stresinin kan şekeri düzeyleri üzerine akut (2. saat) ve kronik (15. gün) etkileri. (K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=6$, D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=6$, D15; doksisisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisisiklin (30 mg/kg/gün), $n=8$). Dikey çubuklar O. S. H.' yı belirtmektedir. * $p<0.05$ K'e göre, # $p<0.05$ S'e göre, $\nabla\nabla p<0.01$ D30S 2. saat'e göre, ++ $p<0.01$ S 2. saat'e göre.



Şekil 4. 3. Sıçanlarda deney sonu (60. gün) HbA1c düzeyleri. (K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$, D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$, D15; doksisisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisisiklin (30 mg/kg/gün), $n=8$). Dikey çubuklar O.S.H.'yı belirtmektedir.

Uygulamaların kan şekeri üzerine uzun erimli ortalama etkisini incelemek için ölçülen HbA1c düzeyleri bakımından gruplar arasında bir fark saptanamadı (Şekil 4. 3).

4. 3. İzole Organ Banyosu Deneyleri

4. 3. 1. Stres ve/veya Doksisiklinin Uygulamalarının, Sıçan İzole Torasik Aorta Preparatlarında Fenilefrin ile Oluşturulan İzometrik Kasılma Yanıtlarına Etkisi

Tüm gruplarda izole torasik aorta halka preparatlarında FE (1 nM-30 µM) ile konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtları gözlemlendi. E(-) preparatlarda K ve D15S gruplarında bu kasılma yanıtlarında artış olduğu saptandı. S, D30S, D15, D30 gruplarında ise endotelin uzaklaştırılması kasılma yanıtlarında bir artışa neden olmadı. Stres uygulaması, endotelin sıyrılmasının FE kasılmalarını artırıcı etkisini önledi. Stres ile oluşan bu durum 15 mg/kg/gün doksisiklin tedavisi ile düzeldi. Ancak 30 mg/kg/gün dozunda uygulanan doksisiklin stresin etkisini geri çevirmedi (Şekil 4. 4, Tablo 4. 3).

Tablo 4. 3. Endoteli korunmuş [E(+)] ve sıyrılmış [E(-)] sıçan izole aorta preparatlarında fenilefrin (FE; 1 nM- 30 µM) konsantrasyon-kasılma eğrileri için **A.** pD₂ değerleri. **B.** E_{maks} değerleri.

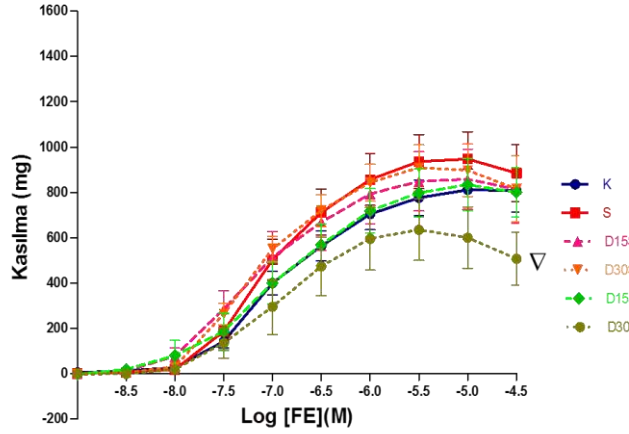
A.

pD ₂	K	S	D15S	D30S	D15	D30
E(+) preparatlar	6,9 ± 0,11	7,0 ± 0,13	7,2 ± 0,20	7,1 ± 0,12	6,9 ± 0,18	7,0 ± 0,21
E(-) preparatlar	7,2 ± 0,15	7,3 ± 0,19	7,4 ± 0,10	7,3 ± 0,11	7,3 ± 0,35	7,4 ± 0,13

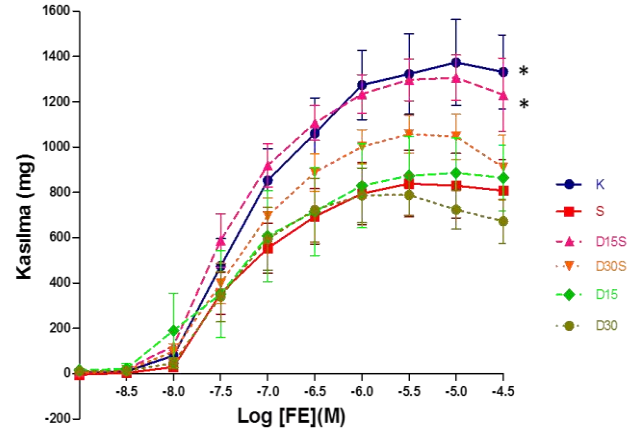
B.

E _{maks} (mg)	K	S	D15S	D30S	D15	D30
E(+) preparatlar	811,0 ± 92,10	947,8 ± 119,93	857,8 ± 133,11	824,3 ± 65,95	971,3 ± 136,58	613,3 ± 119,41
E(-) preparatlar	1373,6 ± 189,51	829,5 ± 142,36	829,5 ± 142,36	962,1 ± 63,07	1010,3 ± 176,21	723,7 ± 84,86

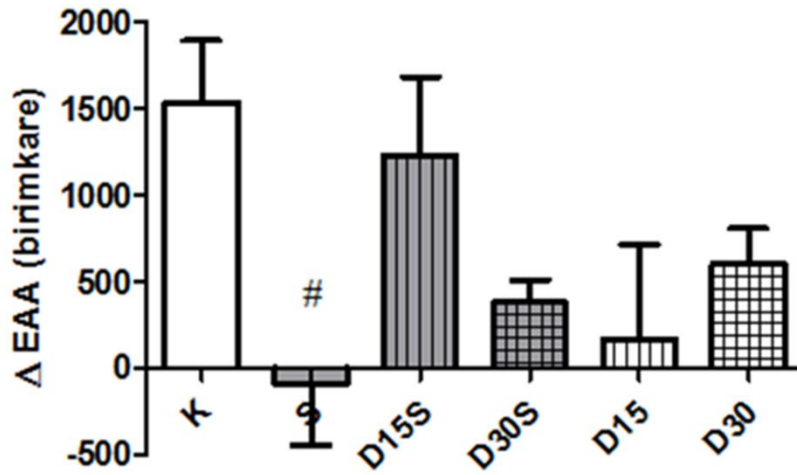
A.



B.



C.

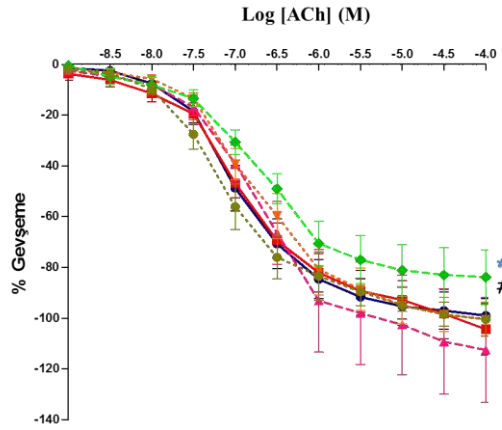


Şekil 4. 4. Endotel korunmuş (A) ve sıyrılmış (B) sıçan izole aorta preparatlarında fenilefrin (FE; 1 nM- 30 μ M) konsantrasyon-kasılma yanıtları üzerine stres ve/veya doksisisiklin uygulamalarının etkisi. Endotel sıyrılmasının FE kasılma yanıtları üzerine etkisini göstermek üzere hesaplanan FE konsantrasyon-kasılma eğrileri altında kalan alanların (EAA) farkını gösteren histogram (C). Δ EAA=[E(-) preparatlardan elde edilen EAA - E(+) preparatlardan elde edilen EAA]. Dikey çubuklar O. S. H.'yı belirtmektedir. (E (+) preparatlar: K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$, D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$, D15; doksisisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisisiklin (30 mg/kg/gün), $n=8$). (E(-) preparatlar: K; $n=7$, S; $n=6$, D15S; $n=6$, D30S; $n=7$, D15; $n=7$, D30; $n=6$). $\nabla p < 0,05$ D15'e göre, $*p < 0,05$ S'e göre, $\# p < 0,05$ K'e göre.

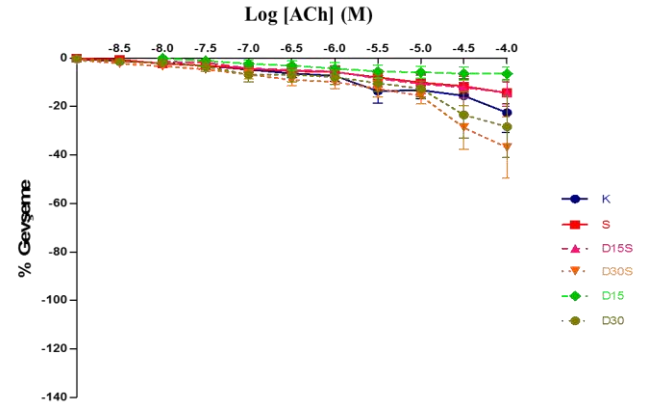
4. 3. 2. FE ile Ön-kasılma Oluşturulmuş Preparatlarda ACh ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisisiklin Uygulamalarının Etkisi

Torasik aorta preparatlarında endotele bağımlı, NO-aracılı gevşeme yanıtlarını değerlendirmek için ACh ile oluşturulan gevşeme yanıtları değerlendirildi. Endoteli sağlam preparatlarda tüm gruplarda FE (3 μ M) ön-kasılması üzerine, artan konsantrasyonlarda kümülatif ACh (1 nM – 0,1 mM) uygulaması ile konsantrasyona bağımlı artan gevşeme yanıtları gözlemlendi. Stres grubunda E (+) preparatlarda ACh-aracılı yanıtlarda kontrol grubuna göre bir gevşeme farkı saptanmadı. E(+) preparatlarda elde edilen ACh-aracılı gevşeme yanıtları D15 grubunda, kontrol ve D30'a göre daha azdı (Şekil 4. 5. A). Endotelin sıyrılması tüm gruplarda ACh-aracılı gevşeme yanıtlarını ortadan kaldırdı. E(-) preparatlarda D30 ve D30S gruplarında ACh'in yüksek konsantrasyonlarında gevşeme yanıtları oluştu (Şekil 4. 5. B).

A.



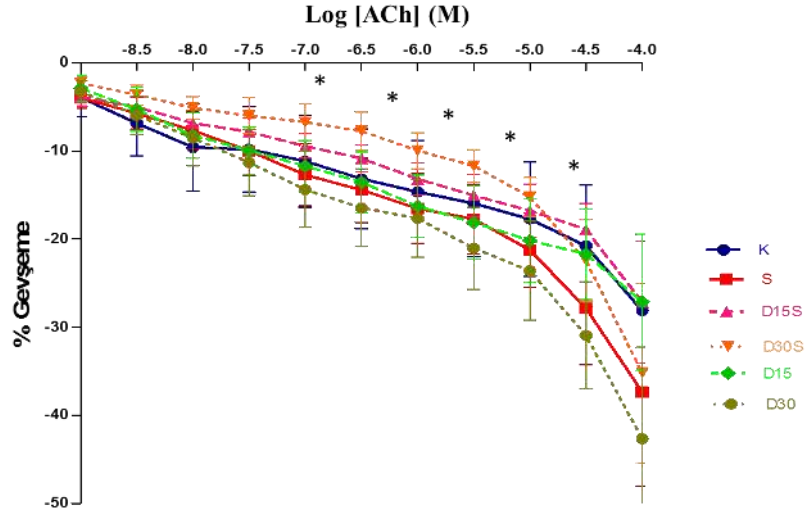
B.



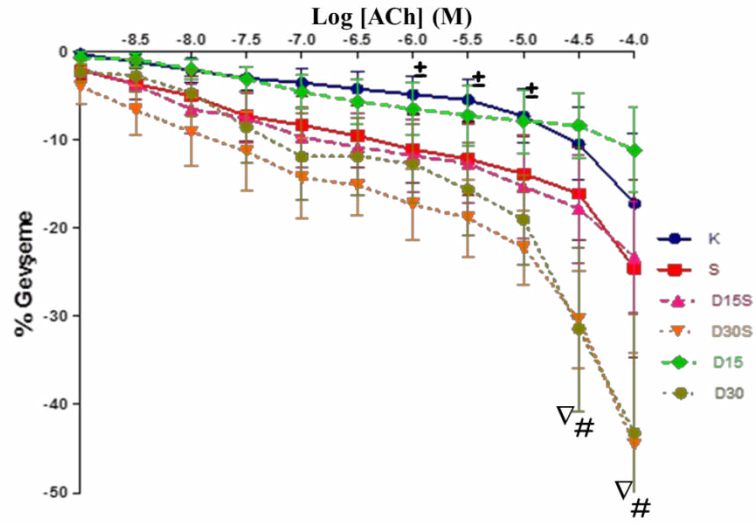
Şekil 4. 5. Fenilefrin (FE; 3 μ M) ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında asetilkolin (ACh; 1 nM-0,1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrileri üzerine stres ve/veya doksisisiklin uygulamalarının etkisi. **A.** E(+) preparatlar: K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$, D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$, D15; doksisisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisisiklin (30 mg/kg/gün), $n=8$. **B.** E(-) preparatlar: K; $n=7$, S; $n=6$, D15S; $n=6$, D30S; $n=7$, D15; $n=7$, D30; $n=6$). Gevşeme yanıtları 3 μ M FE kasılmasının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Dikey çubuklar O. S. H.'yi belirtmektedir. # $P<0,05$ D30'a göre D15, * $P<0,05$ K'e göre D15.

4. 3. 3. L-NAME Varlığında, FE ile Ön-kasılma Oluşturulmuş Preparatlarda, ACh ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisisiklin Uygulamalarının Etkisi

A.



B.



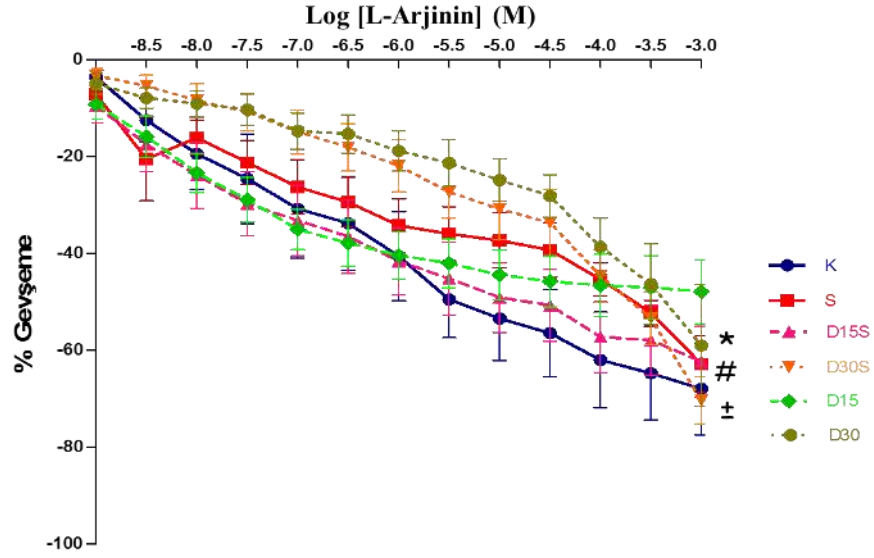
Şekil 4. 6. L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin (FE, 3 μ M) ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında asetilkolin (ACh 1 nM-0,1 mM) ile oluşan konsantrasyon-yanıt eğrileri üzerine stres ve/veya doksisisiklin uygulamalarının etkisi. **A.** E(+) preparatlar: K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$, D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$, D15; doksisisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisisiklin (30 mg/kg/gün), $n=8$. **B.** E(-) preparatlar: K; $n=7$, S; $n=6$, D15S; $n=6$, D30S; $n=7$, D15; $n=7$, D30; $n=6$). Gevşeme yanıtları 3 μ M FE kasılmasının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Dikey çubuklar O. S. H.'yı belirtmektedir. * $p<0,05$ S'e göre D30S, $\pm p<0,05$ K'e göre S, $\#p<0,05$ K'e göre D30, $\nabla p<0,05$ D15'e göre D30.

Endotelde NO'nun intrinsik etkisini inhibe etmek amacıyla preparatlar eNOS inhibitörü L-NAME (1mM) ile inkübe edildi. E(+) preparatlarda L-NAME (1 mM) inkübasyonu ACh (1 nM-0,1 mM) ile oluşan gevşeme yanıtlarının azalmasına neden oldu. ACh-aracılı gevşeme yanıtlarında gözlenen bu azalmanın en belirgin olduğu grup D30S grubu oldu. D30S grubunda elde edilen gevşeme S grubu gevşemelerine göre de daha azdı. E(-) preparatlarda L-NAME inkübasyonu K ve D15 gruplarında gevşemelerin daha da azalmasına neden oldu. Diğer gruplarda ise endotel sıyrılması L-NAME varlığında oluşan gevşemelerde azalmaya neden olmadı (Şekil 4. 6. A, B).

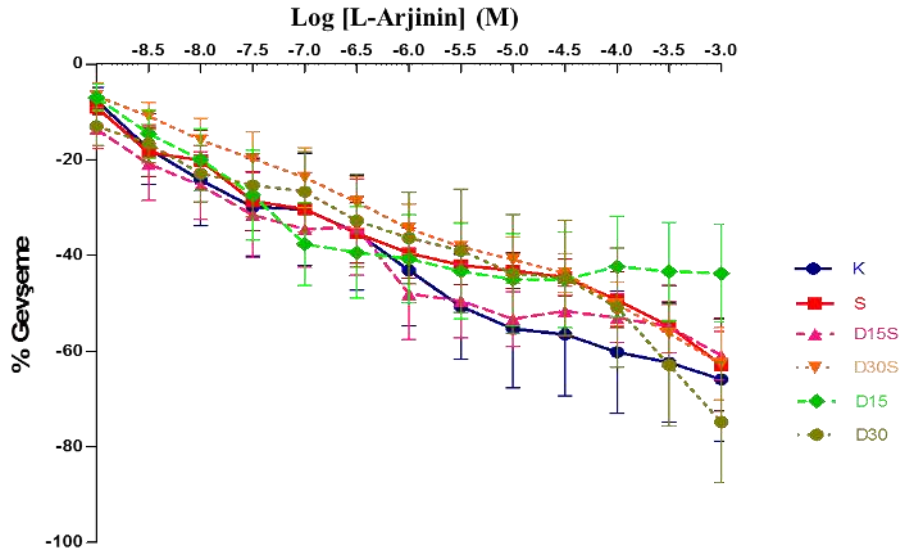
4. 3. 4. L-NAME Varlığında, FE ile Ön-kasılma Oluşturulmuş Preparatlarda, L-Arjinin ile Oluştan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisisiklin Uygulamalarının Etkisi

NO substratı L-arjininin eNOS inhibitörü L-NAME ile konsantrasyona bağımlı gevşemeler oluşturması sağlanarak gevşemelerin NO kaynaklı olduğu belirlendi. L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası izole torasik aorta halka preparatlarında fenilefrin (3 µM) ön-kasılması üzerine, artan konsantrasyonlarda kümülatif L-Arjinin (1 nM-1 mM) uygulaması ile konsantrasyon-gevşeme yanıtları kaydedildi. E(+) preparatlarda gevşemelerin S grubunda K grubuna göre daha az olması stresin endoteldeki bozucu etkisini destekledi. D15S grubundaki gevşemelerin D30S grubuna göre daha fazla ve K grubundaki değerlere yakın olması da 15 mg/kg/gün doksisisiklin tedavisinin endoteli koruduğu önermesini destekledi. Tek başına 30 mg/kg/gün doksisisiklin tedavisi ise L-Arjinin ile oluşturulan gevşeme yanıtlarının kontrole göre azalmasına neden oldu (Şekil 4. 7. A). Bu durum daha önceki bulgularla birlikte değerlendirildiğinde yüksek doz doksisisiklin tedavisinin endotel-aracılı tonik bir kasılma yanıtının gelişmesine neden olduğunu düşündürdü. Endotelin sıyrılması ile L-Arjinin gevşemelerinde saptanan gruplar arası fark ortadan kalktı (Şekil 4. 7. B).

A.



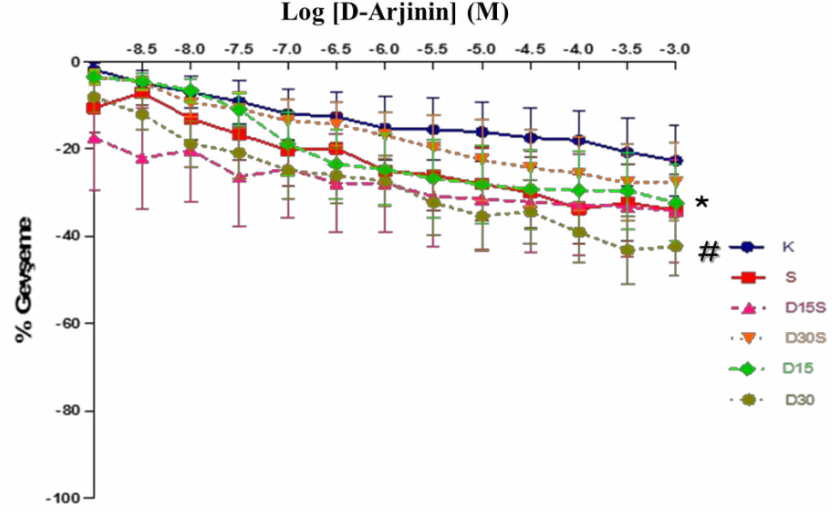
B.



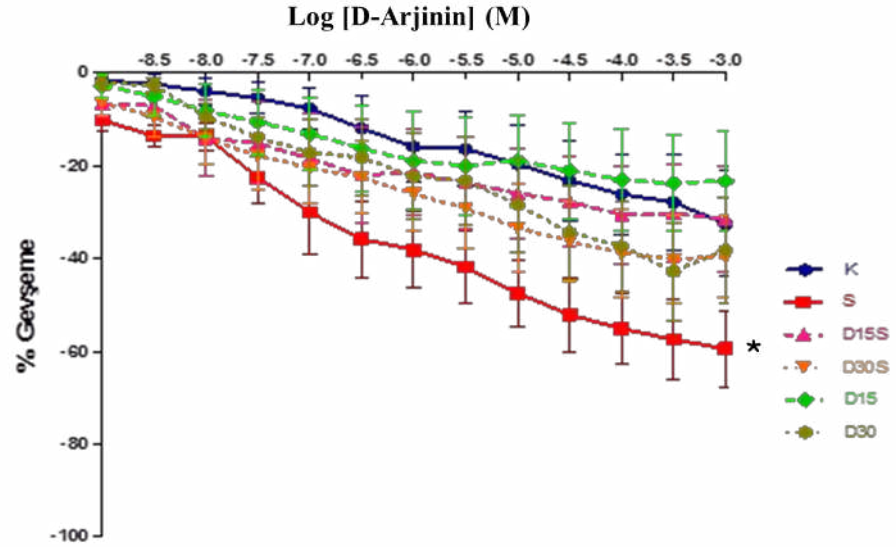
Şekil 4. 7. L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin (FE; 3 μ M) ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında L-Arjinin (1 nM-1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrileri üzerine stres ve doksisisiklin uygulamalarının etkisi **A.** E(+) preparatlar: K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$, D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$, D15; doksisisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisisiklin (30 mg/kg/gün), $n=8$. **B.** E(-) preparatlar: K; $n=7$, S; $n=6$, D15S; $n=6$, D30S; $n=7$, D15; $n=7$, D30; $n=6$). Gevşeme yanıtları 3 μ M FE kasılmasının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Dikey çubuklar O. S. H.'yı belirtmektedir. . * $p<0,05$ K'e göre D30, # $p<0,05$ K'e göre S, $\pm$ $p<0,05$ D15S'e göre D30S

4. 3. 5. L-NAME Varlığında, FE ile Ön-kasılma Uygulanmış Preparatlarda, D-Arjinin ile Oluştan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisisiklin Uygulamalarının Etkisi

A.



B.



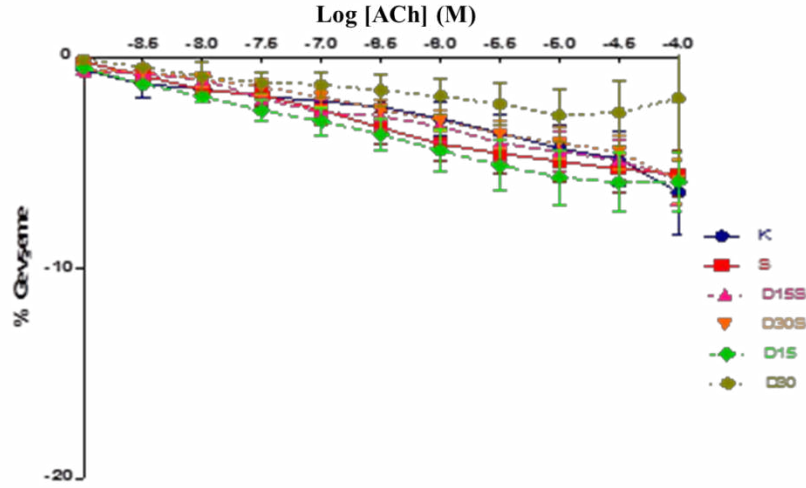
Şekil 4. 8. L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin (FE; 3 μ M) ile ön-kasılmış sıçan izole torasik aorta halkalarında L-Arjinin (1 nM-1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrileri üzerine stres ve doksisisiklin uygulamalarının etkisi. **A.** E(+) preparatlar: K; Kontrol, $n=8$; S; Stres, $n=8$; D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$; D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$; D15; doksisisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$; D30; doksisisiklin (30 mg/kg/gün), $n=8$. **B.** E(-) preparatlar: K; $n=7$; S; $n=6$; D15S; $n=6$; D30S; $n=7$; D15; $n=7$; D30; $n=6$. Gevşeme yanıtları 3 μ M FE kasılmasının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Dikey çubuklar O. S. H.'yi belirtmektedir. * $P<0,05$ K'e göre S, # $P<0,05$ K'e göre D30

L-Arjininin stereoizomeri D-Arjinin ile aynı gevşeme yanıtlarının oluşmadığı saptanarak gevşemelerin NO-kaynaklı olduğunun gösterilmesi amaçlandı, ancak L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası torasik aorta halka preparatlarında fenilefrin (3 μ M) ön-kasılması üzerine artan konsantrasyonlarda kümülatif D-Arjinin (1 nM-1 mM) uygulaması ile konsantrasyona bağımlı gevşemeler elde edildi. E(+) preparatlarda stres ve D30 gruplarındaki gevşeme yanıtları kontrole göre daha fazla idi (Şekil 4. 8. A). K ve S gruplarının gevşeme yanıtları arasındaki fark endotelin sıyrılması ile azalma göstermedi hatta S grubunda gevşeme yanıtları daha da belirginleşti (Şekil 4. 8. B). Bu durum S grubunda D-Arjinin'e yanıt olarak oluşan gevşemelerin endotelden bağımsız bir mekanizma ile oluştuğunu düşündürdü.

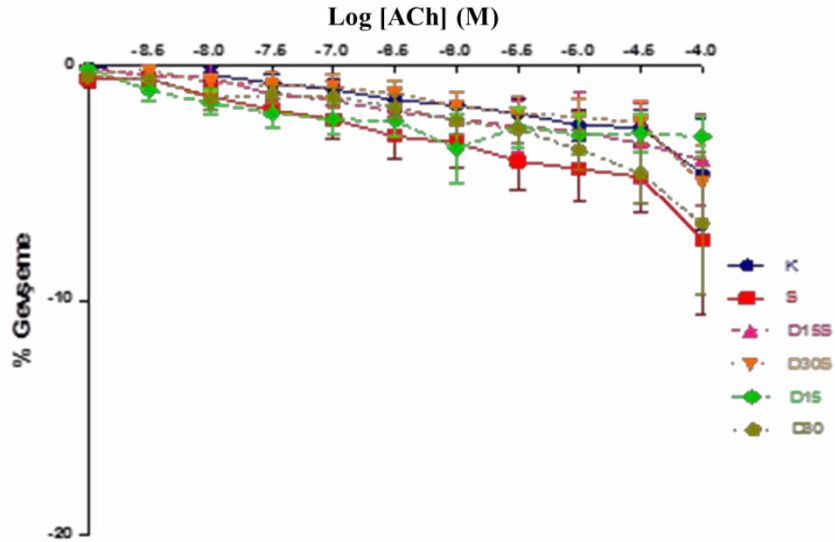
4. 3. 6. ODQ Varlığında, FE ile Ön-kasılma Oluşturulmuş Preparatlarda, ACh ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisiklin Uygulamalarının Etkisi

ACh ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında guanilat siklaz yolağının katkısını değerlendirmek için guanilat siklaz inhibitörü ODQ (0,01 mM) inkübasyonu sonrası FE (3 μ M) ile ön-kasılma oluşturulmuş tüm izole torasik aorta halka preparatlarında ACh ile oluşturulan gevşeme yanıtları değerlendirildi. ODQ varlığında ACh gevşeme yanıtları ortadan kalktı (Şekil 4. 9. A, B).

A.



B.



Şekil 4. 9. ODQ (0,01 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin (FE; 3 μ M) ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında asetilkolin (ACh; 1 nM-0,1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrileri üzerine stres ve/veya doksisiklin uygulamalarının etkisi **A.** E(+) preparatlar: K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$, D30S; doksisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$, D15; doksisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisiklin (30 mg/kg/gün), $n=8$. **B.** E(-) preparatlar: K; $n=7$, S; $n=6$, D15S; $n=6$, D30S; $n=7$, D15; $n=7$, D30; $n=6$). Gevşeme yanıtları 3 μ M FE kasılmasının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Dikey çubuklar O. S. H.'yı belirtmektedir.

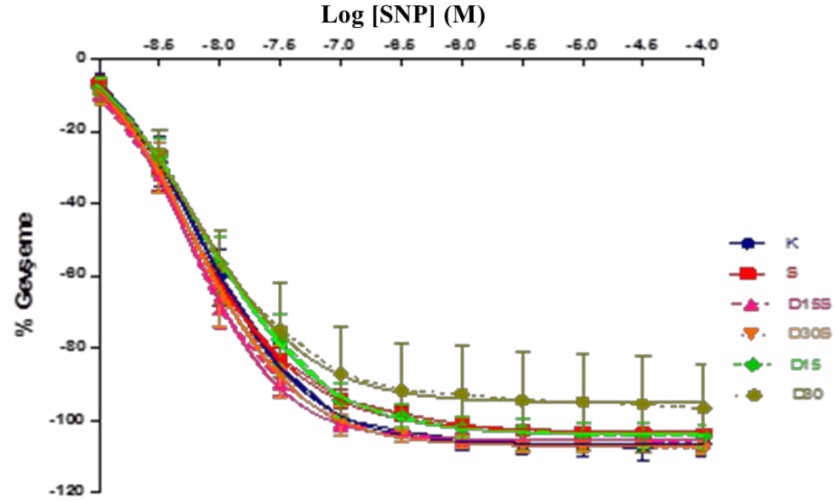
4. 3. 7. L-NAME Varlığında, FE ile Ön-kasılma Oluşturulmuş Preparatlarda, SNP ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisisiklin Uygulamalarının Etkisi

Torasik aorta preparatlarında eksojen NO'nun etkisini incelemek amacıyla L-NAME varlığında NO vericisi SNP uygulaması ile damar düz kasında guanilat siklaz üzerinden gevşeme yanıtları değerlendirildi. L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası E(+) ve E(-) izole torasik aorta halka preparatlarında tüm gruplarda fenilefrin (3 μ M) ön-kasılması üzerine, artan konsantrasyonlarda kümülatif SNP (1 nM- 0,1 mM) uygulaması, konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları oluşturdu (Şekil 4. 10. A, B, Tablo 4. 4). Bu yanıtlar gruplar arasında fark göstermedi.

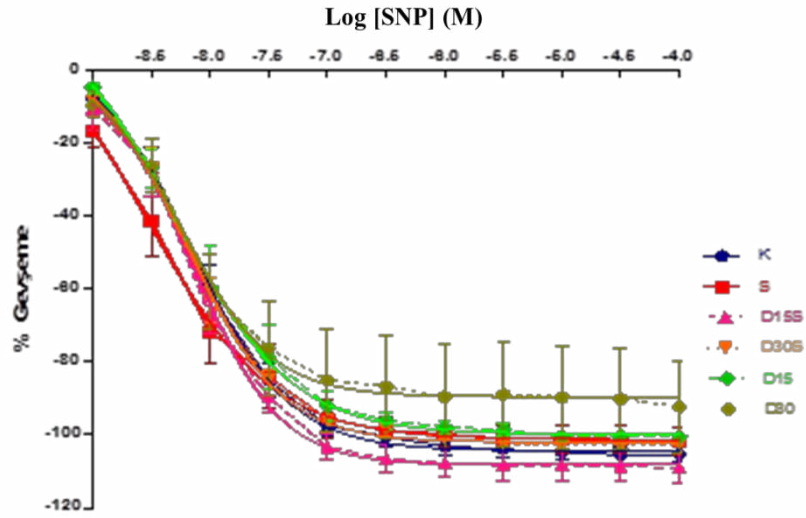
Tablo 4. 4. L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin (FE; 3 μ M) ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında sodyum nitroprusiyat (SNP; 1 nM – 0,1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrilerinin pD_2 değerleri.

pD_2	K	S	D15S	D30S	D15	D30
E(+) preparatlar	8,1 $\pm$ 0,10	8,3 $\pm$ 0,12	8,2 $\pm$ 0,15	8,2 $\pm$ 0,09	8,1 $\pm$ 0,14	8,2 $\pm$ 0,11
E(-) preparatlar	8,1 $\pm$ 0,14	8,5 $\pm$ 0,12	8,1 $\pm$ 0,11	8,1 $\pm$ 0,16	8,2 $\pm$ 0,12	8,2 $\pm$ 0,14

A.



B.

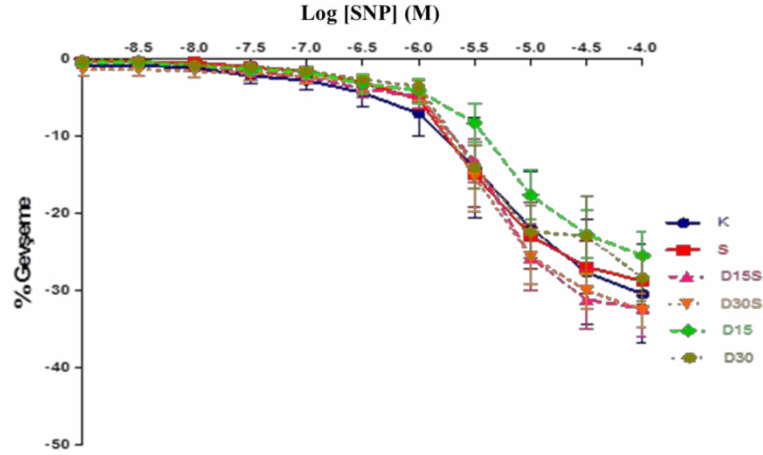


Şekil 4.10. L-NAME (1 mM) inkübasyonu sonrası fenilefrin (FE; 3 μ M) ile ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında sodyum nitroprusiyat (SNP; 1 nM–0,1 mM) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrileri üzerine stres ve/veya doksisiklin uygulamalarının etkisi. **A.** E(+) preparatlar: K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$, D30S; doksisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$, D15; doksisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisiklin (30 mg/kg/gün), $n=8$. **B.** E(-) preparatlar: K; $n=7$, S; $n=6$, D15S; $n=6$, D30S; $n=7$, D15; $n=7$, D30; $n=6$. Gevşeme yanıtları 3 μ M FE kasılmasının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Dikey çubuklar O. S. H.'yı belirtmektedir.

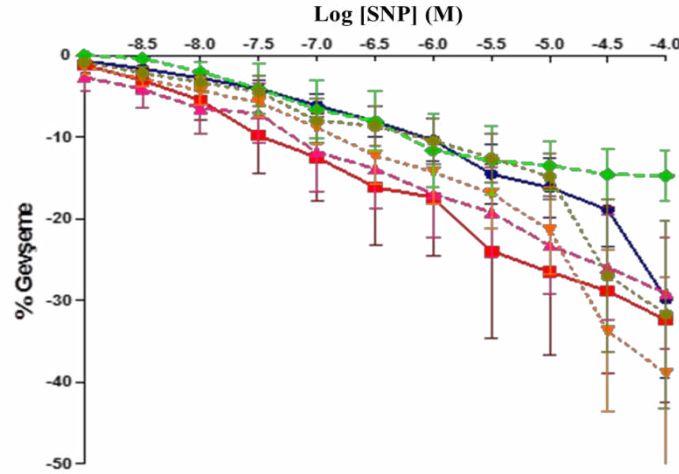
4. 3. 8. ODQ Varlığında, FE ile Ön-kasılma Oluşturulmuş Preparatlarda, SNP ile Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Stres ve/veya Doksisiklin Uygulamalarının Etkisi

Tüm gruplarda, FE ($3\mu\text{M}$) ile ön-kasılma oluşturulmuş endoteli korunmuş tüm torasik aorta halka preparatlarında, SNP ile oluşan konsantrasyon-gevşeme eğrileri, ODQ ($0,01\text{mM}$) inkübasyonu sonrası sağa kaydı (Şekil 4. 11. A).

A.



B.



Şekil 4. 11. ODQ ($0,01\text{ mM}$) inkübasyonu sonrası fenilefrin (FE; $3\mu\text{M}$) ile ön-kasılma uygulanmış sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında sodyum nitroprusiyat (SNP; 1nM - $0,1\text{ mM}$) ile oluşan konsantrasyon-gevşeme yanıt eğrileri üzerine stres ve/veya doksisiklin uygulamalarının etkisi. **A.** E(+) preparatlar: K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$, D30S; doksisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$, D15; doksisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisiklin (30 mg/kg/gün), $n=8$. **B.** E(-) preparatlar: K; $n=7$, S; $n=6$, D15S; $n=6$, D30S; $n=7$, D15; $n=7$, D30; $n=6$). Gevşeme yanıtları $3\mu\text{M}$ FE kasılmasının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Dikey çubuklar O. S. H.' yı belirtmektedir.

4. 4. Aorta, Kalp ve Deride CML, Kaspaz-3, CD31 Varlığına Yönelik İmmunohistokimyasal Boyamalar

Hareket kısıtlama stresi uygulanan sıçanlarda düşük ve yüksek doz doksisisiklin uygulamasının AGE/ALE, apoptozis ve anjiogenez üzerine olası etkileri immunohistokimyasal olarak anti-CML, anti-kaspaz-3, anti-CD31 primer antikörleri ile değerlendirildi.

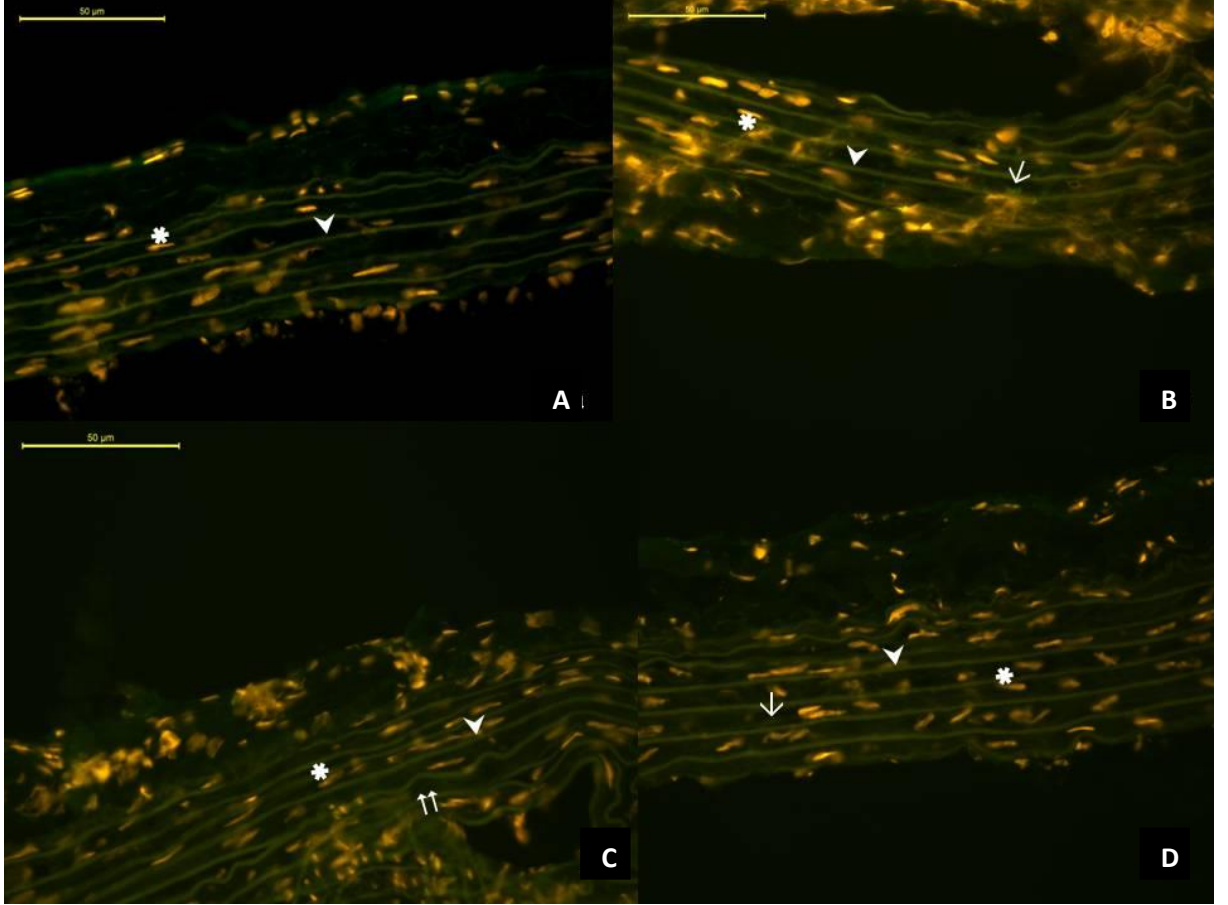
AGE'nin değerlendirildiği CML boyamasında aorta kesitlerinde negatif kontrol boyamasında yalnızca elastik lamellerin floresan tepkime gösterdiği izlenirken, herhangi bir pozitif boyanma tespit edilmedi (Şekil 4.12. A). Diğer gruplarda görülen elastik lamel boyaması bu nedenle göz ardı edildi. Stres grubunda düz kas hücrelerinin bazılarında yer yer sitoplazmik CML immunoreaktivitesi saptandı (Şekil 4.12. B). D15S grubunda aorta kesitlerinde anlamlı bir immunoreaktivite izlenmezken yüksek doz D30 grubunda düz kas hücre sitoplazmalarında zayıf CML immunoreaktivitesi saptandı (Şekil 4. 12. C, D).

Stresin neden olduğu apoptozisin değerlendirilmesi için yapılan anti-kaspaz 3 boyamasında aorta kesitlerinde D15 grubunda sitoplazmada özgün olmayan immunoreaktivite gözlemlendi (Şekil 4. 13 A). D30 grubunda ise düz kas hücre çekirdeklerinin çevresinde kaspaz-3 immunoreaktivitesi belirlendi (Şekil 4. 13. B). İmmunohistokimyasal değerlendirmelerde aorta kesitlerinde gözlenen bu tutulumun dağılımı tüm kesitlerde benzer olarak gözlenmediği için stres ve doksisisiklinin ilişkisi net olarak aydınlatılamadı.

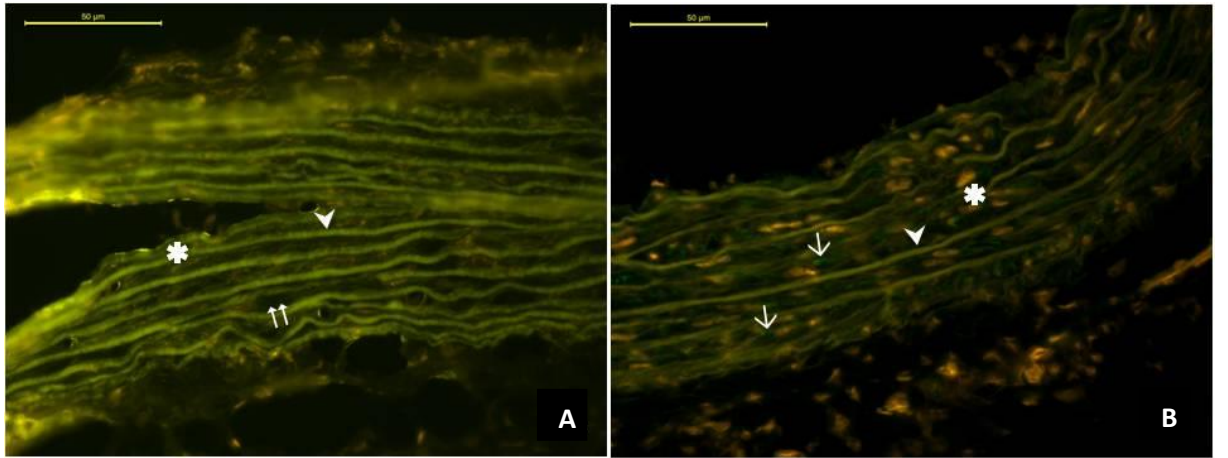
Kalpden alınan kesitlerde AGE/ALE dağılımını belirlemek için yapılan boyamalarda yalnızca stres uygulanan grupta kalp kası hücre zarı altında yoğunlaşan sitoplazmik CML immunoreaktivitesi gözlemlendi (Şekil 4. 14. A). D15S grubunda CML immunoreaktivitesinin yalnızca stres uygulanan grubun aksine, sitoplazmada dağınık bir şekilde olduğu izlendi (Şekil 4. 14. B). Tüm kesitlerde standart boyanma izlenmediği için, bu verilerle doksisisiklinin CML üzerindeki olası etkisi belirlenemedi. Kalp kesitlerinde apoptozisin değerlendirilmesi için anti-kaspaz-3 antikoru ile yapılan incelemelerde bazı alanlarda sitoplazmik boyanma saptandı (Şekil 4. 15. A). D15S grubunda sitoplazmada yer yer kaspaz-3 immunoreaktivitesi gözlemlendi (Şekil 4. 15. B).

Tüm gruplardan alınan aorta, kalp ve deri örneklerinden hazırlanan kesitlerde anti-CML, anti-kaspaz-3 ve anti-CD31 ile yapılan incelemelerde reaktivitenin tüm boyamalarda benzer görünüm sergilememesi nedeniyle stres ve/veya doksisisiklin uygulamalarının

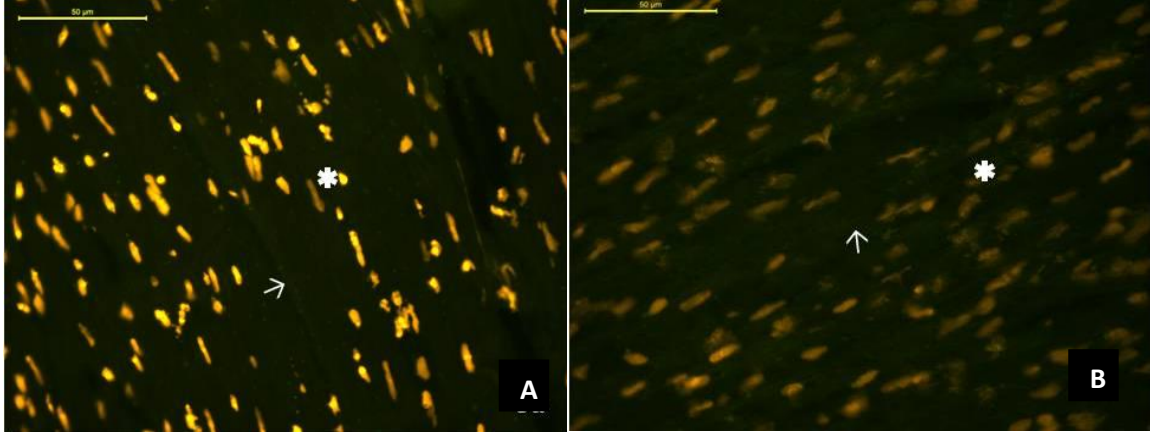
AGE/ALE, apoptozis, anjiyogenez ile ilişkisi histomorfometrik olarak net olarak aydınlatılamadı. İmmunohistokimyasal görüntülere ait bazı örnekler aşağıda verilmektedir (Şekiller 4.12-15).



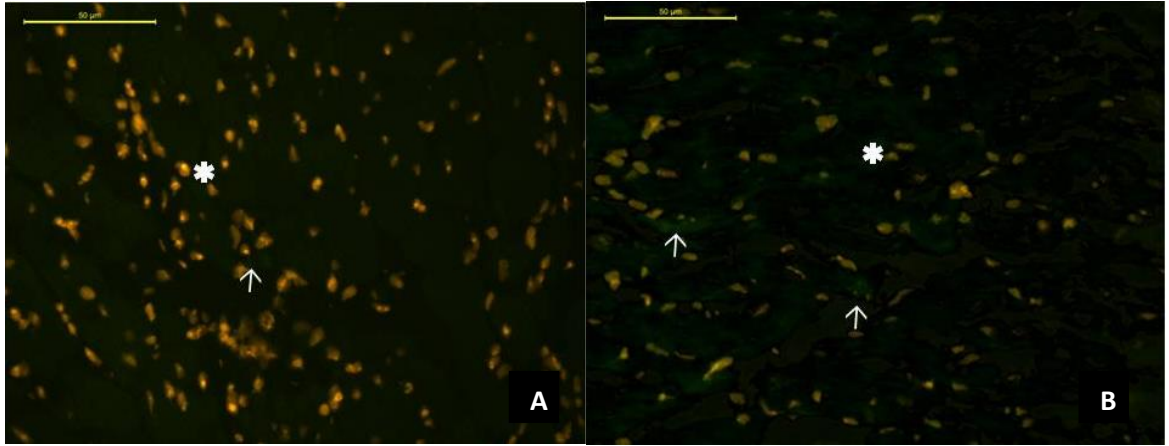
Şekil 4. 12. Aortada CML immunoreaktivitesi **A.** negatif kontrol **B.** S; Stres **C.** D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres **D.** D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres. ➤: elastik lamel, * : çekirdek, ➤: CML tutulumu, ⇨: düz kas hücre sitoplazması (IF ve etidiyum bromür x 400).



Şekil 4. 13. : Aortada kaspaz-3 immunoreaktivitesi **A.** D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres. **B.** D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres. ➤: elastik lamel, * : çekirdek, ➤: kaspaz-3 tutulumu, ⇨: düz kas hücre sitoplazması (IF ve etidiyum bromür x 400).



Şekil 4. 14. Kalpte CML immunoreaktivitesi **A.** S; Stres **B.** D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres. *****: çekirdek, **→**: CML tutulumu (IF ve etidiyum bromür x 400).



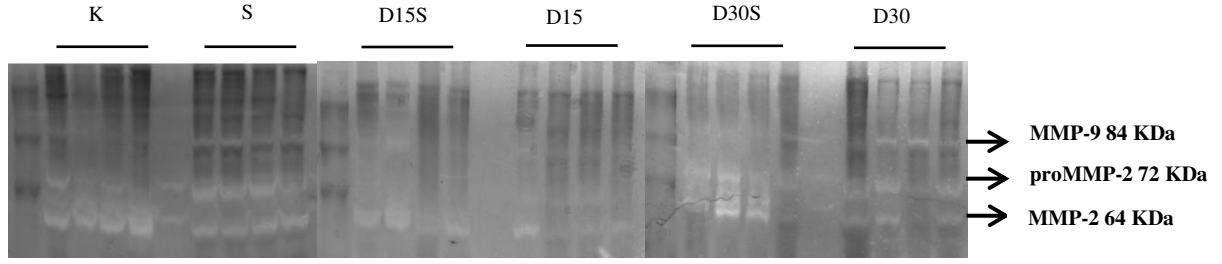
Şekil 4. 15. Kalpte kaspaz-3 immunoreaktivitesi **A.** S; Stres **B.** D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres. *****: çekirdek, **→**:kaspaz-3 tutulumu (IF ve etidiyum bromür x 400).

4. 5. Matriks Metalloproteinaz Aktivitesi

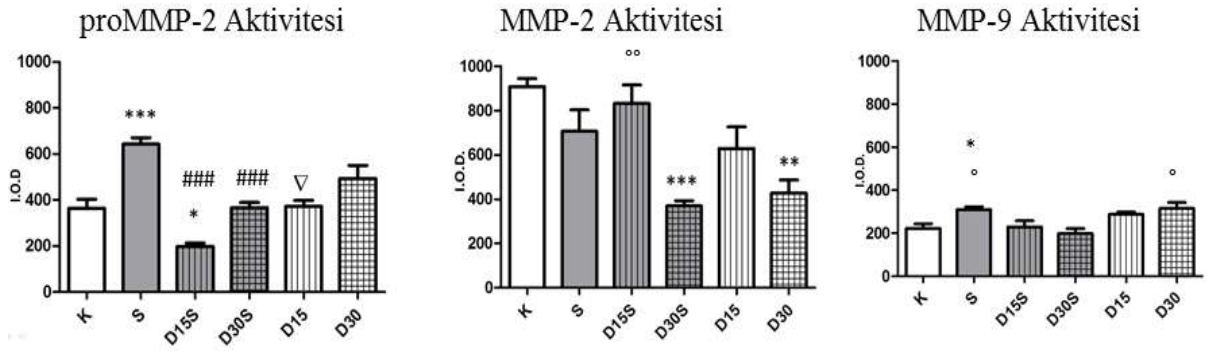
Jelatin zimografi yöntemi ile sıçanların aortalarında matriks metalloproteinaz aktivitesi ölçüldü. Stres grubunda MMP-9 ve daha belirgin olarak proMMP-2 aktivitelerinde artış saptandı. Stres grubundaki MMP-2 aktivitesi ise kontrolden farklı değildi. MMP-9 aktivitesi D30S grubunda, D30 grubuna göre baskılanmış bulundu. MMP-2 aktivitesi D30S ve D30 gruplarında kontrole göre azalırken 15 mg/kg/gün doksisisiklin uygulanan D15S ve D15 gruplarında MMP-2 aktivitesinde bir değişiklik olmadı.

Stres grubunda artan proMMP-2 aktivitesi D15S, D15 ve D30S gruplarında azalmış bulundu. D15S grubundaki proMMP-2 aktivitesinin kontrol ve D15 gruplarına göre de daha düşük düzeyde olduğu saptandı (Şekil 4. 16 A, B).

A.



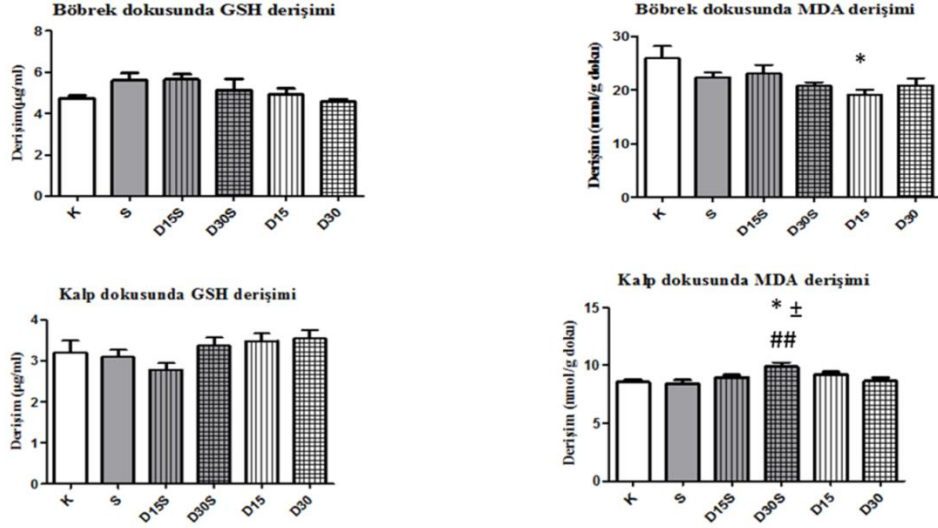
B.



Şekil 4.16. A. Zimografi jeline ait örnek gösterim (MMP-9; 84 KDa, proMMP-2; 72 KDa, MMP-2; 64 KDa). **B.** Aorta dokusunda proMMP-2, MMP-2, MMP-9 aktiviteleri. Ölçümler *Integrated optical density* (IOD) olarak yapılmıştır. (K; Kontrol, $n=4$, S; Stres, $n=4$, D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=4$, D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=4$, D15; doksisisiklin (15 mg/kg/gün), $n=4$, D30; doksisisiklin (30 mg/kg/gün), $n=4$). Dikey çubuklar O. S. H.'yı belirtmektedir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ K'e göre, ### $p<0.001$ S'e göre, ° $p<0.05$, °° $p<0.01$ D30S'e göre, ∇ $p<0.05$ D15S'e göre.

4. 6. GSH ve MDA Düzeyleri

Stres ve/veya doksisisiklin uygulamalarının oksidan denge üzerindeki etkilerini değerlendirmek için böbrek ve kalp dokularında GSH ve MDA düzeyleri ölçüldü. D15 grubunda, böbrek dokusunda MDA derişimi kontrole göre azalmış, kalp dokusunda, D30S grubunda MDA derişimi K, S, D30 gruplarına göre artmış olarak saptandı. Sıçanların böbrek ve kalp dokularında ölçülen GSH derişimleri arasında bir fark bulunmadı (Şekil 4.17).



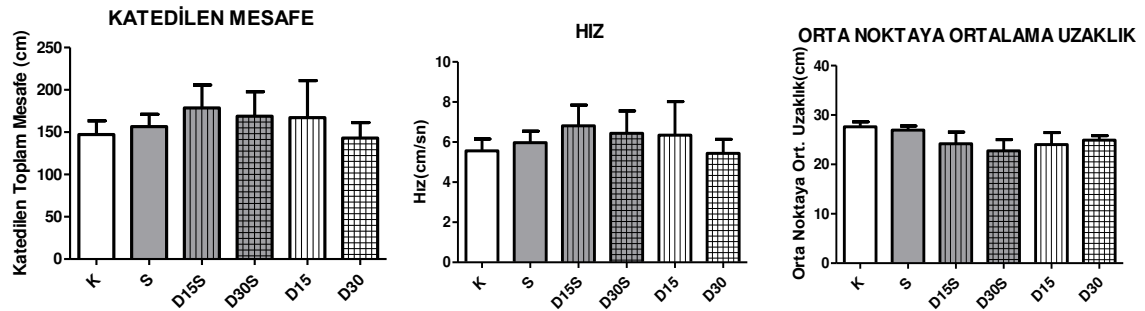
Şekil 4.17. Sıçanların deney sonu böbrek ve kalp dokularında ölçülen glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) derişimleri. Dikey çubuklar O. S. H.' yı belirtmektedir. (K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$, D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$, D15; doksisisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisisiklin (30 mg/kg/gün), $n=8$). * $p<0.05$ K'e göre, ## $p<0.01$ S'e göre, $\pm p<0.05$ D30'a göre.

4. 7. Davranış Testleri

Stres ile anksiyete arasındaki ilişkiyi inceleyerek kullanılan stres modelinin geçerliliğini değerlendirebilmek amacıyla Açık Alan ve Yükseltilmiş Artı Labirent Testleri uygulandı.

4. 7. 1. Açık Alan

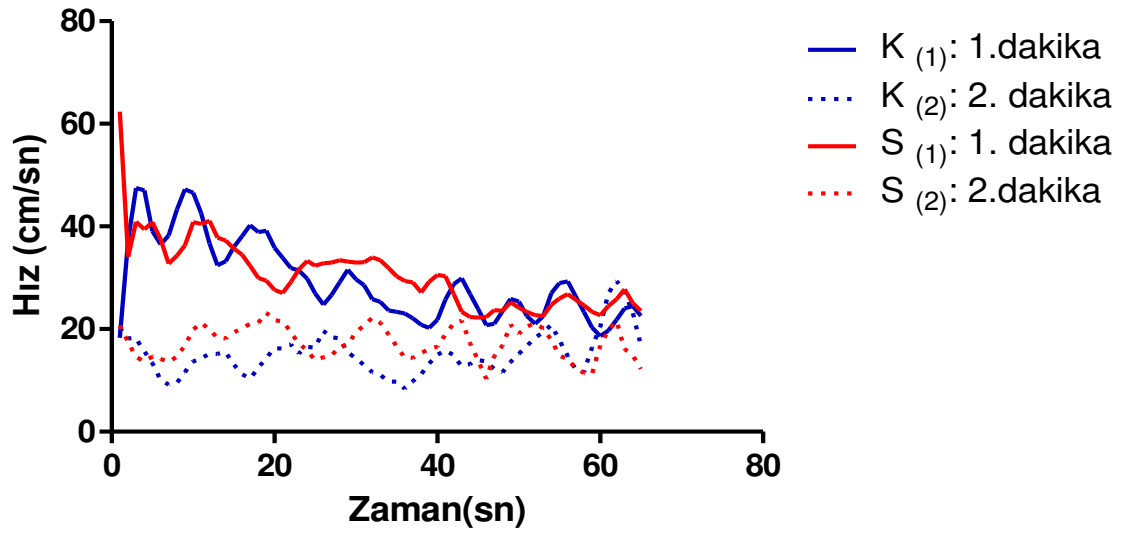
Açık Alan deneyinin değerlendirilmesinde sıçanların 120 saniye boyunca kat ettikleri mesafe, ortalama hızları, orta noktaya olan ortalama uzaklıkları gibi veriler karşılaştırıldı. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4. 18).



Şekil 4.18. Sıçanların Açık Alanda kat ettikleri ortalama toplam mesafe (cm), ortalama hız (cm/sn) ve orta noktaya ortalama uzaklıkları (cm). Dikey çubuklar O. S. H.' yı belirtmektedir. (K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$, D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$, D15; doksisisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisisiklin (30 mg/kg/gün).

Sıçanların Açık Alana adaptasyon sürecinin incelenen parametreleri etkileyebileceği varsayımı ile performans değerlendirmesi ilk ve ikinci dakika olarak ayrı ayrı yapıldı. Tüm sıçanların ilk dakikadaki ortalama hızlarının daha fazla olduğu, ikinci dakikada ise azaldığı saptandı. İlk dakikada D15S grubunun kontrole göre hızı artmış, ikinci dakikada ise D15S ve D30S gruplarının hızları stres grubuna göre artmış bulundu (Data gösterilmedi).

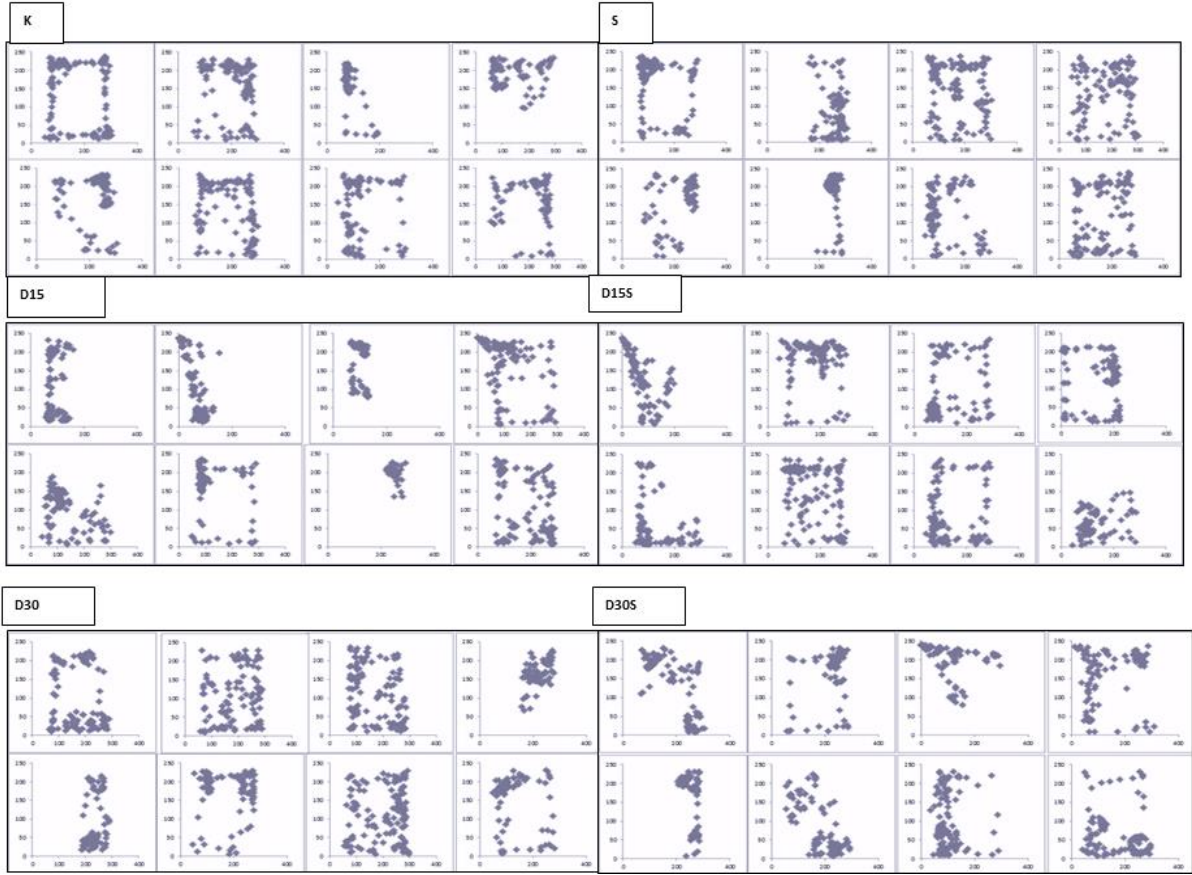
Stres ve kontrol gruplarının hız-zaman grafiği değerlendirildiğinde, her iki grubun da ikinci yarıda hızlarının azaldığı saptandı (Şekil 4.19).



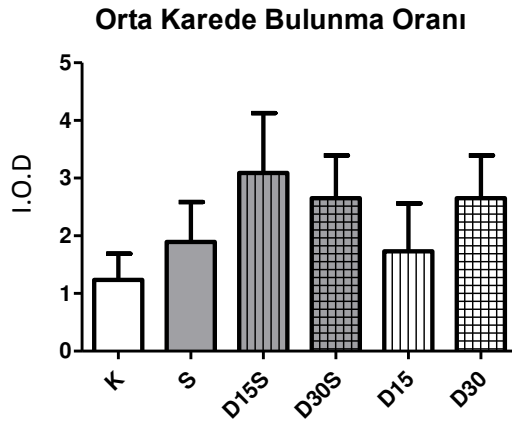
Şekil 4. 19. Stres ve kontrol gruplarının Açık Alanda 1. ve 2. dakikalardaki hızlarının zamana bağlı karşılaştırması. (K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$).

Sıçanların AA'da izledikleri yol değerlendirildi. AA'nın orta ve kenarlarında bulunma yoğunluğu ve AA'nın 4 kadrana girme sayıları karşılaştırıldığında gruplar arası fark saptanmadı. Ancak, D15S grubunun orta karede bulunma eğilimi diğer gruplara göre fazlaydı (Şekil 4. 20. A, B, C).

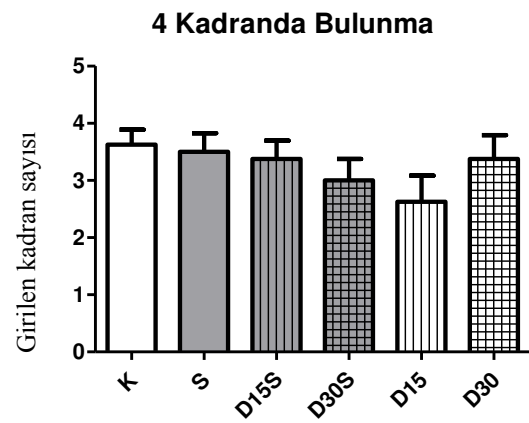
A.



B.



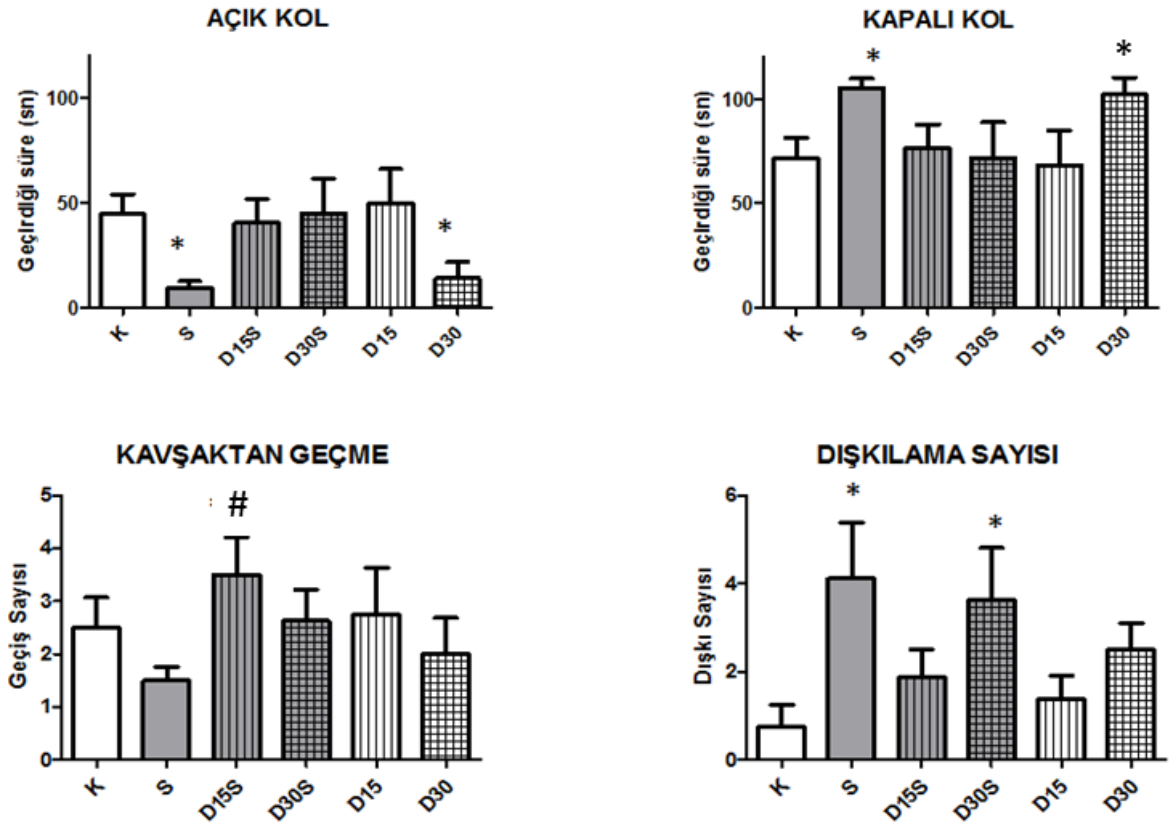
C.



Şekil 4. 20. Sıçanların Açık Alanda izledikleri yolda **A.** Orta 30X30 cm²'lik alanda bulunma yoğunluklarının karşılaştırılması. Ölçümler *Integrated optical density* (IOD) olarak yapılmıştır. **B.** AA 4 kadrana bölündüğünde sıçanların giriş yaptıkları kadrان sayısı. (K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$, D30S; doksisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$, D15; doksisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisiklin (30 mg/kg/gün). Dikey çubuklar O. S. H.'yı belirtmektedir.

4. 7. 2. Yükseltilmiş Artı Labirent

Sıçanların anksiyete durumlarının değerlendirilmesi için YAL'ın açık ve kapalı kollarında geçirdikleri süreler, kavşaktan geçme ve dışkılama sayıları değerlendirildi. Stres grubunun kapalı kolda geçirdiği zaman ve dışkı sayısı artma eğilimi gösterirken, kavşaktan geçme sayılarında azalma eğilimi saptandı. Ancak değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Şekil 4. 21)



Şekil 4. 21. Sıçanların Yükseltilmiş Artı Labirentin açık ve kapalı kollarında geçirdiği süreler (sn) ve kavşaktan geçme ve dışkılama sayılarının karşılaştırılması. (K; Kontrol, $n=8$, S; Stres, $n=8$, D15S; doksisisiklin (15 mg/kg/gün) + stres, $n=8$, D30S; doksisisiklin (30 mg/kg/gün) + stres, $n=7$, D15; doksisisiklin (15 mg/kg/gün), $n=8$, D30; doksisisiklin (30 mg/kg/gün). Dikey çubuklar O. S. H.'yı belirtmektedir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ K'e göre, # $p < 0,05$ S'e göre.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması ile sıçanlarda kronik hareket kısıtlama stresinin, izole torasik aortanın işlevsel durumuna etkisini incelerken, bu sürece katkıda bulunması beklenen etkenlerden AGE-ALE değişikliği, apoptotik değişiklikler ve anjiogenez sürecindeki değişiklikleri immunohistokimyasal olarak göstermek, aorta dokusundaki MMP-2, proMMP-2 ve MMP-9 aktivitelerinin ilişkisini saptamak, oksidan denge, kan şekeri ve glikasyonu belirlemek ve tüm bu süreçlerde doksisisiklinin olası koruyucu/önleyici etkisini ve bu etkinin dozla ilişkisini (15 ve 30 mg/kg/gün, *p.o.*, 60 gün) ortaya koymak amaçlandı. Kullanılan davranışsal stres modelinin sıçanlardaki anksiyete durumuna ve VA'larına etkileri de değerlendirilerek modelin literatürle uyumu doğrulandı (100, 119, 120, 130). Bu amaçlarla kronik hareket kısıtlama stresinin sıçanlarda kan glikoz düzeyini ve oksidatif stresi artırdığı, yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açtığı ve doksisisiklin tedavisinin dozla ilişkili biçimde bu değişikliklere karşı koruyucu olduğu varsayımları test edildi. Daha önce kullanılan stres modellerinde adaptasyonu en aza indirmek için beklenmedik hafif stres modelini günün değişken saatlerinde (09:00-12:00, 13:00-16:00) uygulama (121) veya hareket kısıtlama stresini 2 farklı odada değişmeli olarak uygulama (122) gibi çeşitli yöntemler bildirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan stres modeli de aynı kaygı ile günün farklı saatlerinde (09:00-18:00) uygulanan 15 gün boyunca günde ikişer saatlik hareket kısıtlama stresi olarak düzenlenmiştir. Sıçanlar nokturnal hayvanlardır, aktif dönemlerinin gece olduğu bilinmektedir. Buna rağmen stres uygulamalarının gündüz saatlerinde yapıldığını bildiren pek çok yayın vardır (100, 119, 127).

Doksisisiklin ile oluşan MMP inhibisyonunun subantimikrobiyal dozlarda gerçekleştiği bildirilmiştir (123). Bazı araştırmacılar sıçanlarda doksisisiklinin 15 mg/kg/gün (13), 30 mg/kg/gün (3, 18, 61, 124, 125, 126), 50 mg/kg/gün (81,127) dozlarında MMP inhibisyonu yaptığını ve buna bağlı etkilere yol açtığını, 3 ve 10 mg/kg/gün dozlarında ise bu etkiyi oluşturmadığını bildirmişlerdir (128, 129). Doksisisiklinin sıçanlarda 30 mg/kg/gün dozunda oral olarak uygulandığında 4,2 µM plazma konsantrasyonuna, 15 mg/kg/gün uygulandığında ise 2 µM plazma konsantrasyonuna ulaştığı (18), 4,2 µM plazma konsantrasyonunun ise insanda 100 mg/kg/gün oral dozun oluşturduğu plazma konsantrasyonuna denk olduğu bildirilmiştir (18). Bu tez çalışmasında kullanılan doksisisiklin dozlamı (15 ve 30 mg/kg/gün) yukarıda belirtilen çalışmaların sağladığı bulgulara göre belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan hareket kısıtlama stresinin uygulandığı 15 gün boyunca sıçanların VA'larında azalmaya neden olması literatürle uyumluydu (48,100). Stres uygulanan sıçanların VA'larında saptanan bu azalmanın, doğrudan strese bağlı olma ya da kullanılan stres modelinin doğası gereği, uygulama sırasında yemsiz kalmaktan kaynaklanma olasılığı düşünülse de Flak ve ark. tarafından yem kısıtlaması ile uygun eşleştirme yapılan sıçanlarda VA kaybının stres-kaynaklı olduğunu bildiren çalışma ile bu azalmanın stres sonucu olduğuna karar verildi (130). Stres uygulamasının yapıldığı 15 gün boyunca her üç grupta (S, D15S, D30S grupları) da VA'ları azaldı. Doksisiklin tedavileri bu azalmayı önlemedi. Stres uygulaması sonladıktan sonra, D30S grubu dışındaki gruplarda sıçanlar kaybettikleri VA'larını yeniden kazanırken, yüksek doz doksisiklin ve stres uygulanan bu gruptaki ağırlık kaybı deney sonuna kadar artarak devam etti. Bu durum, stres uygulanan sıçanlarda doksisiklinin 30 mg/kg/gün dozunda kullanıldığında katabolik bir duruma yol açtığını düşündürdü. Ancak literatürde doksisiklinin tek başına böyle bir etki oluşturduğu bilgisine rastlanmadı, hatta, az gelişmiş ülkelerde beslenme bozukluğu olan çocukların tedavisi ile ilişkilendirilmiş olduğu görüldü (131). Dolayısıyla, stres uygulaması olmaksızın tek başına aynı dozda doksisiklin uygulanan sıçanlarda böyle bir etkinin olmaması, bu grupta deney süresince VA'nın diğer gruplara göre yüksek seyretmesi, doksisiklinin "varsa" katabolik etkisinin oluşması için, stresin bir ön-koşul olduğunu düşündürdü.

Stres uygulamasının yapıldığı 15 günlük süre zarfında, tüm sıçanlarda bazal kan şekeri değerleri, stres uygulanan gruplarda ise ek olarak ilk gün ve 15. gün stres sonu kan şekeri değerleri ölçüldü. Stres uygulaması beklendiği gibi akut olarak kan şekerini yükseltti (132). Doksisiklinin, her iki dozunda da sadece tek seferlik uygulama ile strese bağlı kan şekeri artışını önlemesi dikkat çekiciydi. Ancak, 30 mg/kg/gün tek doz doksisiklin uygulamasının kontrol grubundaki bazal kan şekeri değerine göre daha yüksek bulunması bu aşamada açıklanamayan bir bulgu oldu. 15 gün süren kronik stres uygulaması sonunda tüm sıçanlarda kan şekeri değerlerinin benzer olması, stres ile indüklenen kan şekeri artışının strese verilen akut bir yanıt olduğunu, kronik uygulamada ise bu duruma adaptasyon geliştiğini gösterdi. Bu bulgu literatür ile uyumluydu (121, 130). Akut ve kronik streste plazma kortikosteron düzeylerinde artış olduğu bilinmektedir. Akut streste dışarıdan verilen deksametazonla kortikosteron düzeyleri baskılanamazken, kronik streste ise bu şekilde baskılama gerçekleşmektedir. Kronik streste hipokampusta glukokortikoidlerin pozitif geri besleme düzenlemesi önemli rol oynar. Kronik stres,

glukokortikoidlerin negatif geri besleme mekanizmasının bozulması ve beyinde glukokortikoid reseptörlerinin *downregulasyonu* ile ilişkilendirilmiştir (133, 134). Ayrıca kronik stresin dislipidemi (41) ve insülin rezistansına da yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmada stresle artan glukokortikoidlerin, insülin düzeyini de yükselterek kan şekerinin normal düzeyde kalmasını sağladığı düşünülmektedir. Ancak, bu çalışmada glukokortikoid ve insülin düzeyleri ölçülemediğinden bu iddia için nesnel bir kanıt sunulamamıştır.

HbA1 hemoglobinin α ve β zincirlerinin valin ve lizin kalıntılarına glikozun *non-enzimatik* olarak eklenmesi ile oluşur (80). Eritrositin glikasyona uğraması geri-dönüşsüz bir durumdur, dolayısıyla HbA1 son 8-12 haftalık dönemdeki glikasyonun pratik bir göstergesi olarak kabul edilir (135). HbA1'in bileşenleri HbA1a, HbA1b ve HbA1c'dir. Bu formlardan en fazla bulunanı HbA1c'dir (%60-80). HbA1c, diyabet hastalarının tedavisinde önemli bir göstergedir. HbA1c'deki %1'lik bir değişim kan glikozundaki yaklaşık %35 mg/dl değişikliği yansıtır (136). HbA1c son 2-3 aylık glisemik kontrolü gösterir. Bu değer %75 oranında son 2 ayı kapsamaktadır. Bu tez çalışmasında 15 günlük kronik stres uygulamasını ve 45 günlük bekleme sürecini de içerecek şekilde son 3 aylık kan şekeri düzeylerinin göstergesi olarak değerlendirilen HbA1c düzeyinin artmaması, stres nedeniyle oluşması beklenen Hb glikasyonunun yüksek düzeye ulaşmadığını göstermektedir. Bu çalışmada stresin akut etkisi ile artan kan şekeri düzeyinin kronik uygulamada normal değerlere dönmesi, yani bir adaptasyon sürecine girmesi HbA1c düzeyinin değişmemesini açıklayabilir. Ancak, literatürde farklı kronik stres modellerinde kronik süreçte de kan şekeri düzeylerinin yükseldiğini (137) veya stres boyunca glukokortikoidlerle düzenlenerek normal değerlerde seyrettiğini (133) bildiren yayınlar vardır.

Bu tez çalışmasında, stres ve/veya doksiziklin uygulamalarının neden olabileceği işlevsel değişiklikleri incelemek üzere gerçekleştirilen izole organ banyosu deneylerinde, stres uygulamasının endoteli korunmuş sıçan izole torasik aortasında FE ile oluşan izometrik kasılma yanıtlarını değiştirmedeği saptandı. Endoteli korunan preparatlardaki yanıtlar ile karşılaştırıldığında, endoteli sıyrılan damarlarda saptanan FE kasılma yanıtlarının K grubunda artarken, S grubunda değişmemesi, ilk bakışta stres uygulamalarının endotele hasar verdiğini düşündürdü. Nitekim, bu bulgular Sprague-Dawley sıçanlarda kronik hafif ön-görülemez stres modeli ile yakın zamanlarda gerçekleştirilen benzer bir çalışmanın bulguları ile uyumluydu (48). Oysa, stres uygulaması yalnızca endoteli hasarlamış olsaydı, tıpkı kontrol grubunda olduğu gibi, endotelsizleştirilenin NO'nun tonik gevşetici etkisini

ortadan kaldırması ve FE kasılmalarını artırması beklenirdi. Bu nedenle, stres uygulamasının, ilk bakışta endotel hasarına neden olduğu düşünülse de, bulguların birlikte değerlendirilmesi, stresin düz kasta yapısal ya da işlevsel bir değişikliğe de yol açarak gevşeme yanıtlarında tonik bir artışa neden olabileceğini düşündürdü. Nitekim, ACh ile oluşturulan NO-aracılı gevşeme yanıtlarının K ve S grupları arasında fark göstermemesi, uygulanan stres modelinin endoteli bozmadığını veya endotel hasarı yanısıra düz kas üzerinden çalışan gevşetici bir mekanizmayı da etkilediğini gösterdi. SNP kullanılarak yapılan deneylerde, eksojen NO kullanımıyla endotel hasarının oluşturduğu fark ortadan kaldırılarak, sadece düz kasla ilgili yollar sorgulandı. Ancak bu deneyler de stres nedeniyle düz kasta etkilenmiş olabileceği düşünülen gevşetici mekanizmayı açıklamak için yeterli olmadı. Bu deneyde non-spesifik gevşetici ve fosfodiesteraz inhibitörü papaverin, gevşetici ajan olarak kullanılsaydı stres ve kontrol grupları arasında oluşmuş olabilecek gevşeme farkı saptanabilirdi. SNP ile guanilat siklaz-siklik GMP yolağının sorgulanması, FE ile adenilat siklaz-siklik AMP yolağı üzerinden oluşan kasılmalarındaki farkı göstermek için yeterli olmadı. Ayrıca SNP ile tüm gruplarda zaten maksimum (% 100) gevşemenin sağlanmış olması, gevşeme yanıtlarının daha fazla artış göstermeyerek bazal değerlerin altına inmemesinin, yani SNP ile stres grubundaki gevşeme artışının gösterilememesinin diğer bir nedeni olabileceği düşünüldü. Farklı kasıcı ajanların (anjiyotensin-2, endotelin, prostaglandin F_{2α}, potasyum klorür) kullanılacağı deneylerin yapılmasının, stresin düz kas üzerindeki etkileri ve ilişkili olduğu mekanizmaların aydınlatılması için yararlı olacağı düşünüldü.

Bu tez çalışmasının önemli bulgularından biri, FE yanıtlarında stres ile bozulduğu düşünülen olası mekanizmanın, düşük doz (15 mg/kg/gün) doksisiklin tedavisi ile düzelmesi, yüksek doz (30 mg/kg/gün) doksisiklin tedavisinden ise etkilenmemesidir. Ayrıca, D30 grubunda gözlenen FE kasılma yanıtlarının D15 grubuna göre azalmış olması, yüksek doz doksisiklin uygulamasının aorta düz kasında kasılma mekanizmasını bozucu bir etki yapmış olabileceğini düşündürdü. ACh-aracılı gevşeme yanıtları değerlendirildiğinde, D15 grubunda gevşeme yanıtlarının K ve D30 gruplarına göre azaldığı, D15S grubunda D15 grubuna göre artma eğiliminde olduğu gözlemlendi. D15 grubunda ACh ile alınan bu yanıtlar, daha önce sıçanlarda yapılan, DM'de oluşan oksidatif stres nedeniyle bozulan, endotel fonksiyonunun doksisiklin 30 µmol/kg (~15 mg/kg) tedavisiyle önlendiği/iyileştiğini bildiren bir çalışma ile çelişkiydi (129).

eNOS inhibisyonu yapıldığında ACh gevşeme yanıtlarının endotelli preparatlarda D30S grubunda S grubuna göre azalmış olması anlamlandırılmadı. Ancak endotelsiz preparatlarda ACh ile oluşturulan gevşeme yanıtlarının S ve D30 gruplarında K grubuna göre artmış olması, bu iki uygulamanın da düz kasta ACh ile oluşabilecek gevşetici bir mekanizmayı tetiklediğini düşündürdü. Endotelli preparatlarda eNOS'un inhibe edildiği durumdaki ve endotelsiz preparatlardaki ACh gevşeme yanıtları karşılaştırıldığında bir fark saptanmaması ise L-NAME'in etkisinin *non*-spesifik olması ihtimalinden uzaklaştırdı. NOS inhibitörü kullanılan endotelsiz preparatlarda ACh'in yüksek konsantrasyonlarında elde edilen gevşeme yanıtlarının, D30 grubunda D15 grubuna göre, D30S grubunda K grubuna göre artmış olması, yani D30 ve D30S'e yapılan uygulamaların aynı yönde etki etmiş olması yine endotelden bağımsız olarak bu uygulamaların düz kasta gevşetici bir mekanizmayı çalıştırdığını düşündürdü. L-NAME varlığında NOS substratı L-arjinin ile gevşeme yanıtları elde edilirken, beklenenin aksine NO oluşumunda substrat olarak kullanılmayan D-arjinin ile de gevşeme yanıtlarının oluşması ve bu gevşemelerin stres uygulanan gruplarda daha belirgin olması dikkat çekiciydi. Arjininin moleküler yapı olarak α_2 -AR agonistlere benzerlik göstermesi, elde edilen bu gevşemelerle ilişkilendirildi. Bu bulgularla stres uygulamasının aortada postsinaptik α_2 -AR'lerin (138) *upregulasyonuna* yol açmış olabileceği ve stres uygulanan gruplara D-arjinin uygulamasının α_2 -AR agonistik bir etki ile aortada gevşeme yanıtlarına neden olabileceği görüşü öne sürülebilir. Bu bulgu, FE ile kasılma yanıtlarında saptanmış olan S grubundaki kasılma yanıtlarının K grubundaki kasılma yanıtlarına göre artmamış olmasıyla örtüşüyordu. FE ile elde edilen kasılma yanıtlarında K ve S gruplarının oluşturduğu konsantrasyon-yanıt eğrileri EAA'ların farkı açısından değerlendirildiğinde S grubunda bu farkın olmaması "endotel dışında gevşetici bir mekanizmanın stres nedeni ile artmış olabileceği" bu mekanizmanın da α_2 -AR *upregülasyonu* olma ihtimalini destekler nitelikteydi.

İzole organ banyosunda kullanılan *Krebs Hanseleit* solüsyonu deney boyunca indometazin içerdiğinden elde edilen bulgular prostanooidlerin olası etkileri dışlanarak yorumlandı.

Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun aorta dokusu üzerinde belirgin bir etki oluşturmadığı laboratuvarımızda DA 09/14 proje nolu tez çalışması (139) ile gösterildiğinden bu kimyasal ajan için ek bir deney yapılmadı.

Bu tez çalışmasında kullanılan kronik stres modeli ile glukokortikoid düzeylerinin artmış olduğu düşünülmektedir. Artmış glukokortikoidlerin α_1 *upregulasyonuna* neden olduğuna

dair bu tez çalışmasının bulguları ile ters düşen kanıtlar mevcuttur (140). G. Flügge ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmalar kronik stres uygulaması ile glukokortikoidlerin artışına bağlı beyinde α_2 -AR'lerin *upregüle* olduğu, stresin etkilerini taklit etmek için dışardan verilen kortizol uygulaması ile de bu *upregulasyonun* gerçekleştiği, kortizolün kısa süreli uygulanmasının α_2 -AR'lerde *downregulasyona*, uzun süreli uygulanmasının α_2 -AR'lerde *upregulasyona* yol açtığı gösterilmiş, uzun süreli stresin etkilerinin tek sorumlusunun glukokortikoidler olmadığı sonucuna varılmıştır (141). Kronik psikososyal stresle α_2 -AR'lerin A alt tipinin kalıcı, C alt tipinin ise geçici olarak *upregülasyona* uğradığı gösterilmiştir (141). Bu tez çalışması kardiyovasküler sistemde kronik stresin bilinen endotel bozucu ve α_1 -AR *upregülasyonu* oluşturan etkileri olabileceğine dair bulgularla çelişki göstermektedir. Bu durumu açıklayabilmek için α_2 -AR agonistleri kullanılarak yapılacak fonksiyonel ve reseptör düzeylerini belirleyecek yapısal araştırmalara gereksinim vardır.

Kronik stresin ve/veya doksisisiklinin oksidatif duruma etkisi böbrek ve kalp dokularındaki GSH ve MDA derişimleri ile değerlendirilmiştir. Böbrek dokusunda MDA derişimi D15 grubunda K grubuna göre düşük saptanmış, bu durum D15 uygulamasının antioksidan bir etki göstermiş olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir. Kalpte ise stres uygulaması ve günde 30 mg/kg doksisisiklin MDA derişimini yükseltmiş ve D30S, S, D30 gruplarında yüksek MDA derişimleri saptanmıştır. Bu tez çalışması kronik stresin uzun süreli etkilerini incelemek üzere tasarlandığından, tüm değerlendirmeler 15 günlük stres sonrası *Mailard* reaksiyonu, *Amadori* ürünleri ve AGE/ALE oluşumu için 45 gün süre bırakıldıktan sonra yapılmıştır. Oksidan-antioksidan denge hakkında bilgi veren GSH ve MDA derişimlerinin saptanması bu süreç sonunda gerçekleştiğinden kronik stresin akut etkilerini yansıtmamaktadır. Oysa kronik stresin hemen ardından beklenen; GSH düzeyinin azalıp, MDA'nın artışı (91, 93, 142, 143) ve doksisisiklinin düşük konsantrasyonlarında bu etkiyi engellemesiydi. Kronik stres uygulamalarının oksidatif hasarı artırması, adaptasyon sürecinde ise antioksidan bileşiklerde bir artış olduğu bilinmesi (143) bu çalışmanın bulgularıyla kısmen örtüşmektedir. Doksisisiklin ise özellikle düşük dozda, antibiyotik etkisinden bağımsız olarak, içerdiği fenol halkası aracılığıyla ROS süpürücü etkiler göstermektedir (60), ROS süpürücü etkisi ile MMP inhibitörü etkisi arasında birbirlerini artırıcı bir ilişki vardır (18). Artmış oksidatif stres MMP'leri aktive eder (123, 144). Doksisisiklinin hem ROS süpürücü hem de MMP inhibitörü etkisi ile oksidatif hasarın engellenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (64).

Bu tez çalışmasında stres proMMP-2 ve MMP-9 aktivitesinde artışa yol açmıştır. Stres grubunda sadece akut bir etki olarak saptanan, HbA1c düzeylerine yansımayan hiperglisemik durumun MMP aktivitesini artırması olasıdır, hipergliseminin endotel hücrelerinde MMP-9 aktivitesini artırdığı bilinmektedir (145). Kronik stresle meydana gelen oksidatif stres artışının bu aktivite artışına neden olduğu düşünülmektedir (145, 146, 147, 148). D15S grubunda yine proMMP-2 düzeylerinin K ve S gruplarına göre azalmış olması, 15 mg/kg/gün doksisisiklin uygulamasının inhibitör etkisini göstermektedir. D30S grubunda ise proMMP-2 aktivitesi S grubuna göre daha da azaldı, MMP-2 aktivitesi de inhibe oldu. MMP-2'nin çeşitli kardiyak durumlarda artmış oksidatif stresle ilişkisi kanıtlanmıştır (144, 149). Bu çalışmada stres grubunda MMP-2 aktivitesinde azalma eğilimi MMP aktivitesi ölçümünün yapılmasına kadar geçen süreç içinde proteinazların doku inhibitörlerinin (TIMP) MMP aktivitesini baskılamış olabileceğini düşündürmektedir (145, 149). MMP-2 aorta hücrelerinden proMMP-2 olarak salgılanmış ancak TIMP'lerin baskılama mekanizması nedeniyle MMP-2 aktivitesinde azalma ortaya çıkmış olabilir. TIMP'ler ve MMP'ler arasında vücutta doğal bir denge vardır (3, 76). MMP-2'nin peroksinitrit ve glutasyon ile güçlü bir şekilde düzenlendiği bilinmektedir (146). Kronik strese yanıt olarak gelişen farklı işlevsel mekanizmalar stresin erken dönemi ve uzun zaman sonrasında gelişmiş olabilecek farklılıkları göstermektedir (150). D15 grubunda ayrıca proMMP-2 aktivitesi S grubuna göre çok daha düşük bulundu.

Stres ve/veya doksisisiklin uygulamasının aorta ve kalp dokusunda CML birikimi üzerine etkisinin değerlendirilmesi için yapılan immunohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, her ne kadar CML birikimine bağlı izlenen immunoreaktivite, D15S grubunda çok zayıf, D30 grubunda zayıf, stres grubunda ise daha güçlü olsa da, bu kadar veri ile genelleme yapmak doğru olmayacağından bir yorum yapılamadı.

Bu çalışmanın amaçlarından biri, kronik stres nedeni ile bozulması beklenen yara iyileşmesinin doksisisiklinin antioksidan, MMP inhibitörü ve AGE/ALE oluşumunu azaltıcı etkileri sayesinde düzelme (40) göstermesini anjiyogenez durumunu değerlendirerek saptamaktır. Ancak yöntemden kaynaklanan nedenlerle bu değerlendirme yapılamadı. Kronik davranış stresinin cAMP-PKC yolağını aktive ederek β_2 -AR'ler aracılığıyla doku katekolaminlerini artırdığı ve VEGF, MMP-2, MMP-9 aktivitelerinde artışa neden olduğu, anjiyogenik süreç aracılı etkilerin ortaya çıktığı bilinmektedir (148). Stres anjiyogenezi indükler anormal MMP aktivitesine neden olur. Oysa yara iyileşmesi ve skar dokusu oluşumu MMP aktivitesi açısından inhibisyon ve aktivasyonlarla düzenlenmiş hassas bir

optimizasyon gerektirmektedir (151). Farklı zamanlama ve dozlarla MMP inhibitörlerinin doku *remodelingi* üzerine etkileri çeşitlidir (28, 125, 152, 153). Doksisisiklinin antianjiyogenik etkisini kanıtlayan pek çok çalışma vardır (152, 154). Bu noktada yara oluşturularak indüklenmiş anjiyogenezde MMP inhibitörlerinin doğru zamanlama ve sürelerde kullanımını düzenleyebilmek için çalışmalar yapmak gerekmektedir.

Kronik stresin apoptozisi artırarak çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde yer aldığı, doksisisiklinin ise anti-apoptotik etkisi ile koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir (6, 25). Ancak bu çalışmada planlanan stres ve/veya doksisisiklinin kalp ve torasik aortada apoptozis üzerine etkileri kullanılan immunohistokimyasal boyama yöntemiyle aorta kesitlerinde kaspaz-3 antikoruna ile yapılan boyamalarda D15 grubunda sitoplazmada özgün olmayan immunoreaktivite, D30 grubunda ise düz kas hücre çekirdeklerinin çevresinde immunoreaktivite belirlenmiş olsa da değerlendirme yapmak için bu bulgular yeterli olmadı.

Yapılan uygulamaların davranışlar üzerindeki etkisi AA ve YAL ile değerlendirildiğinde, AA ile gruplar arasında saptanamayan farkların YAL ile ortaya çıkması, yöntemler arasında kullanılan model için duyarlılık farkı olabileceğini düşündürdü. Tüm gruplarda AA'da izlenen sıçanların hızlarında 2. dakikada azalma saptanması sıçanların ilk dakikadaki ortama adaptasyonunun göstergesi olarak değerlendirildi. Sıçanların AA'da izledikleri yol haritasının değerlendirilmesi ile gruplar arası fark saptanmazken D15S grubunun diğer gruplara göre orta karede daha yoğun olarak bulunma eğilimi dikkat çekiciydi.

YAL'de S grubunun daha çok kapalı kolu tercih etmesi ve kavşaktan geçiş sayılarında saptanan azalma stres sonucu artmış anksiyetenin bir göstergesidir. Bu durum artmış oksidan hasarın bir sonucu olabilir. Nitekim, aynı bulguyu veren çalışmalarda eşzamanlı ölçülen GSH düzeylerinde azalma, MDA düzeylerinde artma gösterilmiştir (93, 137, 143). Bu çalışmada oksidatif durum belirteçlerinin AGE/ALE varlığı ile bağlantısı değerlendirilmek istendiğinden ölçüm zamanı deneyin 60. günü olarak belirlenmiş ve 17. günde gerçekleştirilen davranış deneyleri ile bu bağlantı kurulamamıştır. D30 grubu YAL'da S grubuna benzer şekilde kapalı kolu tercih etmiştir. D15S grubunda ise kavşaktan geçme sayısı artış göstermiştir. Bu bulgunun açık alanda D15S grubunun orta kareyi diğer gruplara göre tercih ediyor eğiliminde olması ile uyum göstermesi dikkat çekici olup günde 15/mg/kg doksisisiklin tedavisinin, stresin oluşturduğu anksiyete etkisi

üzerine koruyucu bir rol oynayabileceği fikrine yaklaştırmaktadır. Stres grubunda dışkılama sayısında artış literatür ile uyum göstermektedir. Günde 15 mg/kg doksisisiklin uygulaması bu değeri kontrole yaklaştırırken, günde 30 mg/kg doksisisiklin uygulanan gruplarda dışkılama sayısının artmış olması, düşük dozun stresin etkilerini azaltırken yüksek dozun böyle bir etkisi olmadığını, hatta gastrointestinal sistem üzerine motiliteyi artırıcı etki yapıyor olabileceğini düşündürdü.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sonuçlar

1. Kronik stres uygulaması VA kaybına yol açtı. Stres beraberinde uygulanan doksisisiklinin 30 mg/kg/gün dozu bu kaybı artırdı.
2. Stres uygulaması akut dönemde kan şekeri değerlerini artırdı. Ancak kronik dönemde stres ve/veya doksisisiklin uygulamaları HbA1c değerlerini değiştirmedi. Bu durum glikasyonun ileri düzeyde olmadığına göstergesi olarak değerlendirildi.
3. Kronik stres, sıçan izole torasik aortalarında endotel hasarı yanında düz kas gevşeme yanıtlarında artırıcı bir etki yarattı. Bu etki üzerinde doksisisiklin 15 mg/kg/gün dozunda koruyucu olurken, 30 mg/kg/gün dozunda ise stres ile benzer etkiler saptandı.
4. Düşük doz doksisisiklin endotel için koruyucu etki gösterdi, yüksek doz ise düz kas kasılma mekanizmasını bozdu.
5. Doksisisiklin 30 mg/kg/gün uygulaması çalışma içeriğinde kullanılan tüm yöntemlerde genel olarak stres ile benzer etkiler gösterdi.
6. Yapılan davranış testleri ile, uygulanan kronik stresin anksiyeteyi artırıcı, doksisisiklin 15 mg/kg/gün uygulamasının ise anksiyeteye karşı koruyucu eğilimde olduğu saptandı.

Öneriler

1. Kronik stres uygulaması sonucu kan şekeri değerlerinin başlangıç değerleri ile aynı saptanması, glukokortikoid ve insülin salgılanmasında adaptasyon gelişmiş olabileceğini düşündürdü. Hormon düzeylerinin ölçüldüğü bir deney tasarımının mekanizmayı açıklayabilmek için yararlı olabileceği düşünüldü.
2. D-arjinin ile oluşan gevşeme yanıtlarının stres grubunda armış olması kronik stres uygulamasının α_2 -AR *upregulasyonuna* yol açmış olabileceğini, bunu kanıtlamak üzere α_2 -AR'leri belirleyecek, işlevsel ve yapısal araştırmaların gerekli olduğu sonucuna varıldı.
3. Oksidatif/anti-oksidatif durum, kronik stresten 45 gün sonra değerlendirildiğinden gelişen uyum süreci mekanizmaları nedeniyle, stresli gruplarda oksidatif belirteçlerin beklenen artışı gözlenmedi. Düşük doz doksisisiklinin anti-oksidan, yüksek doz doksisisiklinin ise oksidan etki eğiliminde olduğu saptandı.

4. Kronik stresin yol açtığı oksidatif stres proMMP-2 ve MMP-9 aktivitesinde artışa yol açtı, ancak MMP-2'nin normal saptanmasının nedeninin stres sonrası bekleme süreci nedeniyle gelişmiş olabilecek adaptif mekanizmalar olduğu şeklinde yorumlandı. Doksisisiklin MMP-2 aktivitesini inhibe ederken, MMP-9 aktivitesini inhibe etmedi. Bu karmaşık durumun, kronik strese karşı uzun dönemde gelişen, farklı uyum mekanizmalarından kaynaklandığı düşünüldü. Kronik stres ve/veya doksisisiklinin oksidatif durum ve MMP'ler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için ölçümlerin stres uygulamasının hemen ardından yapıldığı ek grupları içeren deneylerin gerekli olduğu düşünüldü.

7. KAYNAKLAR

1. Gross J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. NAS: Physiology: Gross and Lapierre*, 1014-1022, 1962.
2. Golub LM, Ramamurthy NS, Mcnamara TF, Greenwald RA. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown : new therapeutic implications for an old family of drugs. *Adv Dent Res*, 12: 12-26, 1998.
3. Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Uses of tetracyclines. *Am J Physiol Cell Physiol*, 3: 539-548, 2010.
4. Bendeck MP, Conte M, Zhang M, Nili N, Strauss BH, Farwell SM. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *American Journal of Pathology*, 160(3): 1089-1095, 2002.
5. Samtani S, Amaral J, Campos MM, Fariss RN, Becerra SP. Doxycycline-mediated inhibition of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50: 5098-5106, 2009.
6. Larrayoz IM, Luis A, Rua O, Velilla S, Cabello J, Martinez A. Molecular effects of doxycycline treatment on pterygium as revealed by massive transcriptome sequencing. *Plos One* 7(6): 1-14, 2012.
7. Kuhla A, Hettwer C, Menger MD, Vollmar B. Oxidative stress-associated rise of hepatic protein glycation increases inflammatory liver injury in uncoupling protein-2 deficient mice. *Lab Investig*, 90(8): 1189-1198, 2010.
8. Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC. Protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents, Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.12. edition, New York, The McGraw-Hill Companies, sayfa: 1522, yıl: 2011.
9. Golub LM, Ramamurthy NS, Namara TF. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 2(2): 297-322, 1991
10. Ryan ME, Usman A, Ramamurthy NS, Golub LM, Greenwald RA. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. *Curr Med Chem*, 8(3): 305-16, 2001.
11. Burns FR, Stack MS, Gray RD, Parerson CA. Inhibition of Purified Collogense from Alkali-Burned Rabbit Corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 30(7): 1569-1575, 1989.
12. Golub LM. Introduction and background. *Pharmacol Res*, 63(2): 99-101, 2011.
13. Yaras N, Sariahmetoğlu M, Bilginoğlu A, Turan B, Schulz R. Protective action of doxycycline against diabetic cardiomyopathy in rats. *British Journal of Pharmacology*, 155: 1174-1184, 2008.
14. Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines , inducers and inhibitors. *Oncology Reports*, 23: 605-614, 2010.

15. Davidson G. Compounding antiangiogenic cancer therapy for animals. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 9(3): 195-198, 2005.
16. Donato M, D'Annunzio V, Buchholz B, Miksztowicz V, Carrion CL, Valdez LB, Zaobornyj T. Role of matrix metalloproteinase-2 in the cardioprotective effect of ischaemic postconditioning. *Exp Physiol*, 95(2): 274-281, 2009.
17. Fingleton B. Matrix Metalloproteinases as Valid Clinical Targets, *Current Pharmaceutical Design*, 13: 333-346, 2007
18. Castro MM, Rizzi E, Ceron CS, Youssef N, Schulz R, Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. *Nitric Oxide*, 26(3):162-168, 2012.
19. Castro MM, Kandasamy AD, Youssef N, Schulz R. Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: Therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Pharmacological Research*, 64: 551-560, 2011.
20. Doroszko A, Hurst TS, Polewicz D, Sawicka J, Fert-bober J, Johnson DH. Effects of MMP-9 inhibition by doxycycline on proteome of lungs in high tidal volume mechanical ventilation-induced acute lung injury. *Proteome Science*, 8(3): 1-13, 2010.
21. Chang WYC, Clements D, Johnson SR. Effect of doxycycline on proliferation , MMP production , and adhesion in LAM-related cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 299: 393-400, 2010.
22. Stechmiller J, Cowan L, Schultz G. For nursing the role of doxycycline as a matrix metalloproteinase inhibitor for the treatment of chronic wounds. *Biol Res Nurs*, 11(4): 336-344, 2010.
23. Chung AWY, Yang HHC, Radomski MW, Breemen C Van. Long-term doxycycline is more effective than atenolol to prevent thoracic aortic aneurysm in marfan syndrome through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Journal of the American Heart Association*, 102: 73-85, 2008.
24. Cena JJ, Lalu MM, Cho WJ. Inhibition of matrix metalloproteinase activity in vivo protects against vascular hyporeactivity in endotoxemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298: 45-51, 2010.
25. Lai H, Yeh Y, Ting C, et al. Doxycycline suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and cellular apoptosis in mouse hearts. *Eur J Pharmacol*, 644(1-3): 176-187, 2010.
26. Yeh Y, Lai H, Ting C, Lee W. Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes. *Biochemical pharmacology*, 74: 969-980, 2007.
27. Lee CZ, Xue Z, Hao Q, Yang G. Nitric oxide in VEGF-induced focal angiogenesis and matrix metalloproteinase-9 activity in the mouse brain. *NIH Public Access*, 40(8): 2879-2881, 2010.
28. Sun YAO, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med*, 135(4): 316-324, 2000.

29. Grossi SG, Skrepcinski FB, Decaro T. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol*, 68: 713-719, 1997.
30. Starke EML, Smoot JC, Smoot LM. Technology development to explore the relationship between oral health and the oral microbial community. *BMC Oral Health*, 8: 1-8, 2006.
31. Stewart JE, Wager KA. The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, 28: 306-310, 2001.
32. Engebretson SP, Hey-Hadavi J. Sub-antimicrobial doxycycline for periodontitis reduces hemoglobin A1c in subjects with type 2 diabetes: a pilot study. *Pharmacol Res*, 64(6): 624-629, 2011.
33. Singh S, Kumar V, Kumar S, Subbappa A. The effect of periodontal therapy on the improvement of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled clinical trial. *Int J Diabetes Dev Ctries*, 28(2): 38-44, 2008.
34. Frankwich K, Tibble C, Torres-Gonzalez M, Bonner M, Lefkowitz R, Tyndall M, Schmid-Schönbein GW, Villarreal F, Heller M, Herbst K. Proof of concept: matrix metalloproteinase inhibitor decreases inflammation and improves muscle insulin sensitivity in people with type 2 diabetes. *Journal of Inflammation*, 9(35): 1-22, 2012.
35. Mohammad G, Kowluru RA. Matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy and mitochondrial dysfunction. *Lab Investig*, 90(9): 1365-1372, 2010.
36. Yi C, Zhang Z, Wang W. Doxycycline attenuates peripheral inflammation in rat experimental autoimmune neuritis. *Neurochem Res*, 36: 1984-1990, 2011.
37. Srikanth V, Maczurek A, Phan T, Steele M, Westcott B, Juskiw D, Münch G. Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiology Of Aging*, 32 (5): 763-77, 2011.
38. Kalousov M, Skrha J. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutation Research*, 579: 37-46, 2005
39. Iwashige K, Kouda K, Kouda M, Horiuchi K, Takahashi M. Calorie restricted diet and urinary pentosidine in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science*, 23: 19-24, 2004.
40. Tamarat R, Huijberts M, Benessiano J, Ebrahimian TG. Blockade of advanced glycation end-product formation restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14): 8555-8560, 2003.
41. Miyata T. Autoxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: Is there oxidative stress in uremia? *Kidney International*, 54: 1290-1295, 1998.
42. Thorpe SR, Baynes JW. Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives, Review Article. *Amino Acids*, 25: 275-281, 2003.
43. Pamplona R. Chemico-biological interactions advanced lipoxidation end-products. *Chem Biol Interact*, 192(1-2): 14-20, 2011.

44. Thornalley PJ. The enzymatic defence against glycation in health, disease and therapeutics: a symposium to examine the concept. *Biochemical Society Transactions*, 31(6): 1341-1342, 2003.
45. Tang WH, Martin KA, Hwa J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus, *Frontiers in Pharmacology*, 2,3:1-8, 2012.
46. Yoh K, Hirayama A, Ishizaki K, et al. Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. *Genes to Cells*, 13: 1159-1170, 2008.
47. Nirupama R, Devaki M, Yajurvedi HN. Chronic stress and carbohydrate metabolism : Persistent changes and slow return to normalcy in male albino rats. *Stress*,15: 262-271, 2012.
48. Neves VJ, Moura MJCS, Almeida BS, Costa R, Sanches A, Ferreira R. Chronic stress, but not hypercaloric diet, impairs vascular function in rats. *Stress*,15: 138-148, 2012.
49. Atalay M, Bilginoglu A, Kokkola T. Treatments with sodium selenate or doxycycline offset diabetes-induced perturbations of thioredoxin-1 levels and antioxidant capacity. *Mol Cell Biochem*, 351: 125-131, 2011.
50. Kovacheva-Ivanova S, Bakalova R, Ribarov SR. Immobilization stress enhances lipid peroxidation in the rat lungs immobilization. *Gen Physiol Bioph*, 13: 469—482 1994.
51. Neves VJ, Moura MJCS. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: Altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. *Stress* 906:343-400, 2008.
52. Ginns LC, Roberts DH, Mark EJ, Brusch JL, Marler JJ. Pulmonary capillary hemangiomatosis with atypical endotheliomatosis. *CHEST*, 124(5): 2017-2022, 2003.
53. Kalas W, Rybka J, Swiderek E, Ziolo E, Rybka W, Gamian A. H-Ras increases release of sphingosine resulting in down-regulation of TSP-1 in non-transformed cells. *Int. J. Exp. Path*, 93: 202-209, 2011.
54. Atif F, Yousuf S, Agrawal SK. Restraint stress-induced oxidative damage and its amelioration with selenium. *Eur J Pharmacol*. 600(1-3): 59-63, 2008.
55. Şahin E, Gümüşlü S. Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization–cold). *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34: 425-431, 2007.
56. Zafir A, Banu N. Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 46: 53-58, 2009.
57. Burggraf D, Trinkl A, Dichgans M, Hamann GF. Doxycycline inhibits MMPs via modulation of plasminogen activators in focal cerebral ischemia. *Neurobiology of Disease*, 25: 506-513, 2007.
58. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 86: 494-501, 2000.

59. Hoyt JC, Ballering J, Numanami H, Hayden JM, Robbins RA. Doxycycline modulates nitric oxide production in murine lung epithelial cell. *J Immunol*, 176: 567-572, 2006.
60. Kraus RL, Pasieczny R, Lariosa-Willingham K, Turner MS, Jiang A, Trauger JW. Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. *Journal of Neurochemistry*, 94: 819-827, 2005.
61. Meli DN, Coimbra RS, Erhart DG, Loquet G, Bellac CL, Tauber MG. Doxycycline reduces mortality and injury to the brain and cochlea in experimental pneumococcal meningitis. *74(7): 3890-3896*, 2006.
62. Yrjänheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci*, 96(23): 496-500, 1999.
63. Yrjänheikki J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Neurobiology*, 95: 15769-15774, 1998.
64. Antonio RC, Ceron CS. Antioxidant effect of doxycycline decreases MMP activity and blood pressure in SHR. *Mol Cell Biochem*, 386: 99-105, 2014.
65. Malara B, Ko JJ, Tyrpień M, Malara P, Stęplewska K. Dynamics of changes in vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and angiogenesis in stress induced Gastric ulceration in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56(2): 259-271, 2005.
66. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 9(2): 267-285, 2005.
67. Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD. Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein*, 49(1-3): 138-62, 1996.
68. Tamargo RJ, Bok RA, Brem H, Brem H. Angiogenesis inhibition by minocycline. *Cancer Res*, 51: 672-675, 1991.
69. Hanemaaijer R, Visser H, Koolwijk P. Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chemically modified tetracycline (CMTs) in human endothelial cells. *Adv Dent Res*, 12: 114-118, 1998.
70. Fink KB, Khan SQ, Stieg PE. Reduction of post-traumatic brain injury and free radical production by inhibition of the caspase-1 cascade. *Neuroscience*, 94(4): 1213-1218, 1999.
71. Friedlander BRM, Gagliardini V, Hara H. Expression of a dominant negative mutant of interleukin-1 converting enzyme in transgenic mice prevents neuronal cell death induced by trophic factor withdrawal and ischemic brain injury. *J Exp Med*, 185(5): 933-940, 1997.
72. Li M, Ona VO, Chen M, Kaul M. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury, *Neuroscience*, 99(2): 333-342, 2000.
73. Mejia ROS, Li M, Friedlander RM. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction, *Neurosurgery*, 48(6): 1393-1401, 2001.

74. Chen M, Vonsattel J, Riedlander ROMF. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine*, 6(7): 797-801, 2000.
75. Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, 417: 74-78, 2002.
76. Nagase H, Woessner JF, Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 21491–21494, 1999.
77. Dollery CM, Ewan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*, 77: 863-868, 1995.
78. Creemers EJM. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *American Heart Association*, 89: 201-210, 2001.
79. Peyroux J, Sternberg M. Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathologie Biologie*, 54: 405-419, 2006.
80. Rahbar S. The Discovery of glycated hemoglobin. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1043: 9-19, 2005.
81. Singh LP, Mishra A, Saha D, Swarnakar S. Doxycycline blocks gastric ulcer by regulating matrix metalloproteinase-2 activity and oxidative stress, *World J Gastroenterol*, 17(28): 3310-3321, 2011.
82. Turk Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. *Physiol Res*, 59: 147-156, 2010.
83. Pamplona R. *Biochimica et Biophysica Acta* Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777:1249-1262, 2008.
84. Barja G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Research*, 10(2): 215-224, 2007.
85. Vereb G, Matko J, Ma L. Dynamic, yet structure: The cell membrane three decades after the Singer – Nicolson model, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14): 8053-8058, 2003.
86. Wallis JG, Watts JL, Browse J, Wallis JG, Watts JL, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27(9): 467-473, 2002.
87. Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death : metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev*, 87: 1175-1213, 2007.
88. Qian M, Liu M, Eaton JW. Transition metals bind to glycated proteins forming redox active “glycochelates”: implications for the pathogenesis of certain diabetic complications, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250:385-389, 1998.

89. Koob GF, Corticotropin-Releasing Factor, Norepinephrine and Stress, *Biol Psychiatry*, 46: 1167-1180, 1999.
90. Barbieri A, Palma G, Rosati A, Giudice A, Falco A, Petrillo A, Bimonte S, Benedetto M, Esposito G, Stiuso P, Abbruzzese A, Caraglia M, Arra C. Role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in chronic stress-promoted tumour growth. *J. Cell. Mol. Med*, 16(4): 920-926, 2012.
91. Pedrañez A, Arcaya JL, Carrizo E. Experimental depression induces renal oxidative stress in rats. *Physiol Behav*, 104(5): 1002-9, 2011.
92. Kessler RC, Sonnega A. Posttraumatic stress disorder in the national comorbidity survey. *Arch Gen Psychiatry*, 52: 1048-1060, 1995.
93. Gulati K, Chakraborti A, Ray A. Differential role of nitric oxide (NO) in acute and chronic stress induced neurobehavioral modulation and oxidative injury in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 92(2): 272-6, 2009.
94. Chrousos GP. Chrousos: The adaptive response. *Annals New York Academy Of Sciences*, 311-333, 2006
95. Bonfiglio JJ, Inda C, Holsboer F. The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *neuroendocrinology*, 1428: 12-20, 2011.
96. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic- pituitary- adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53: 865-871, 2002.
97. Plotsky PM. Facilitation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. *Endocrinology*, 121(3): 924-930, 2014.
98. Herman JP, Prewitt CM, Cullinan WE. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis, *Crit Rev Neurobiol*, 10(3-4): 371-94, 1996.
99. Lupien SJ. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Research Reviews*, 24: 1-27, 1997.
100. Zardooz H, Zahedi S, Kazem M, Naseri G, Hedayati M. Effect of chronic restraint stress on carbohydrate metabolism in rat. *Physiology & Behavior*, 89: 373-378, 2006.
101. Chrousos GP. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *International Journal of Obesity*, 24(2): 50-55, 2000.
102. Liezmann C, Klapp B, Peters EMJ. A re-evaluation from a psychoneuroimmunologic perspective stress, atopy and allergy. *Dermato-Endocrinology*, 37-40, 2011.
103. Kimura M, Lu A, Wiesner E, Flachskamm C, Wurst W, Holsboer F, Deussing JM. Conditional corticotropin-releasing hormone overexpression in the mouse forebrain enhances rapid eye movement sleep. *Molecular Psychiatry*, 15: 154-165, 2010.
104. Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci Res*, 68(4): 261-275, 2010.

105. Jain A, Martenssont J, Stolet E, Auld PAM, Meistert A. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Biochemistry*, 88(March): 1913-1917, 1991.
106. Liu X, Qian L, Gong J, Shen J, Zhang X, Qian X. Proteomic analysis of mitochondrial proteins in cardiomyocytes from chronic stressed rat. *Proteomics*, 4: 3167–3176, 2004.
107. Zhang Y, Liu W, Zhoud Y, Ma C, Li S, Cong B. Endoplasmic reticulum stress is involved in restraint stress-induced hippocampal apoptosis and cognitive impairments in rats. *Physiology & Behavior* 131: 41–48, 2014.
108. Tarcic N, Ovadia H, Weiss DW, Weidenfeld J. Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology*, 82: 40-46, 1998.
109. Yin D, Tuthill D, Mufson, RA, Shi Y. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(8): 1423–1428, 2000.
110. Kaplan JR, Manuck SB. Status, stress, and atherosclerosis : the role of environment and individual behavior, *Annals New York Academy of Sciences*, 1522: 145–161, 2006.
111. Skantze HB, Kaplan J. Psychosocial stress causes endothelial injury in cynomolgus monkeys via beta-1 adrenoceptor activation. *Atherosclerosis*, 136:153–161, 1998.
112. Schneider RH, Nidich SI, Salerno JW, Sharma HM, Robinson CE, Nidich RJ, Alexander CN. Lower lipid peroxide levels in practitioners of the transcendental meditation program. *Psychosom Med*, 60(1):38-41, 1998.
113. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2(10): 907-916, 2001.
114. Walker AL, Chen C, Augustine S, Wu T, Hruban RH, Lowenstein CJ. Inducible nitric oxide synthase expression in coronary arteries of transplanted human hearts with accelerated graft arteriosclerosis, *American Journal of Pathology*, 151(4): 919-925, 1997.
115. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia: mechanisms, pathophysiological importance, and therapeutic interventions. *Semin Thromb Hemost*, 26(5): 529-37, 2000.
116. Carr A and Frei B. Forum: Role of oxidation in atherosclerosis the role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(12): 1806–1814, 2000.
117. Buege JA, Aust, A.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52: 302-310, 1978.
118. Ellmann G.L. Tissue sulphydryl groups. *Archieves of Biochemistry and Biophysics*, 82: 70-77, 1959.
119. Pandey DK, Pati D, Joshi A. Chronic unpredictable stress: possible animal model of comorbid depression. *International Journal of Preclinical and Pharmaceutical Research*, 1: 54-63, 2010.

120. Noschang CG, Pettenuzzo LF, Toigo EP, Andreazza AC, Krolow R, Fachin A, Ávila MC, Arcego D, Crema LM, Diehl LA, Gonçalves CA, Vendite D, Dalmaz C. Sex-specific differences on caffeine consumption and chronic stress-induced anxiety-like behavior and DNA breaks in the hippocampus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 94: 63-69, 2009.
121. Toleikis PM, Godin DV. Alteration of antioxidant status in diabetic rats by chronic exposure to psychological stressors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(2): 355-366, 1995.
122. Rivera C, Monsalve F, Suazo I, Becerra J. Stress increases periodontal inflammation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4: 883-888, 2012.
123. Lee CZ, Xue Z, Hao Q, Yang G. Nitric oxide in VEGF-induced focal angiogenesis and matrix metalloproteinase-9 activity in the mouse brain. *NIH Public Access*, 40(8): 2879-2881, 2010.
124. Bouvet C, Gilbert L, Moreau P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO. *Hypertension*, 45: 432-437, 2005.
125. Villarreal FJ, Griffin M, Omens J, Dillmann W, Nguyen J. Early short-term treatment with doxycycline modulates postinfarction left ventricular remodeling. *American Heart Association*, 108: 1487-1492, 2003.
126. Palei ACT, Zaneti RAG, Fortuna GM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism. *Angiology*, 56: 611-617, 2005.
127. Pires PW, Rogers CT, McClain JL, Garver HS, Fink GD, Dorrance AM. Doxycycline, a matrix metalloprotease inhibitor, reduces vascular remodeling and damage after cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301: 87-97, 2011.
128. Guimaraes DA, Rizzi E, Ceron CS, Oliveira AM, Oliveira DM, Castro MM, Tirapelli CR, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension. *Basic&Clinical Pharmacology&Toxicology*, 108: 318-325, 2010.
129. Zeydanli EN, Kandilci HB, Turan B. Doxycycline ameliorates vascular endothelial and contractile dysfunction in the thoracic aorta of diabetic rats. *Cardiovascular Toxicology*, 11(2): 134-47, 2011.
130. Flak JN, Jankord R, Solomon MB, Krause EG, Herman JP. Physiology&Behavior opposing effects of chronic stress and weight restriction on cardiovascular, neuroendocrine and metabolic function. *Physiol Behav*, 104(2): 228-234, 2011.
131. Angelakis E, Million M, Kankoe S, Lagier JC, Armougom F, Giorgi R, Raoult D. Abnormal weight gain and gut microbiota modifications are side effects of long-term doxycycline and hydroxychloroquine treatment. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(6): 3342-3347, 2014.

132. Ribeiro-de-oliveira A, Menezes R, Fo RB, Marubayashi U, Martha A. Bromocriptine-induced dissociation of hyperglycemia and prolactin response to restraint. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 68: 229-233, 2001.
133. Mizoguchi K, Yuzurihara M. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 26: 443–459, 2001.
134. Rabasaa C, Delgado-Moralesa R, Muñoz-Abellána R, Nadala R, Armarioa A. Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and glucose to repeated immobilization or restraint stress is not influenced by associative signals. *Behavioural Brain Research*, 217: 232–239, 2011.
135. Weykamp C, John WG, Mosca A. A Review of the challenge in measuring hemoglobin A1c. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 3(3):439–445, 2009.
136. Altuntas Y. Diyabetes Mellitusta tanı izleme testleri ve metodları. Her yönüyle diabetes mellitus 2.Baskı. Editör Yenigün M İstanbul: Tayf ofset 63-68, 645, 2001.
137. Nade VS, Yadav AV. Anti-stress effect of ethyl acetate soluble fraction of *Morus alba* in chronic restraint stress. *Pharmaceutical Biology*, 48: 1038–1046, 2010.
138. Ruffolo RR, Waddell JE. Receptor interactions of imidazolines: α -adrenoceptors of rat and rabbit aorta differentiated by relative potencies, affinities and efficacies of imidazoline agonists. *Br. J. Pharmacol*, 77: 169-176, 1982.
139. Kosdak Ş. Sıçanlarda izole torasik aorta, mide fundus ve mesane detrusör düz kas dokularında β_3 -adrenoceptörler aracılığıyla oluşan gevşeme yanıtları üzerine yaşlılık ve hiperkolesteroleminin etkilerinin incelenmesi. Tıpta uzmanlık tezi. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 2010.
140. Sakaue M, Hoffman BB. glucocorticoids induce transcription and expression of the $\alpha 1b$ adrenergic receptor gene in DTT1 MF-2 smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 88: 385–389, 1991.
141. Flügge G. Alpha 2a and alpha 2c AR regulation in the brain. *European Journal of Neuroscience*, 17: 917-928, 2003.
142. Joshi JC, Ray A, Gulati K. Differential modulatory effects of morphine on acute and chronic stress induced neurobehavioral and cellular markers in rats. *Eur J Pharmacol*, 729: 17-21, 2014.
143. Pedrañez A, Arcaya JL, Carrizo E, Rincón J, Viera N, Peña C, Vargas R, Mosquera J. Experimental depression induces renal oxidative stress in rats. *Physiol Behav*, 104: 1002-1009, 2014.
144. Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, Vliet A, Maeda HJ. Protein synthesis post-translation modification and degradation: activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *Biol. Chem*, 342: 261-274, 2001.
145. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome, *Cardiovascular Research*, 59: 812-823, 2003.

146. Viappiani S, Nicolescu AC, Holt A, Sawicki G, Crawford BD, Leon H, Mulligen T, Schulz R. Activation and modulation of 72 kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochemical Pharmacology*, 77: 826-834, 2009.
147. Garvin P, Nilsson L, Carstensen J, Jonasson L, Kristenson M. Circulating Matrix Metalloproteinase-9 is associated with cardiovascular risk factors in a middle-aged normal population. *Plos One*, 3(3): e1774, 2008.
148. Thaker PH, Han LY, Kamat AA, et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nature Medicine*, 12(8): 939-944, 2006.
149. Cheung P, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Ischemia-Reperfusion Injury in the Heart. *Circulation*, 101: 1833-1839, 2000.
150. Isingrini E, Camus V. Early and late-onset effect of chronic stress on vascular function in mice : a possible model of the impact of depression on vascular disease in aging. *American Association for Geriatric Psychiatry*, 3: 335-346, 2011.
151. Kessler MW, Barr J, Greenwald R, Lane LB, Dines JS, Dines DM, Drakos MC, Grande DA, Chahine NO. Enhancement of achilles tendon repair mediated by matrix metalloproteinase inhibition via systemic administration of doxycycline. *Journal of Orthopaedic Research*, 32: 500-506, 2014.
152. Tessone A, Feinberg MS, Barbash IM, Reich R, Holbova R, Richmann M, Mardor Y, Leor J. Effect of matrix metalloproteinase inhibition by doxycycline on myocardial healing and remodeling after myocardial infarction. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 19: 383-390, 2006.
153. Haas TL, Milkiewicz M, Davis SJ. Matrix metalloproteinase activity is required for activity- induced angiogenesis in rat skeletal muscle, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279: 1540-1547, 2000.
154. Richardson M, Wong D, Lacroix S. Inhibition by doxycycline of angiogenesis in the chicken chorio allantoic membrane (CAM). *Cancer Chemother Pharmacol*, 56: 1–9, 2005.