

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

**SPONTAN HİPERTANSİF VE NORMOTANSİF RAT AORTASI
VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRELERİNDEN YAPILAN PRİMER
HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ANG II UYARIMININ NAD(P)H
OKSİDAZ ENZİM KOMPLEKSİ ÜZERİNDEN SÜPEROKSİT
ANYONU ÜRETİMİNE ETKİSİ VE BU METABOLİK YOLDA
SRC'NİN ROLÜ**

Fatih UZUNER

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2009

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

**SPONTAN HİPERTANSİF VE NORMOTANSİF RAT AORTASI
VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRELERİNDEN YAPILAN PRİMER
HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ANG II UYARIMININ NAD(P)H
OKSİDAZ ENZİM KOMPLEKSİ ÜZERİNDEN SÜPEROKSİT
ANYONU ÜRETİMİNE ETKİSİ VE BU METABOLİK YOLDA
SRC’NİN ROLÜ**

Fatih UZUNER

Yüksek Lisans Tezi

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

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No. 2007.02.0122.009)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2009

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir./...../2009

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



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



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



Üye : Prof. Dr. Aslı BAYKAL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



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



ONAY:

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

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Süperoksit anyonunun hipertansiyonun gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Anjiyotensin II (Ang II), hipertansiyon, aterosikleroz ve diyabette görülen vasküler hasarın karakteristik özellikleri olan değişen vasküler tonüs, endotelial disfonksiyonu, yapısal yeniden yapılanma ve vasküler inflamasyonun oluşmasına katılır. Ang II uyarımı, G protein bağımlı membran reseptörleri olan Ang II reseptörü 1 (AT1R) ve Ang II reseptörü 2 (AT2R) üzerinden gerçekleşir. Ang II reseptörü 1 (AT1R)'in fizyolojik rolü AT2R'ne göre daha önemlidir. Vasküler hücrelerde en iyi tanımlanan sistem, hipertansiyonun düzenleyicisi gibi düşünülen, Ang II-uyarımli NAD(P)H oksidaz ilişkili süperoksit anyonu oluşumudur.

Bu çalışmamızda, vasküler düz kas hücreleri (VDKH) spontan hipertansif (SHR) ve normotansif wistar kyoto (WKY) ratların torasik aortalarından elde edilmiştir. Vasküler düz kas hücreleri, AT1R-iliskili NAD(P)H oksidaz aktivasyonu üzerinden Src fosforilasyonu ve süperoksit anyonu oluşumunun belirlenmesi için Ang II ile uyarıldı ve/veya Losartan (AT1 reseptör blokörü), difenil idonium (DPI; NAD(P)H oksidaz inhibitörü), PP1 (Src inhibitörü) ve GF109203X (PKC inhibitörü) ile inkübe edildi. Src fosforilasyonu western blot metoduyla, süperoksit anyonu oluşumu sitokrom C redüksiyon yöntemi ile ölçüldü.

Src fosforilasyonu, Ang II uyarımı sonrasında hem SHR hem de WKY gruplarında kontrole göre artış gösterdi. Diğer taraftan, DPI dışındaki bütün inhibitör uygulamaları Src fosforilasyonunu her iki grupta da azalttı. Ang II-uyarımli hücrelerde, her iki grupta da, süperoksit anyonu oluşumunda artış olduğu belirlendi. Ancak süperoksit anyonu oluşumunun SHR grubunda, WKY grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi. Ang II uyarımına rağmen, tüm inhibitor uygulamalarında her iki grupta da oluşan süperoksit anyonu miktarlarında azalma tespit edildi.

Sonuçlarımıza göre, Src ve PKC fosforilasyonunun NAD(P)H oksidaz aktivasyonundan önce meydana geldiğini söyleyebiliriz. Ang II uyarımli NAD(P)H oksidaz aktivasyonunun Src üzerinden gerçekleştiği çalışmamızda gösterilmiştir ve bu mekanizma antihipertansif ilaçların geliştirilmesinde önemli olabilir.

Anahtar kelimeler: Hipertansiyon, vasküler düz kas hücresi, NAD(P)H oksidaz, Src.

ABSTRACT

It is known that superoxide anion has an important role in progressing hypertension. Ang II contributes to altered vascular tone, endothelial dysfunction, structural remodeling and vascular inflammation, characteristic features of vascular damage in hypertension, atherosclerosis and diabetes. Ang II induces its effects via at least two G-protein-coupled transmembrane receptors, Ang II receptor 1 (AT1R) and Ang II receptor 2 (AT2R), of which the former is considered to be more physiologically important. The best characterized system in vascular cells is Ang II-stimulated NAD(P)H oxidase-mediated generation of superoxide anion, which appears to be upregulated in hypertension.

In our present study, vascular smooth muscle cells (VSMC) were isolated from thoracic aortas of spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Wistar Kyoto rats (WKY). Vascular smooth muscle cells, to determine the AT1R-mediated Src phosphorylation and superoxide anion production via NADPH oxidase, were stimulated with Ang II with or without Losartan (AT1 receptor blocker), diphenyl iodonium (DPI; NAD(P)H oxidase inhibitor), PP1 (a selective Src inhibitor) and GF109203X (PKC inhibitor). Src phosphorylation was determined by western blot method. Superoxide anion production was measured by cytochrom c reduction method.

Src phosphorylation increased both SHR and WKY groups after Ang II stimulation compared with controls. On the other hand, Src phosphorylations were decreased both SHR and WKY groups after Ang II stimulation with inhibitors except DPI. Superoxide anion production was enhanced in both two groups in Ang II-stimulated cells. However superoxide anion production in SHR was significantly greater than WKY. All inhibitors reduced superoxide anion production both SHR and WKY groups in spite of Ang II stimulation.

According to our results, we found that Src and PKC phosphorylation may occur before the NAD(P)H activation. We showed that Ang II induced NADPH oxidase via Src and this mechanism may be important in developing drugs and medicine against hypertension.

Key words: Hypertension, vascular smooth muscle cell, NAD(P)H oxidase, Src.

TEŞEKKÜR

Araştırmanın planlanması ve gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı, proje yürütücüm ve akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA ve tüm bölüm hocalarıma,

Deney hayvanlarının tedarik edilmesinde yardım ve desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Filiz GÜNDÜZ'e,

Çalışmamın her aşamasında bana yardım ve desteklerini esirgemeyen ekip arkadaşlarım Alper TOKAY ve Arzu ÇETİN'e

Damar izolasyonlarında yardımcı olan Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmam da dahil olmak üzere hayatımın her aşamasında desteklerini esirgemeyen sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Fatih UZUNER

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİ	3
2.1. Hipertansiyon	3
2.1.1. Hipertansiyonun Tanımlanması ve Sınıflandırılması	3
2.1.2. Hipertansiyonun Patofizyolojisi	4
2.1.3. Hipertansiyonun Tedavisi	5
2.2. Vasküler Yapı	6
2.3. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (RAAS) ve Anjiyotensin II	7
2.3.1. Anjiyotensin II Reseptörleri ve Görevleri	10
2.4. NAD(P)H Oksidaz Sistemi (NOX)	11
2.5. Src ve NAD(P)H Oksidaz İlişkisi	18
MATERYAL ve METOD	20
3.1. Deney Modeli ve Kontrol Grubu	20
3.2. Kan Basıncı Ölçümü	20
3.3. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu	21
3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar	21
3.3.2. Hücrelerin İzolasyonu	22
3.4. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin Kültürü	22
3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar	22
3.4.2. Düz Kas Hücrelerinin Kültürü	23
3.4.3. Hücrelerin Pasajlanması (Tripsinizasyon)	23
3.4.4. Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığı Testi	24

3.4.5.	Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu	24
3.4.6.	VDKH Kültürlerinin Western Blot Analizi için Lizatlarının Hazırlanması	25
3.4.7.	Protein Miktarının Tayini	27
3.4.8.	Src Fosforilasyonunun SDS-PAGE ve Western İmmüno blot Analizi	28
3.4.9.	Sitokrom C Redüksiyonu Yöntemi ile Süperoksit Anyonu Ölçümü	34
3.5.	Materyal ve Kimyasal Malzemeler	35
3.6.	Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler	36
BULGULAR		37
4.1.	İmmünohistokimyasal Analiz Bulguları	37
4.2.	Spontan Hipertansif ve Wistar Kyoto Ratlara Ait Kan Basınçları	38
4.3.	Spontan Hipertansif ve Wistar Kyoto Ratlardan Elde Edilen Vasküler Düz Kas Hücre Kültürlerinde Ang II Uyarımıyla Src Aktivasyonu	38
4.3.1.	Spontan Hipertansif ve Wistar Kyoto Ratlardan Elde Edilen Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımı Sonrasında Src Aktivasyonu Konsantrasyon Deneyleri	39
4.3.2.	Spontan Hipertansif ve Wistar Kyoto Ratlardan Elde Edilen Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımı Sonrasında Src Aktivasyonu Süre Deneyleri	40
4.4.	Spontan Hipertansif ve Wistar Kyoto Ratlardan Elde Edilen Vasküler Düz Kas Hücre Kültürlerinde İnhibitor Uygulamalarını Takiben Ang II Uyarımında Gözlenen Src Fosforilasyonu	42
4.5.	Spontan Hipertansif ve Wistar Kyoto Ratlardan Elde Edilen Vasküler Düz Kas Hücre Kültürlerinde Ang II ile Uyarılan Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Süperoksit Anyon Ölçümü	44
TARTIŞMA		46
SONUÇLAR		52
KAYNAKLAR		53
ÖZGEÇMİŞ		60

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
Ang II	: Anjiyotensin II
AT1	: Anjiyotensin tip 1 reseptörü
BSA	: Bovine serum albumin
DAB	: Diastolik arter basıncı
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EAS	: Enzimatik ayrıştırma solüsyonu
FBS	: Fetal bovine serum
HBSS	: Hank's Balance Salt Solution
JNC	: Joint National Committee
NOX	: NAD(P)H oksidaz
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
PBS	: Phosphate buffer saline
PKC	: Protein kinaz C
PLC	: Fosfolipaz C
PLD	: Fosfolipaz D
RAAS	: Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SAB	: Sistolik arter basıncı
SHR	: Spontan hipertansif rat
STİ	: Soya tripsin inhibitor
TBS	: Tris buffer saline
VDKH	: Vasküler düz kas hücresi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WKY	: Wistar Kyoto rat

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO	SAYFA
2.1. Kan basıncının sınıflandırılması	4
3.1. Ayrışma jeli tamponu ve miktarları	28
3.2. Yükleme jeli tamponu ve miktarları	29
4.1. Deney gruplarının sistolik kan basıncı değerleri	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
2.1. Kan basıncını oluşturan faktörler	5
2.2. Hipertansiyonun oluşum mekanizması ve tedavi yaklaşımları	6
2.3. Vasküler yapı	7
2.4. Renin-anjiyotensin sistemi ile anjiyotensin II'nin oluşması	9
2.5. AngII'nin AT1 reseptörüne bağlanması ile gerçekleşen sinyal iletim yolları	11
2.6. NOX ailesinin üyeleri	12
2.7. NAD(P)H oksidaz kompleksi üzerinden süperoksit anyonu	13
2.8. NADPH oksidaz enizminin fagositozdaki rolü	14
2.9. Sitokrom b558'in yapısı	15
2.10. p40 ^{PHOX} un yapısı	16
2.11. p47 ^{PHOX} un yapısı	16
2.12. p67 ^{PHOX} un yapısı	17
2.13. NAD(P)H Oksidaz üzerinden oluşan ROS nükleus üzerine etki ederek çeşitli proteinlerin sentezini stimüle eder	18
3.1. Protein standart grafiği	27
4.1. Vasküler düz kas hücrelerinin immünohistokimya bulguları	38
4.2. Spontan hipertansif ratlarda farklı Ang II konsantrasyonlarında Src aktivasyonu.	39
4.3. Wistar Kyoto ratlarda farklı Ang II konsantrasyonlarında Src aktivasyonu	40
4.4. Spontan hipertansif ratlarda 100 nM Ang II'nin zamana bağlı olarak Src aktivasyonuna etkisi	41
4.5. Wistar Kyoto ratlarda 100 nM Ang II'nin zamana bağlı olarak Src aktivasyonu üzerine etkisi	41
4.6. Spontan hipertansif ratlarda Ang II uyarımı ile birlikte çeşitli inhibitörlerin Src aktivasyonu üzerine etkisi	42

4.7.	Wistar Kyoto ratlarda Ang II uyarımı ile birlikte çeşitli inhibitörlerin Src aktivasyonuna etkisi	43
4.8.	Süperoksit anyonu ölçüm sonuçlarına ait grafik.	45
5.1.	Ang II uyarımı sonrasında NAD(P)H oksidaz üzerinden süperoksit anyonu oluşumu	51

GİRİŞ

Hipertansiyon veya arteriyel kan basıncındaki artış, sanayileşmiş toplumlarda yetişkin popülasyonun % 25'ini etkileyen önemli bir halk sağlığı problemidir [1, 2]. Bu hastalık, inme, miyokardiyal infarktüs, konjestif kalp yetmezliği ve son dönem böbrek yetmezliğini de içine alan ve birçok ortak sebebe sahip olan morbidite ve mortalite için başlıca risk faktörüdür [2].

Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS), ekstraselüler sıvı hacminin ve sodyum dengesinin düzenlenmesi vasıtasıyla hemodinamik stabilitenin korunmasında bütünleyici bir rol oynar. Buna ilaveten RAAS'ın aşırı aktivitesi hipertansiyon ve bununla bağlantılı bazı hastalıkların gelişmesiyle ilişkilidir. RAAS'daki ana efektör peptid olan Anjiyotensin II (Ang II), kardiyovasküler ve renal hastalıkların altında yatan mekanizmalarda önemli bir rol oynamaktadır [3]. Hipertansiyon ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde [4] görev alan Ang II'nin en iyi bilinen etkileri (uyarıcı, proliferatif ve profibrotik), anjiyotensin tip 1 (AT1) reseptörüne bağlanmasıyla gerçekleşir [3]. Bugüne kadar, Ang II'nin fizyolojik etkilerinin çoğunda ve Ang II uyarımlı vasküler fonksiyonların kontrolünde AT1 reseptörünün etkili olduğu gösterilmiştir. Damar sisteminde, AT1 reseptörleri başlıca düz kas hücrelerinde eksprese edilir [4].

Hipertansiyonun patogenezinde özellikle NAD(P)H oksidaz aracılığıyla oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin rolü olduğunu destekleyen birçok kanıt bulunmaktadır. NAD(P)H oksidaz (NOX) aktivasyonu ve indüksiyonu için en iyi tanımlanmış uyarıcı Ang II'dir ve farklı alt üniteleri eksik NAD(P)H oksidaz'a sahip fareler kullanılarak yapılan deneylerde, Ang II uyarımlı hipertansiyon ve hipertrofide oksidazların merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir [5]. Ang II infüzyonu aracılığıyla oluşturulmuş hipertansiyonlu rat modellerinde, hem NAD(P)H oksidaz altünitelerinin ekspresyonu hemde aktivitesi yükselmiştir [6, 7], NAD(P)H oksidaz inhibitörünün katılımıyla vasküler süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$) üretimi azalmış ve Ang II ile indüklenen kan basıncı artışı azalmıştır [8, 9]. Son dönemde gen hedefleme yaklaşımları kullanılan bir dizi çalışma NAD(P)H oksidaz izoformlarının hipertansiyonla alakalı olduğunu doğrulamıştır. Sitozolik p47^{phox} altünitelerinden yoksun farelerde Ang II'ye hipertansif cevap belirgin bir şekilde körelmiştir ve bu hayvanlarda Ang II infüze edilmiş yabani tip farelerde gözlenen endotelial disfonksiyon ve $O_2^{\cdot-}$ üretimindeki artış görülmemektedir [10, 11].

Ang II, damar sisteminde, kasılma, büyüme, göç ve inflamasyon gibi çeşitli hücrel yanıtın ortaya çıkmasını sağlar. Bu süreçlerin bir kısmı, sinyal molekülleri olarak rol oynayan, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi ROS vasıtasıyla gerçekleşir. Yeni ortaya çıkan kanıtlar vasküler ROS'un esas kaynağının vasküler düz kas hücreleri (VDKH)'deki NAD(P)H oksidaz olduğunu işaret

etmektedir. Ang II vasküler NAD(P)H oksidazın en iyi bilinen uyaranlarından biridir. VDKH'de NAD(P)H oksidazı etkileyen üst yolak sinyal molekülleri ve Ang II bağlantılı enzim mekanizmaları tam anlamıyla açığa çıkmamıştır [12] ancak fosfolipaz D (PLD) ve/veya protein kinaz C (PKC)'nin bir rol oynadığını düşündüren bulgular elde edilmiştir [13, 14]. Ayrıca bazı çalışmalar sonucunda, epidermal büyüme faktör (EGF) reseptörü transaktivasyonu, fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K) ve Rac'ın önemli olabileceği de rapor edilmiştir [15].

Bir non-reseptör tirozin kinaz ailesi olan Src kinazlar VDKH'de yaygın olarak eksprese edilir. Bu zamana kadar 14 üyesi tesbit edilen Src kinazlardan 60 kDa ağırlığındaki c-Src kinazlar ilk tanımlanan tiptir [16]. Ang II vasıtasıyla hızlı bir şekilde aktive olan Src'nin, hücre göçü, büyümesi ve kasılma olaylarında anahtar rol oynadığı düşünülmektedir [17]. Src aktivasyonu, hipertansiyondaki bir dizi redoks duyarlı sinyal yolağının uyarımıyla da ilişkilidir [9].

Hipertansiyonda, VDKH'lerinde Ang II uyarımı sonrasında görülen süperoksit anyon artışı, NAD(P)H oksidaz üzerinden meydana geldiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Elde edilen literatür bilgilerinin ışığı altında, yapılan deneysel çalışmalarda, daha çok deney hayvan modellerinde, hipertansiyonun NAD(P)H oksidaz üzerine etkisi gösterilmiş olmasına rağmen, mekanizması ile ilgili hücre kültürlerinde çelişkili verilere rastlanmaktadır. Amacımız, kendi laboratuvar koşullarımızda, spontan hipertansif ratlardan ve normotansif ratlardan elde edilen VDKH'lerinde Ang II uyarımı ile NAD(P)H oksidaz aracılı süperoksit anyonu üretimini karşılaştırmak ve ayrıca, aynı sinyal iletim yolunda rol oynayan ve literatürde hakkında çelişkili bilgiler olan Src'nin bu yolaktaki yerini belirlemektir.

GENEL BİLGİ

2.1. Hipertansiyon

2.1.1. Hipertansiyonun Tanımlanması ve Sınıflandırılması

En yaygın görülen kardiyovasküler patolojiler içerisinde bulunan hipertansiyon, tekrarlanan ölçümlerde kan basıncının yüksek olduğunun kanıtlanması ile tesbit edilir. Tanımlar ve sınıflamalar değişmekle beraber genel olarak, 18 yaş ve üzeri insanlarda sistolik arter basıncının (SAB) 140 mmHg, diastolik arter basıncının (DAB) 90 mmHg'nin üzerine çıktığı durumlar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Hipertansiyon Derneği tarafından hipertansiyon olarak tanımlanmıştır [18-20].

Bununla birlikte Amerika Birleşik Ulusal Hipertansiyon Komitesi tarafından yayımlanan yedinci rapora göre, 18 yaş ve üzeri insanlarda ideal kan basıncının 120/80 mmHg'nin altında olması gerektiği; SAB'ın 120 mmHg ve DAB'ın 80 mmHg'nin üzerine çıkması prehipertansiyon olarak tanımlanmaktadır. JNC-VII (JNC, Joint National Committee) raporunda kan basıncının sınıflandırılması tablo 2.1'de gösterildiği şekilde sunulmuştur.

Hipertansiyon, Amerika Birleşik Devletlerinde yaklaşık 50 milyon ve dünya üzerinde yaklaşık 1 milyar bireyi etkilemektedir. Populasyon yaşı artıkça, geniş çaplı ve etkili koruyucu önlemler alınmazsa hipertansiyon prevalansı daha da artacaktır. Framingham Kalp Çalışmasından alınan son verilere göre, normotansif 55 yaşındaki bireylerde kalan yaşam sürecinde % 90 hipertansiyon gelişme riski vardır [21].

Burt ve arkadaşlarının 1988 – 1991 yılları arasında yapmış oldukları çalışmalarda elde ettikleri epidemiyolojik veriler otuzlu yaşlarda %20-25 olan hipertansiyon prevalansının 60 yaş ve üzerinde %50'lere çıktığını göstermektedir [1].

Ülkemizde Onat ve arkadaşlarının 2003 yılında yapmış olduğu çalışma, hipertansiyon prevalansının erişkin erkeklerde %36,3 erişkin kadınlarda ise %49,1 olduğunu göstermiştir. Buna göre, 33 yaş üzerindeki nüfusumuzun halen 28,3 milyon olduğu varsayımıyla, halkımızda yaklaşık 5,2 milyon erkek ve 6,6 milyon kadında hipertansiyonun bulunduğu tahmin edilebilir [22].

Tablo 2.1. Kan basıncının sınıflandırılması [21].

Kan Basıncının Sınıflandırılması	SAB mmHG	DAB mmHG
Normal	< 120	< 80
Prehipertansiyon	120 - 139	80 – 89
Evre 1 Hipertansiyon	140 - 159	90 – 99
Evre 2 Hipertansiyon	≥ 160	≥ 100

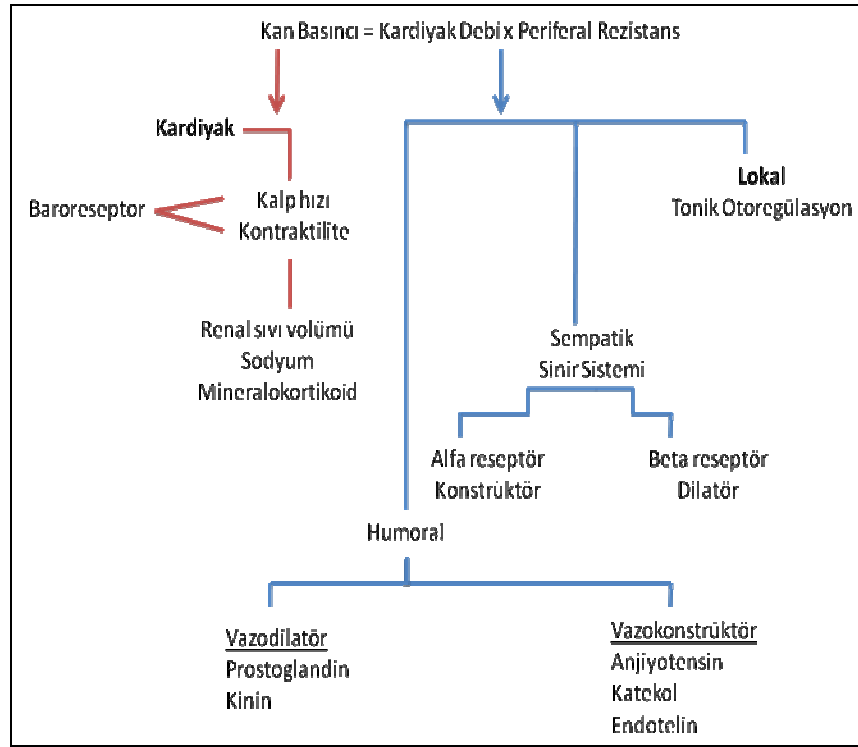
Hipertansiyon, esansiyel ve sekonder hipertansiyon olmak üzere ikiye ayrılır. Esansiyel (primer, idiyopatik) hipertansiyon, gerçek nedeni bilinmemekle beraber renovasküler hastalık, böbrek yetmezliği, feokromasitoma ve aldosteronizm gibi sekonder nedenlerin bulunmadığı yüksek kan basıncı olarak tanımlanır ve tüm hipertansiyon nedenlerinin %95'inden sorumludur [18]. Böbrek, kalp, endokrin, nörolojik ve vasküler hastalıklarda görülen hipertansiyon ise sekonder hipertansiyon olarak tanımlanır [23].

2.1.2. Hipertansiyonun Patofizyolojisi

Arteriyel kan basıncının düzenlenmesinde böbrekler, merkezi sinir sistemi, periferik sinir sistemi, vasküler endotel ve böbreküstü bezi gibi birbiriyle ilişkili birçok faktör rol oynadığı için hipertansiyondan sorumlu tek bir etiyoloji ya da patofizyolojik mekanizma vardır denilemez [24]. Arteriyel kan basıncı vücudun istemlerine göre fizyolojik sınırlarda alçalıp yükselmeler gösterir. Bu gün için bilinen kontrol sistemlerini şöyle sıralayabiliriz:

- Baroreseptör sistemi,
- Otonom sinir sistemi,
- Renin anjiyotensin sistemi,
- Likit elektrolit dengesi,
- Prostaglandinler,
- Renal medulladan salgılanan alkil eter,
- Kallikrein-kinin sistemi,
- Atrial natriüretik peptidler ve Arginin – Vazopressin

Arteriyel yataktaki kan basıncının seviyesi büyük ölçüde iki olgudan kaynaklanır. Bunlardan birincisi, sol ventrikül tarafından birim zamanda pompalanan kan miktarı olarak ifade edilen, kalp debisi; diğeri de periferik vasküler yatağın kan akımına gösterdiği dirençtir. Bu direnç damar yarıçapının dördüncü kuvvetiyle ters orantılı olduğundan yarıçaptaki çok az küçülmeler dahi büyük bir direnç ve buna bağlı olarak kan basıncının artmasına sebep olabilir. Şekil 2.1'de kan basıncına etki eden faktörler görülmektedir [23].



Şekil 2.1. Kan basıncını oluşturan faktörler [23].

Hipertansiyon ve ateroskleroz gibi bazı patofizyolojik durumlar, damar duvarı üzerinde vasküler düz kas proliferasyonu, rejener endotelin disfonksiyonu ve konnektif dokunun dekompozisyonu gibi ortak etkiler gösterirler. Oksidatif stresteki artış, oluşan patolojik süreçlerin ortak noktasıdır. Bu süreçlerin ilerlemesinde hücre içi sinyal iletim yolu önem kazanmaktadır. Sinyal iletim yollarının belirlenmesi, vasküler düz kas hücrelerindeki fizyopatolojik düzenlenme mekanizmalarının anlaşılmasını sağlar [25, 26].

2.1.3. Hipertansiyonun Tedavisi

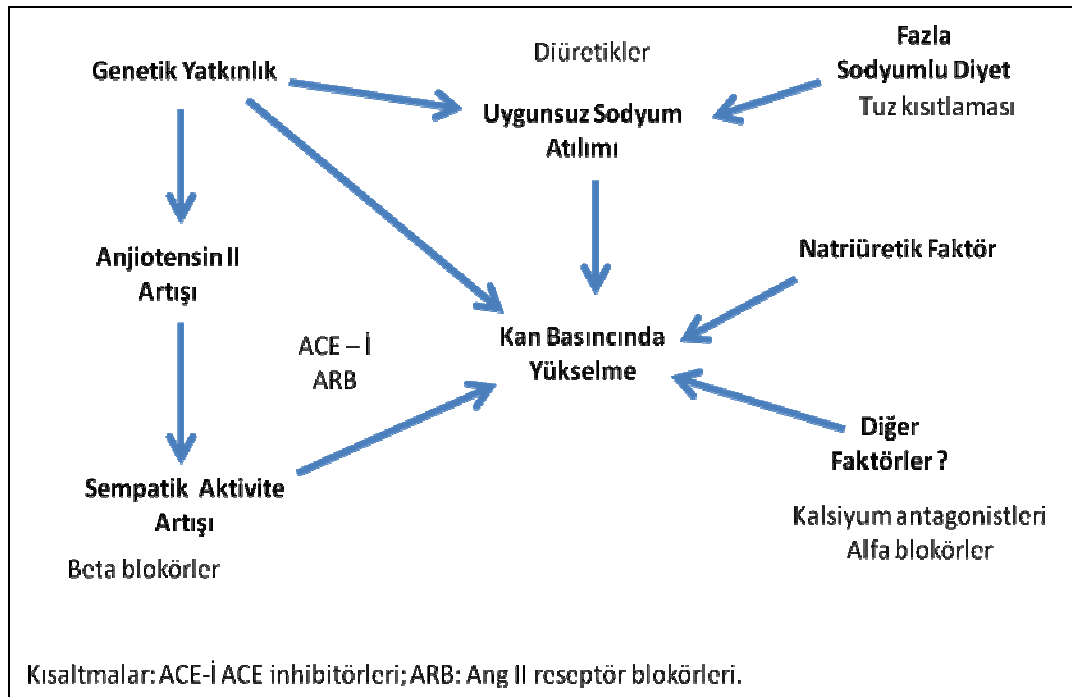
Hipertansiyon tanısı kesinleştikten sonra eksiksiz yapılan laboratuvar incelemeleri ile kan basıncı yüksekliğine sebep olan nedenler araştırılır. Sekonder hipertansiyon tümüyle ekarte edildikten sonra hasta, esansiyel hipertansiyon hastası kabul edilerek uygun tedaviye başlanır. Klinik ve laboratuvar verileri sekonder hipertansiyon tanısı koydurursa bunun altında yatan primer hastalık uygun tedaviye alınır. Genellikle erken uygulanan tedavi ile primer hastalık kontrol altına alınırsa hipertansiyon da gerileyebilir. Primer hastalık yeterince uzun sürmüş ve kardiyovasküler değişiklikler hipertansiyonu primer hastalığın tedavisiyle geriletilemez duruma getirmişse hastalar ayrıca uygun antihipertansif tedaviye alınır [23].

Kan basıncı yüksekliği hedef organlarda hemen müdahale gerektirecek bir etki yapmamışsa ve çok yüksek seviyelerde değilse, medikal yöntemlerden önce kan basıncı yükselmesinde ikinci derecede sorumlu olabilecek etkilerin giderilmesine

çalışılır. Nonfarmakolojik yöntemler olarak da adlandırılan bu önlemlerin başında tuz alınının kısıtlanması gelir. Bizim de içinde bulunduğumuz batı toplumu tarzında beslenmede günde ortalama 9-12 g kadar tuz alınmaktadır (yaklaşık 3,5-5 g sodyum). Günlük tuz alınının 5 g'ın altına düşürülmesi hafif derecedeki hipertansiflerin en az yarısında kan basıncında 10-15 mmHg kadar bir azalma görülür. Tuz kısıtlaması özellikle tedavi öncesi düşük renin düzeyi olan hastalarda (tuza duyarlı hipertansiflerde) daha etkili olur. Vücut ağırlığının normalin üstünde olması da kan basıncını olumsuz yönde etkiler. Fazladan bulunan 10 kg kadar bir ağırlık azalması kan sistolik kan basıncında 10 mmHg kadar bir azalma sağlar [23].

Hipertansiyon, erken tanı, bilinçli izleme ve uygun tedavi ile önlenabilir, geciktirilebilir, kontrol altına alınabilir bir hastalıktır. İdeal tedavi, regülasyon metabolizmasını bozan sebebe yönelik olmalıdır [23].

Primer hipertansiyonun gelişiminden çok sayıda mekanizma sorumlu tutulmaktadır. Her hastada farklı faktör ya da faktörler ve henüz bilinmeyen mekanizmalar söz konusu olabileceğinden, tedavide temel hedef, olası faktörler üzerine yönelerek kan basıncını düşürmektir. Bu amaçla başlıca iki tür yaklaşım uygulanmaktadır: yaşam tarzının düzenlenmesi ve ilaç tedavisi (Şekil 2.2) [27].

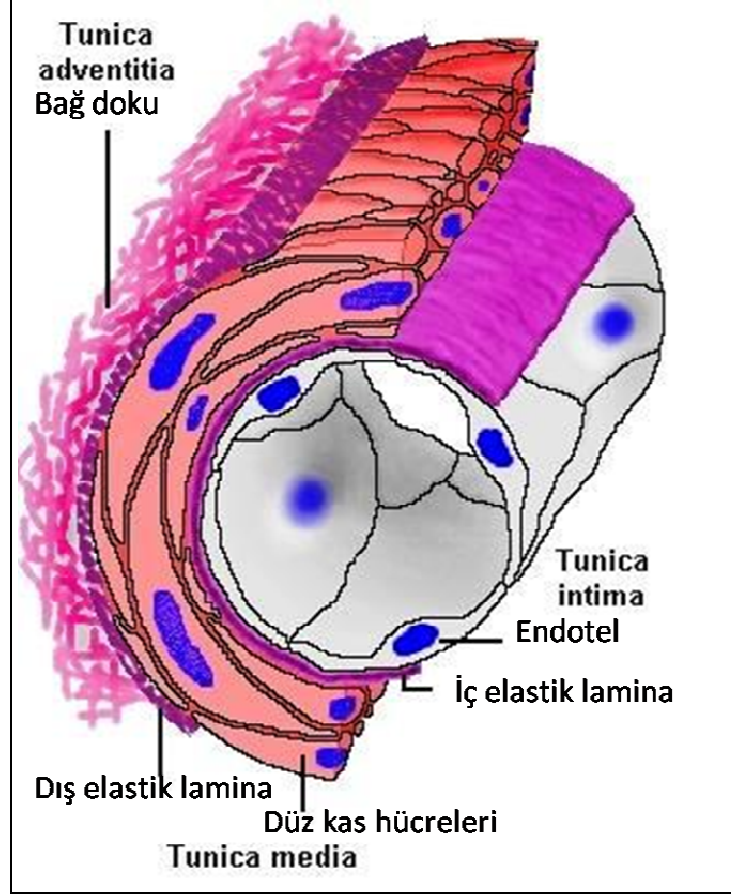


Şekil 2.2. Hipertansiyonun oluşum mekanizması ve tedavi yaklaşımları [27]

2.2. Vasküler Yapı

Arteriyel duvar birbirinden bağımsız üç tabakadan (Tunica intima, Tunica media ve Tunica adventitia) oluşur (Şekil 2.3). Farklı yapı ve fizyolojik özelliklere sahip olan bu üç tabaka arteriyel duvar hasarlarında farklı yanıtlar gösterirler [28].

Vasküler düz kas hücreleri damarların Tunica media tabakasında ve hücre dışı matriks içinde yerleşmiş olarak bulunurlar ve kapiller damarlar hariç bütün damarların duvarında bulunan ve damarın kasılıp-gevşeme fonksiyonunu sağlayan hücrelerdir [29].



Şekil 2.3. Vasküler yapı [30].

Hipertansiyonda, arterler lümen çapının azalması ve periferel direncin artması sonucunda fonksiyonel, yapısal ve mekanik değişikliklere maruz kalır [31, 32]. Yeniden yapılanmayı da içeren başlıca yapısal değişiklikler, hücre büyümesindeki artış, hücre migrasyonu, ekstraselüler matriks birikimi ve inflamasyondan dolayı oluşur. Vasküler düz kas hücreleri tüm bu olayların merkezindedir ve hipertansiyondaki vasküler değişikliklerin altında yatan dinamik süreçlerde temel rol oynar. Hipertansiyonda, damarların yeniden yapılanması ve büyümesinde rol oynayan bir çok faktör arasında, Ang II en önemli faktör olarak görülmektedir [31, 33].

2.3. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (RAAS) ve Anjiyotensin II

Kan basıncının düzenlenmesi ve sıvı elektrolit dengesinin sağlanmasında kilit görev alan Renin Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (RAAS) fizyolojik görevleri dışındaki nöronal, nörohormonal, metabolik, immünolojik olaylardaki multifonksiyonel etkilerinden ötürü kardiyovasküler ve renal değişikliklerin

oluşmasına yol açar. Bu nedenle hipertansiyon gelişimi kadar komplikasyonlarını da artırır. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi'nin biyolojik aktivasyonları, esas olarak potent bir oktapeptit olan anjiyotensin II (Ang II) ile ve daha az düzeyde aldosteronla sağlanır. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi üyelerinin % 10-20'si sistemik dolaşımda, % 80-90'ı dokularda bulunur. Dolaşımdaki RAAS üyelerinin majör kaynağı renin sentezleyen böbreklerdir. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi'nin etkisi ile sodyum ve suyun tutulduğu, potasyumun atıldığı organ olan böbrekler, RAAS'ın hipertansiyon geliştirici etkisinde de merkezi rol oynar. Sirküler RAAS üyeleri hemodinamik ve hormonal işlevle kan basıncının yükselmesine, lokal RAAS üyeleri de metabolik, immünolojik, büyüme faktörlerini uyarıcı etkiyle kardiyovasküler ve renal değişikliklere, hipertansiyonun devamlılığı ve komplikasyonlarının artmasına neden olur. RAAS'ni oluşturan komponentlerin genetik polimorfizmi de Mendelyan eğilimle, otozomal dominant özellikli olarak kuşaklar arası geçiş gösteren hipertansiyon gelişimini arttırmaktadır [34].

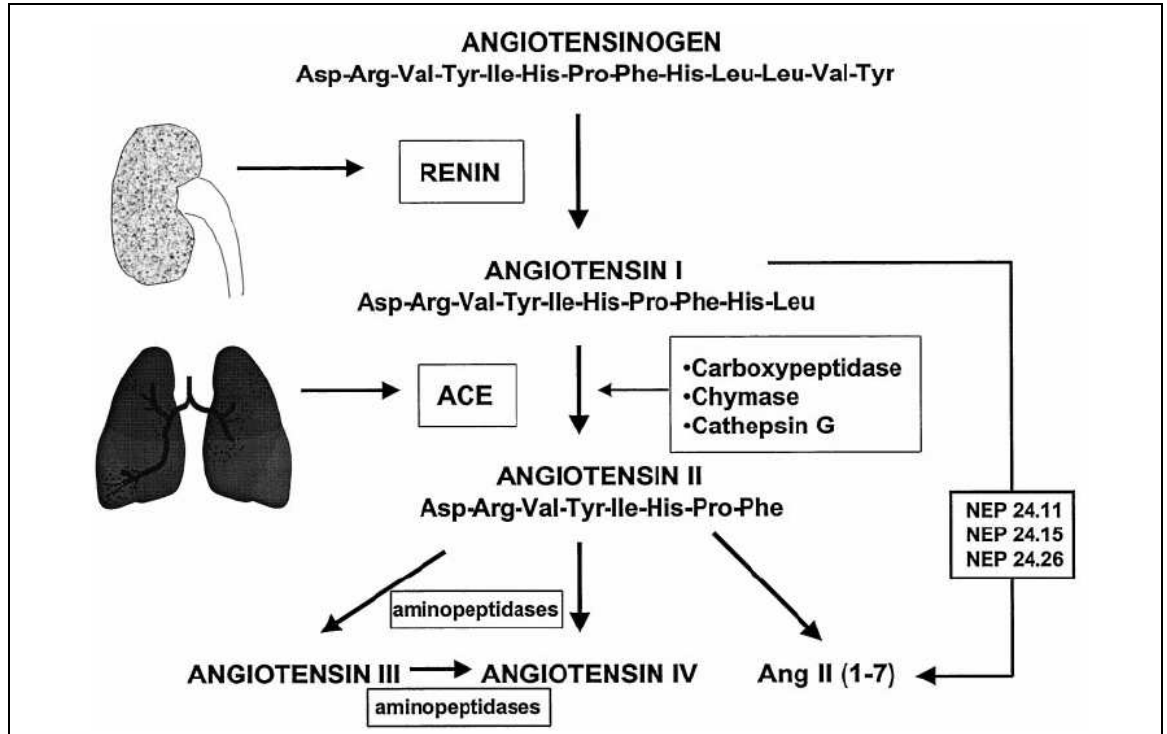
Richard Bright'ın 1838'de böbrek hastalarında kardiyak hipertrofi ve vasküler duvar kalınlaşmasını bildirmesinden sonra, Finlandyalı fizyolog Tiggerstadt 1898'de böbrek korteksinde kan basıncı artışına yol açan ve hipertansiyondaki kardiyak hipertrofiden sorumlu olabileceğini düşündüğü ve "renin" adını verdiği bir maddenin varlığını bildirmiştir. Goldblatt 1934'te renovasküler hipertansiyon modellerinde kan basıncı artışına yol açan uzun etkili humoral bir madde olduğunu gözlemlemiştir. George Pickering ve arkadaşlarının 1938 de ısıya dayanıklı, diyaliz olamayan renin adındaki maddeyi kandan izole etmelerinden sonra, bu konudaki çalışmalar hızlanmıştır. Daha sonra reninin aktive ettiği hipertansif faktör olan plazma proteininin varlığı bildirilmiştir. "Anjiyotensinojen" adı verilen ve 1957'de Skeggs ve arkadaşlarının plazmadan tetradekapeptid olarak izole ettiği bu maddenin kimyasal yapısı ve tiplendirilmesi 1963'te gerçekleştirilebilmiştir [35].

Başlangıçta homeostazis düzenleyici olarak endokrin sistemde yer aldığı düşünülen RAAS'nin fizyolojik görevlerinin dışındaki immünolojik, metabolik ve büyüme faktörlerini uyarıcı etkilerinin hipertansiyon gelişiminden önemli derecede sorumlu olduğu bildirilmektedir [36, 37].

Anjiyotensin oluşurken, önce böbreklerden renin ve onun inaktif prekürsörü olan prorenin dolaşıma bırakılır. Renin, böbrekte jukstaklomerüler hücrelerden salgınır ve karaciğerden plazmaya verilen anjiyotensinojenin anjiyotensin I'e çevrilmesi reaksiyonunu katalize eder. Karaciğer kaynaklı anjiyotensinojeni N-terminalinden keserek bir dekapeptid olan anjiyotensin I (Ang I)'i oluşturur. Anjiyotensin I, akciğerlerde vasküler endoteliyumun luminal yüzeyindeki dipeptidil karboksipeptidaz olan anjiyotensin dönüştürücü enzim (angiotensin converting enzyme, ACE) tarafından aktif form olan anjiyotensin II (Ang II)'ye dönüştürülür. Ayrıca Ang I, üç doku nötral endopeptidaz (NEP 24.11, NEP 24.15 ve NEP 24.26) tarafından heptapeptid Ang-(1-7)'ye dönüştürülebilir. Anjiyotensin II, aminopeptidazlar tarafından Ang III ve Ang IV'e yıkılır (Şekil 2.4) [38].

Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi'nin aktif bir elemanı olan Anjiyotensin II, 8 aminoasitten oluşmuş oktapeptid bir hormondur. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi'nin fizyolojik ve patolojik etkileri Ang II üzerinden

gerçekleşir. Anjiyotensin II kan dolaşımında 30-120 saniye kalarak etkisini reseptörler düzeyinde gösterir (Şekil 2.4) [26, 37, 39].



Şekil 2.4. Renin-anjiyotensin sistemi ile anjiyotensin II'nin oluşması [26]

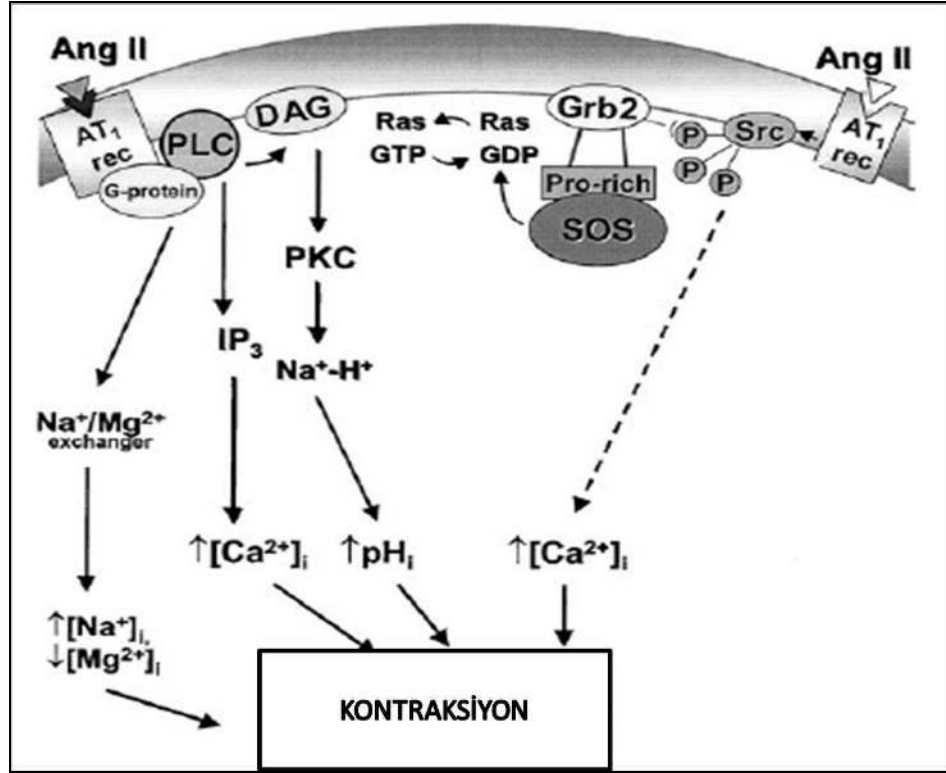
Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi'nin komponentleri birçok dokuda sentezlenmektedir. Renin harici tüm RAAS üyeleri vasküler dokularda gösterilmiştir. ACE plazmada dolaşan bir hormon olarak, intersitisyumda ve intrasellüler olarak bulunur. Doku ACE kalp, beyin, kan damarları adrenal bez, böbrek, karaciğer ve üreme organları gibi majör organlarda bulunmaktadır. Vasküler dokular reninden yoksun olmalarına rağmen Ang II'nin lokal üretimi doku ACE tarafından düzenlenmektedir [26, 40]. Anjiyotensin II'nin AT1 reseptörüne bağlanmasıyla periferik damarlarda vazokonstriksiyon, aldosteron sentez ve salınımı, renal tübüler sodyum geri Emilimi, santral sinir sistemi (SSS) aktivitesi ve vasopressin salınımı uyarılır, negatif geri besleme ile renin salınımı inhibe olur. Ayrıca Ang II, güçlü bir büyüme faktörü ve mitojen olup hücre ve matriks çoğalmasını uyarır. Kan basıncında yükselme olduğunda negatif geri besleme yoluyla jukstaklomerüler hücrelerden renin salgısı azalır. Bu nedenle esansiyel hipertansiyonu olanlarda bu inhibisyona bağlı olarak plazma renin düzeyinin düşük olması beklenir. Ancak hipertansiflerde plazma renin düzeyleri homojen olmayıp kan basıncı düzeyi ile orantılı değildir. Sadece %30'unda renin düzeyi düşük olup %50'sinde normal, %20'sinde ise yüksektir. Hipertansif hastalarda plazma renin düzeyleri farklılık gösterir [26, 41-43]. İskemik nefronlardan salınan renin, plazma düzeyini farklı seviyelerde artırarak normal ya da yüksek plazma renin düzeylerine neden olur. İskemik nefronlardan salınan aşırı renin dolaşıma geçerek Ang II oluşumuna yol açar. Sonuçta, hiperfiltrasyon yapan nefronlarda aşırı vazokonstriksiyon ve sodyum tutulumu gerçekleşerek hipertansiyon

gelişir. Plazma renin düzeyinin hipertansiflerde normal olmasının diğer bir nedeni, bu esansiyel hipertansifler arasında önemli bir oranda non-modülatör kişiler olmasıdır [44]. Yani bu kişilerde sodyum kısıtlamasına yanıt olarak aldosteron salgılanması uyarılmaz. Ayrıca rezistans damarların Ang II'ye olan duyarlılığında artış meydana geldiği ve renin ve Ang II'nin düşük serum düzeylerinde bile kan basıncının yükselebileceği öne sürülmüştür. Klasik RAAS'den ayrı olarak kalpte, kan damarlarında, beyinde ve adrenal kortekste lokal Ang II üretimiyle sonuçlanan doku RAAS'de tanımlanmıştır. Özellikle patolojik olaylarda lokal Ang II üretimi ACE aktivitesinden bağımsız olarak alternatif yollarla oluşabilmektedir. Kalpte ve kan damarlarında Ang II oluşumundan serin proteaz kinaz aktivitesi sorumlu tutulmaktadır. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi'nin bu dokularda da aktivitesini sürdürmesi, kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde bilinenden daha yaygın bir rol aldığını düşündürmektedir [45].

2.3.1. Anjiyotensin II Reseptörleri ve Görevleri

Anjiyotensin II hücrelerde etkisini membran reseptörleri üzerinden gösterir. Anjiyotensin II'nin bilinen dört reseptörü vardır. Bu reseptörlerden AT1R ve AT2R diğerlerine göre daha iyi tanımlanmıştır. Anjiyotensin II memeli hücrelerinde, AT1R ve AT2R olarak adlandırılan yüksek afiniteli plazma membran reseptörleri üzerinden etkisini gösterir [46, 47]. Nöroblastoma hücrelerinde AT3R bulunurken, AT4 endotelyum, vasküler düz kas hücreleri ve beyin korteks bölgelerinde bulunur [42].

Anjiyotensin II'nin etkilerinin çoğu AT1 reseptörü aracılığıyla gerçekleşmektedir. Yedi transmembran üniteli G protein bağımlı reseptör ailesinden olan AT1R, Ang II'nin bağlanmasıyla vasküler düz kas hücrelerinde (VDKH) tipik etkisini heteromerik Gq proteini üzerinden fosfolipaz C'yi aktive ederek gösterir. Anjiyotensin II'nin AT1R'a bağlanmasıyla oluşan sinyal iletim yolları; PLC'nin G proteinleri aracılı aktivasyonu, fosfatidil inositolün hidrolizi ve inositol trifosfat (IP3) ve diaçilgliserolün (DAG) oluşumuna neden olması, hücreye kalsiyum (Ca^{+2}) girişinin artması ve hücre içi kalsiyumun mobilize olması ile sitozolik serbest Ca^{+2} konsantrasyonunun artması, protein kinaz C'nin (PKC) aktivasyonu, Na^{+}/H^{+} pompasının uyarılması ile hücre içi pH'nın alkaliye kayması, hücre içi serbest Na^{+} ve Mg^{+2} konsantrasyonunun değişmesi, Src ailesi kinazların aktivasyonu ve Ras üzerinden MAPK'ların aktivasyonudur (Şekil 2.5) [48, 49]. Anjiyotensin II reseptörü 1 düz kas hücrelerinde yüksek oranda, adventisiyada daha az oranda ve tespit edilemeyecek kadar az bir oranda da endotelde bulunur [50].



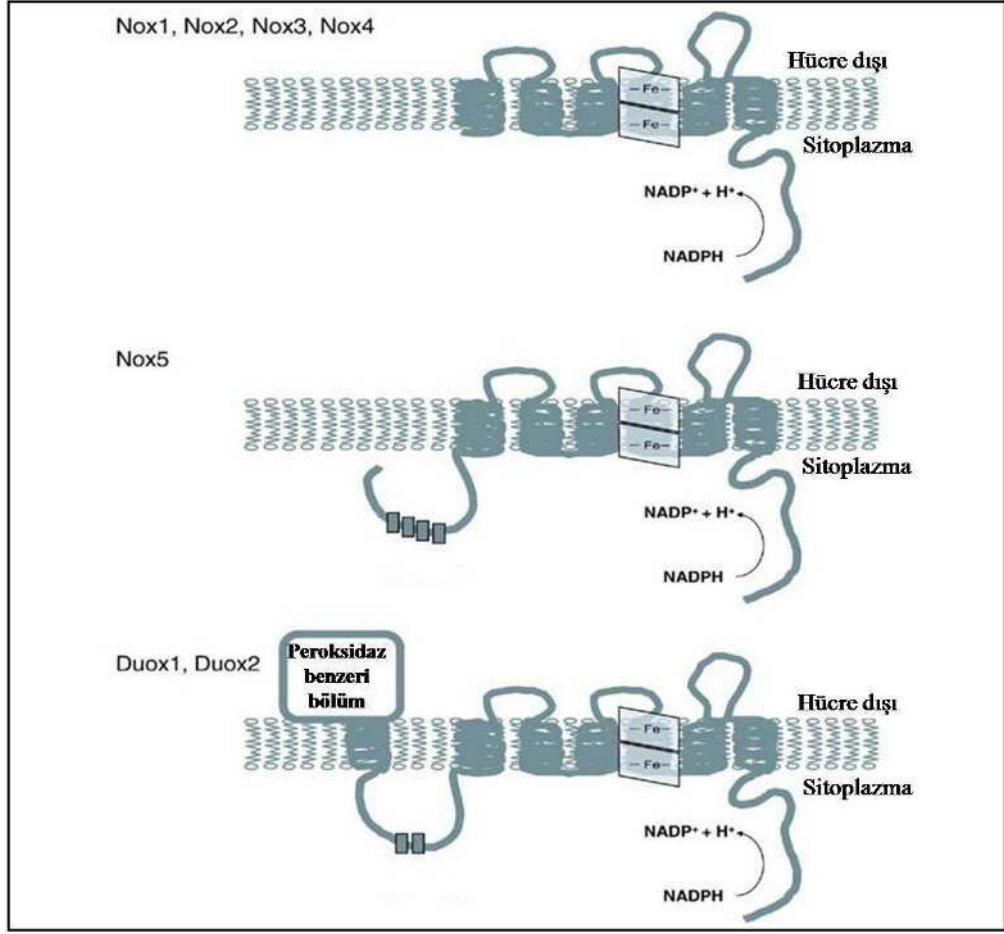
Şekil 2.5. AngII'nin AT1 reseptörüne bağlanması ile gerçekleşen sinyal iletim yolları [26]

Anjiyotensin II reseptörü 2 ise fetal dokularda büyük miktarlarda eksprese edilirken fetal dönem sonrası büyük oranda azalmaktadır [51]. Anjiyotensin II reseptörü 2'nin fonksiyonel rolü ve kesin sinyal yolları belirsiz olmasına rağmen, kısmen sodyum gibi intrasellüler katyonlar tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Fizyolojik şartlar altında AT1R üzerinden gerçekleşen etkileri antagonize eder. Bu etkiler, hücre büyümesi inhibisyonu, apoptozis ve vazodilatasyonun indüklenmesidir [52-54].

2.4. NAD(P)H Oksidaz Sistemi (NOX)

Daha çok NAD(P)H oksidaz olarak bilinen bu enzim kompleksi, vasküler ve renal hücrelerdeki reaktif oksijen türleri (ROS; Reactive Oxygen Species) üretiminin major kaynağı olarak kabul edilmiştir. Daha da önemlisi, bu enzim kompleksi hipertansiyonu da içeren çok sayıda kardiyovasküler hastalıkta Ang II-aracılı $O_2^{\bullet-}$ oluşumundan sorumludur [55].

Bir multi enzim kompleksi olan NAD(P)H oksidaz ailesi, 7 üyeden oluşur: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 ve DUOX2. Bütün NOX ailesi üyeleri 6 transmembran bölümü (2 hem bağlama bölgesi) ve nispeten uzun sitoplazmik C-terminali (FAD ve NADPH bağlama bölgesi) içeren aynı çekirdek yapıya sahiptir. NOX1, NOX2, NOX3 ve NOX4 yukarıda tanımlanmış NOX çekirdek yapısını içerirken; NOX5, DUOX1 ve DUOX2 N-terminal uzantısıyla karakterizedir [56].



Şekil 2.6. NOX ailesinin üyeleri [57]

NOX1, kolon epitelyumunda ve vasküler düz kas hücrelerinde baskın bir şekilde eksprese edilir. Esas olarak iki majör görevi olduğu düşünülmektedir. Bunlardan birincisi ROS bağımlı savunma mekanizması fonksiyonuyla bakterilerin öldürülmesi ve diğeri redoks duyarlı hücre içi sinyal iletim mekanizmasının aktivasyonunun stimülasyonudur [56, 58].

NOX2, yaklaşık 20 yıl önce insan nötrofillerinde belirlenmiştir. Bir savunma enzimi olması dışında, kronik granulo mutaz hastalığının tablosuna da eşlik eder.

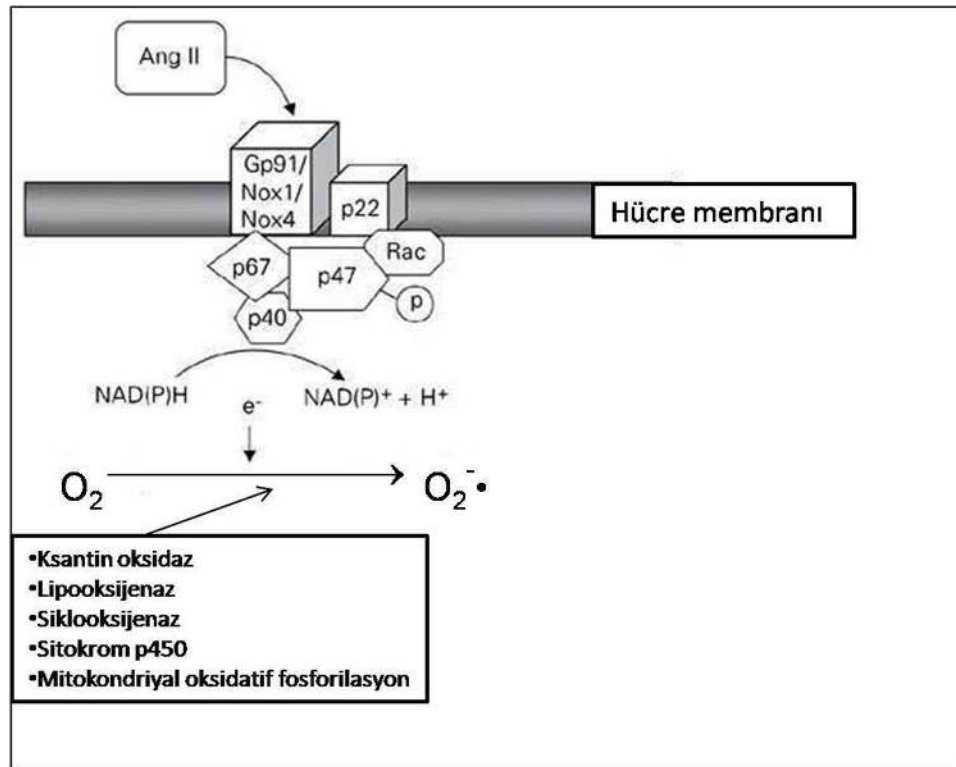
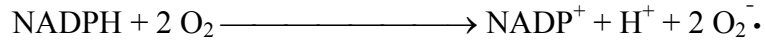
NOX3, iç kulağın vestibular ve kohlear endotelinden eksprese edilir. Otokonianın morfogenezi ile ilişkilidir ve böylelikle denge duyusunu kontrol eder.

NOX4, böbrekte tespit edilmiştir ve Renox olarak adlandırılmıştır. NOX1, NOX2 ve NOX3 ile benzer aktiviteye sahiptir.

NOX5 hakkında az bilgi vardır. Lenfoid hücreler, testis ve prostat kanser hücrelerinden eksprese edilir.

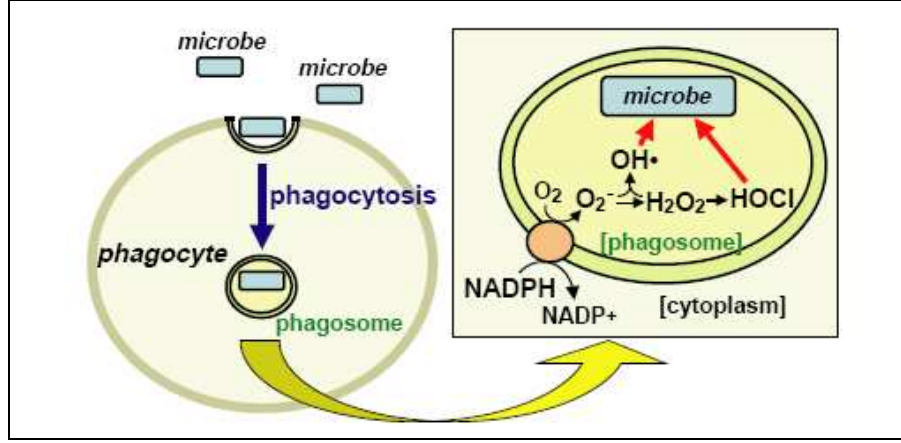
DUOX1 ve DUOX2 tiroid hücrelerinden eksprese edilir ve bu sebepten tiroid oksidaz olarak da bilinirler. Tiroid hormonlarının sentezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [56, 58].

NAD(P)H oksidaz, NADPH'ı kullanarak O_2 üzerine bir elektron aktarılmasını sağlar ve $O_2^{\cdot-}$ (süperoksit anyonu) oluşumuna sebep olur. Bu reaksiyon şu şekilde gerçekleşmektedir (şekil 2.7).



Şekil 2.7. NAD(P)H oksidaz kompleksi üzerinden süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) oluşması [4].

NAD(P)H oksidaz savunma sisteminde fagositlerde bulunur ve yüksek miktarda süperoksit radikali oluşturur. Granül (fagozom) içerisindeki NAD(P)H oksidaz enzimi solunumsal patlama olayını gerçekleştirmektedir. Solunumsal patlama sonunda, aralarında süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve singlet oksijenin (1O_2) yer aldığı reaktif oksijen ara ürünleri ile hipokloröz asit (OCl^-) gibi güçlü oksidan maddeler yapılmakta ve mikrobisidal etki göstermektedir (Şekil 2.8) [59].



Şekil 2.8. NADPH oksidaz enizminin fagositozdaki rolü [59]

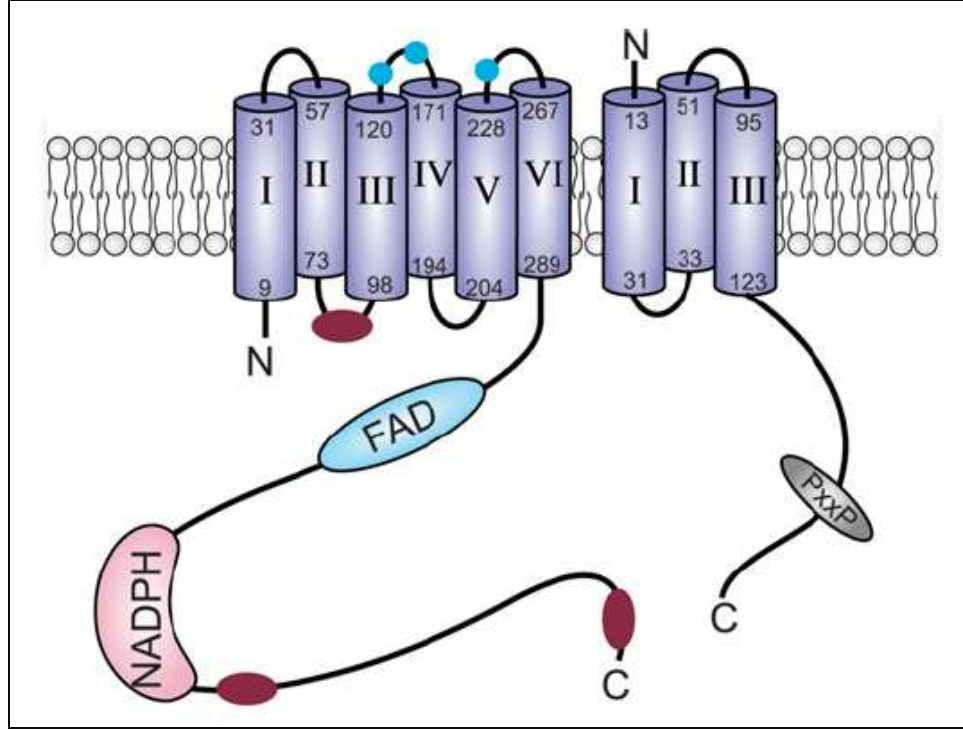
NOX enzimi yaygın bir şekilde endotelde, dalakta, böbrekte ve vasküler düz kas hücrelerinde (VDKH) de bulunmaktadır [60, 61].

NAD(P)H Oksidaz enzim sistemi yapısal olarak altı komponentten oluşmaktadır.

1. $p47^{PHOX}$
2. $p67^{PHOX}$
3. $p40^{PHOX}$
4. rac-2
5. $p22^{PHOX}$
6. $gp91^{PHOX}$

NOX, iki membrana bağlı element ($gp91^{PHOX}$ ve $p22^{PHOX}$), üç sitozolik komponent ($p67^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$ ve $p40^{PHOX}$) ve düşük moleküler ağırlıklı G proteininden (rac2 ya da rac1) oluşmaktadır. Hücreler uygun bir uyarı ile karşılaştığında inaktif NOX aktif duruma geçer. NOX enzim kompleksinin aktifleşmesi için sitozolik komponentlerin membrana translokasyonu ve bunların sitokrom b_{558} ile ilişkisi gerekmektedir. Sitokrom b_{558} , $gp91^{PHOX}$ ve $p22^{PHOX}$ dan oluşan bir komplekstir. Aktivasyon sırasında $p67^{PHOX}$ ve $p47^{PHOX}$ proteinleri membrana transloke olur ve sitokrom b_{558} ile etkileşerek aktif NAD(P)H oksidazı oluşturur. Sitokrom b_{558} elektronları NADPH'dan O_2 'ye taşır.

Sitokrom b_{558} : NOX'un bir komponenti olarak tanımlanmış olan Sitokrom b_{558} , özel absorbanans piki nedeniyle bu adı almış, membrana bağlı bir flavohemoproteindir. İstirahat halindeki nötrofillerde % 85'i plazma membranı ile birleşen spesifik granüller ve intraselüler sekretuar veziküllerin membranlarında bulunurlar. Uyarımla beraber bu organeller plazma membranı ile birleşir ve sitokromu hücre yüzeyine transfer ederler. Sitokrom b_{558} , $p22^{PHOX}$ ve $gp91^{PHOX}$ dan oluşan bir komplekstir ve sadece denatürasyon ile birbirinden ayrılır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Sitokrom b558'in yapısı [62].

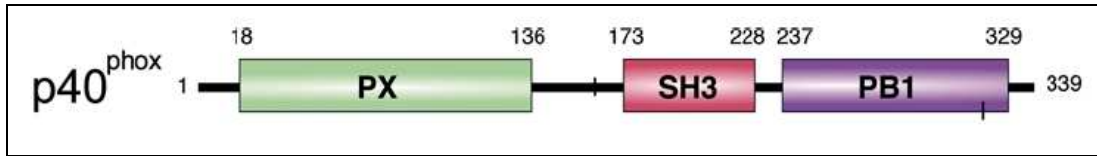
gp91^{PHOX}: Sitokrom b₅₅₈'in β altünitesi olarak da adlandırılan gp91^{PHOX}, 570 aminoasitten oluşur ve 65,3 kDa ağırlığındadır. Fakat SDS page'de içerdiği üç asparajin (Asn¹³², Asn¹⁴⁹, Asn²⁴⁰) biriminin heterojen glikozilasyonundan dolayı 91 kDa'da bant verir. Sitoplazmik C terminal bölümü FAD ve NADPH bağlama bölgeleri içerirken, N terminal bölgesi 300 aminoasit içeren 6 adet transmembran α -heliksinden oluşur. gp91^{PHOX} yapısındaki iki çift histidin birimi vasıtasıyla NADPH oksidazın özdeş olmayan hem gruplarının kompleks oluşturmasından sorumludur. Bundan dolayı gp91^{PHOX} iki basamakta meydana gelen elektron transfer reaksiyonu için gerekli olan tüm kofaktorleri içerir. İlk olarak elektronlar NADPH'dan FAD'a, oradan da hem gruplarına aktarılır. Ardından ikinci basamakta O₂'ye bir elektron transfer edilmesiyle süperoksit anyonu oluşur.

p22^{PHOX}: Hücre membranının iki tarafında da sarkmış durumda bulunan transmembranel bir proteindir ve α -altünite olarak da adlandırılır. 195 aminoasitten oluşur ve 21 kDa ağırlığındadır. gp91^{PHOX} ile kompleks oluşturur ve bunun stabilizasyonuna katkıda bulunur. Sitoplazmik C terminal bölümü herhangi bir ikincil yapı göstermezken, PxxP denilen proline zengin bölgeler içerir. N terminali 3 adet transmembran α -heliksi içerir. Proline zengin bölgeler, p47^{PHOX}'un SH3 bölümlerinin hedefi olarak bilinir.

Bu proteinin yapısı diğer sitokromlar ile çok az benzerlik gösterir. Sitokrom b₅₅₈'de bulunan hem'in ya iki adet p22^{PHOX} molekülüne ya da bir adet p22^{PHOX} ve bir adet gp91^{PHOX}'e ait bir histidin molekülüne bağlı olduğu düşünülmektedir. p22^{PHOX} komponenti eksik bireylerde mutasyonların çoğu sitokrom kaybına yol açar. Kronik

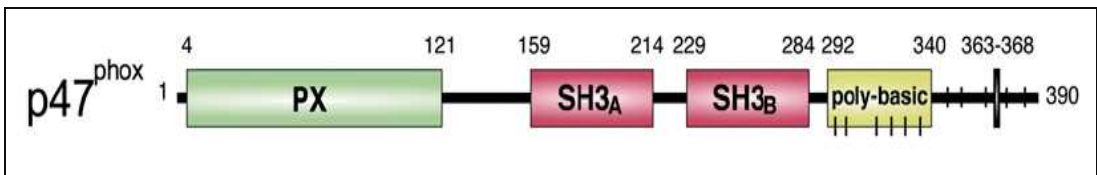
granülo-matoz hastalığında gp91^{PHOX}, un stabilitesi, p22^{PHOX}, un varlığına bağlıdır. p22^{PHOX} eksikliği olan enzimlerde, gp91^{PHOX}, un polipeptidi de yoktur.

p40^{PHOX}: p40^{PHOX}, 339 aminoasitten oluşan bir proteindir. p40^{PHOX}, bir PX bölgesi, bir SH3 bölgesi ve bir PB1 bölgesinden oluşur. p40^{PHOX}, p67^{PHOX} ve p47^{PHOX} ile birlikte, ko-immünopresipitasyon ve ko-pürifikasyonla tespit edilen en son NADPH oksidaz alt ünitesidir. p40^{PHOX}, un oksidaz regülasyonundaki tam rolü hala tartışmalıdır ve hem aktivatör hem de inhibitör olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.10).



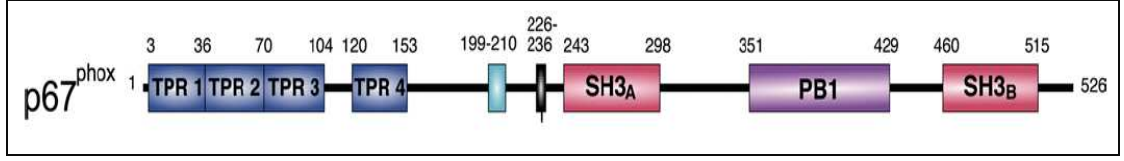
Şekil 2.10. p40^{PHOX}, un yapısı [62].

p47^{PHOX}: Başka proteinlerle etkileşime girebilen iki SH3 birimi içeren, 390 aminoasitlik bazık bir proteindir. p47^{PHOX} mRNA'sı ve protein ekspresyonu fagositik hücrelere özgündür. p47^{PHOX} NAD(P)H oksidazın fonksiyonu için hayati bir öneme sahiptir. Esas rolünün p67^{PHOX}, un plazma membranına tutunması olduğu düşünülmektedir. Uyaranla etkileşimin ardından hücre iskeletiyle interaksiyona girer ve sonra sitokrom b₅₅₈ ile birleşeceği plazma membranına doğru hareket eder. Bu etkileşimlerin temelinde p47^{PHOX}, a ait SH3 birimi yer alır. Aktivasyon sonucu bu birim p22^{PHOX} ile etkileşim için hazır hale gelmiş olur. Bazı çalışmalar, protein kinaz C'nin p47^{PHOX}, u fosforillelediğini ve protein kinaz C inhibisyonunun hem p47^{PHOX}, un hücre iskeletiyle ilişkisini hemde süperoksit üretimini engellediğini göstermiştir. p47^{PHOX}, un birçok fosforilasyon bölgesi vardır ve oksidaz aktivitesi için gereklidir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. p47^{PHOX}, un yapısı [62].

p67^{PHOX}: Protein kinaz C tarafından fosforile edilir ve fosforilasyon sonrası p47^{PHOX} ile kompleks oluşturur. Yapılan bir çalışmaya göre p67^{PHOX}, un NOX fonksiyonu için gerekli olan bir aktivasyon birimi bulunmaktadır. p67^{PHOX} sitokrom b₅₅₈ içinde NADPH'dan moleküler oksijene elektron transferini gerçekleştirir (Şekil 2.12).

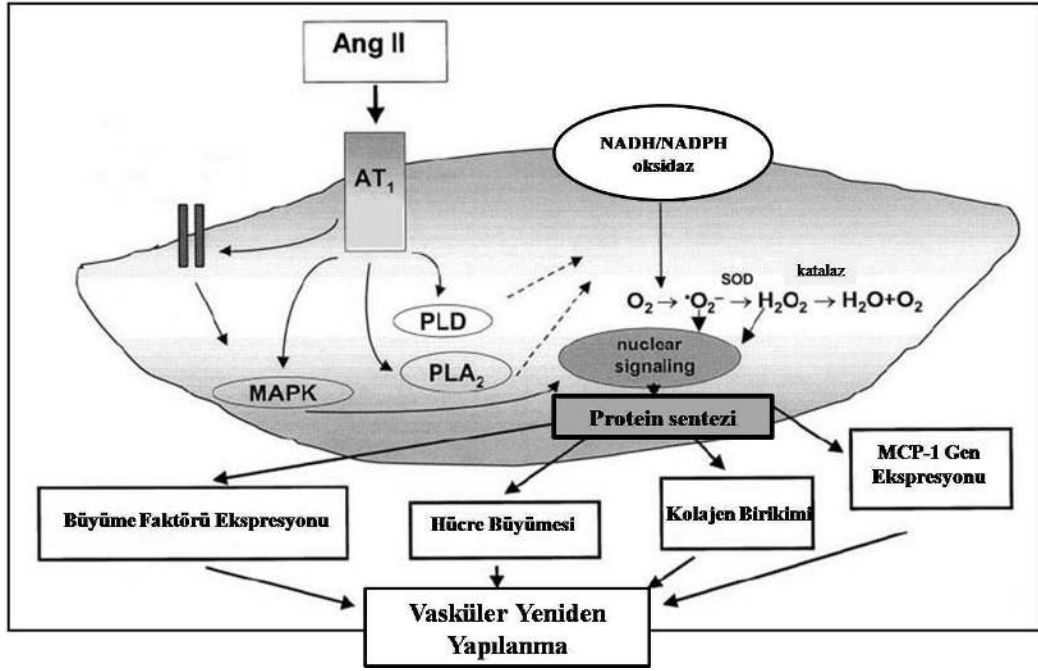


Şekil 2.12. p67^{PHOX}, un yapısı [62].

rac-2: NOX'un aktivasyonunda kritik bir rol oynadığı ilk kez 1980'lerin sonunda anlaşılmıştır. Guanin nükleotidlerinin oksidaz aktivitesini stimüle ettiği gösterildiğinde, GTPaz'ın NADPH oksidaz aktivasyonunda rol oynadığı düşünüldü. Akabinde GTPaz Rac-1 veya Rac-2 olarak tanımlandı. Ve bunun varlığında oksidazın tam olarak fonksiyon gösterdiği belirlendi. Rac, GTPaz'ların Rho-ailesi'ne dahildir. Çeşitli sinyal yollarının düzenlenmesinde ve moleküler değişikliklerde rol alır. Rac aktivitesi Guanin nükleotidlerinin tipine bağlı olarak değişir. GTP bağlanırsa aktifleşir, GDP bağlanırsa inaktifleşir. Aktif-inaktif formlar arasındaki dönüşüm GEF'ler (Guanin Nucleotide Exchange Factors) tarafından düzenlenir. GEF, GDP'nin serbest bırakılıp GTP'nin bağlanmasını gerçekleştirir. Koga ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma rac-2'nin p67^{PHOX}, un N-terminali ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu ilişki oksidaz aktivitesi için gereklidir. Diğer taraftan Philips ve arkadaşlarının çalışması rac-2 translokasyonunun oksidaz aktivitesi ile ilişkili olmadığını göstermiştir. Son dönemde yapılan bir çalışmada da rac-2'de gerçekleşen bir inhibitör mutasyonunun insanlarda nötrofil bozukluğu sendromuna yol açtığı gösterilmiştir [62].

Hipertansiyonun patogenezinde özellikle NAD(P)H oksidaz aracılığıyla oluşan ROS üretiminin rolü olduğunu destekleyen birçok kanıt bulunmaktadır. Ang II infüzyonu aracılığıyla oluşturulmuş hipertansiyonlu rat modellerinde, NAD(P)H oksidaz altünitelerinin hem ekspresyonu hem de aktivitesi yükselmiştir. NAD(P)H oksidaz inhibitörünün katılmasıyla vasküler O₂⁻ üretimi azalmış ve Ang II ile indüklenen kan basıncı artışı azalmıştır. Sitozolik p47^{PHOX} altünitelerinden yoksun farelerde Ang II'ye hipertansif cevap belirgin bir şekilde körelmiştir ve bu hayvanlarda Ang II infüze edilmiş yabancı tip farelerde gözlenen endotelial disfonksiyon ve O₂⁻ üretimindeki benzer artış görülmemektedir. Son zamanlarda tamamlanmış iki çalışmada NAD(P)H oksidazın NOX1 içeren izoformu, Ang II'ye hipertansif yanıtın oluşmasına aracılık eder. NOX1 defektli farelerde vasküler O₂⁻ oluşumu ve Ang II'ye cevap azalmış iken, NOX1 overeksprese transgenik farelerin düz kasında Ang II'ye yanıt olarak O₂⁻ seviyeleri ve kan basıncı artmıştır. İlginç bir şekilde, her iki çalışma da Ang II aracılı kan basıncı artışında NOX1'in rolünü desteklerken, bulgularına ilişkin Ang II'ye olan vasküler hipertrofik yanıt farklıdır. NOX1 overeksprese farelerde aortada Ang II'ye olan hipertrofik yanıt artmışken, Ang II indüklü aortik hipertrofi yabancı-tip ve NOX1 defektli hayvanların her ikisinde de belirgindir. Farelerde in-vivo Ang II ilişkili vasküler hipertrofide gerekli H₂O₂ üretilirken, katalazın düz kas spesifik overekspresyonu ile oluşan hipertrofik ve hipertansif yanıt arasında çok az fark olduğu görülmüştür. Oluşan H₂O₂ kan basıncı üzerine önemli bir etki yapmamıştır. Böylece ROS'un son organ hasarıyla ilgili bazı yolları içerebileceği, kan basıncı üzerine direkt etkisinin bağımsız olduğu görülmüştür.

Hipertansiyonda ROS oluşumu çalışmalarının çoğunda eksojen Ang II'nin farmakolojik dozları kullanılmasına rağmen, bazı çalışmalar hipertansiyon süresince ROS oluşumundaki artışta endojen renin-anjiyotensin sisteminin de rolü olduğunu içermektedir. Renovasküler hipertansiyon modelinde (bu model renin-anjiyotensin sistemin aktivasyonundaki artışla bağlantılıdır) gp91^{PHOX} içeren NAD(P)H oksidaz tarafından O₂⁻ üretimindeki artış endotelial disfonksiyonla ilişkilidir ve kısmen kan basıncındaki artışa katkıda bulunur (Şekil 2.13).



Şekil 2.13: NAD(P)H Oksidaz üzerinden oluşan ROS nükleus üzerine etki ederek çeşitli proteinlerin sentezini stimüle eder [26].

Benzer şekilde, Dahl ratlarda (hipertansiyona duyarlı rat) tuza duyarlı hipertansiyon gelişimi lokal renin-anjiyotensin sisteminin aktivasyonu ile birlikte görülebilir. Bu hayvanların anjiyotensin reseptör blokörü ile tedavisiyle tuz uyarımlı aortik O₂⁻ artışı azalmıştır. Tuza duyarlı hipertansiyonun gp91^{PHOX} içeren NAD(P)H oksidaz inhibitörü ile tedavisinde de aortik O₂⁻ üretimindeki artışın ve pro-inflamatuar moleküllerin ekspresyonunun engellendiği görülmüştür. Bununla beraber ne anjiyotensin reseptör blokörü candesartan ne de gp91^{PHOX} inhibitörü sistolik kan basıncını düşürmemiştir [9].

Spontan hipertansif (SHR) ratlarda aorta ve serebral arterlerde O₂⁻ üretimi, normotansif Wistar-Kyoto (WKY) kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir. Endotelin - 1 gibi diğer bazı uyarılarda NAD(P)H oksidaz üzerinden O₂⁻ üretimini arttırıcı etki göstermektedir [9].

2.5. Src ve NAD(P)H Oksidaz İlişkisi

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, Ang II uyarımı sonrasında, NAD(P)H oksidaz ve Src arasındaki ilişkide bir çelişki olduğunu göstermektedir. Seshiah PN et

al. [15] 2002 yılında yapmış olduğu çalışma, vasküler düz kas hücre kültüründe Ang II uyarımından sonra NOX aktivasyonunu takiben Src aktivasyonunun olduğunu gösterirken, Cifuentes ME et al. [63] 2003 yılında yaptıkları çalışma ile Laplante MA ve Champlain J [64] 2006 yılında VDKH'lerinde yapmış olduğu çalışmalar, NOX'un aktivasyonu için önce Src'nin aktive olduğunu göstermektedir. Araştırma grupları, hipertansiyon tedavisinin geliştirilmesi için bu metabolik yolun daha iyi anlaşılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir.

MATERYAL ve METOD

3.1. Deney Modeli ve Kontrol Grubu

Deneyde kullanılan 250-350 g ağırlığındaki 20 adet 12-14 haftalık erkek spontan hipertansif ratlar ve 20 adet wistar-kyoto ratlara ait aortalar, Fizyoloji AD. öğretim üyelerinden Doç. Dr. Filiz GÜNDÜZ'ün 2006.01.0103.011 no'lu projesi için alınan ratlardan temin edildi. Etik kurul onayı; Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Bakım-Kullanım ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul onayı 13.05.2008 tarih ve 6 nolu karar sayısı ile alınmıştır.

Grup 1: Spontan Hipertansif Ratlar (SHR)

Grup 2: Wistar-Kyoto Ratlar (WKY)

Her iki gruptan izole edilen vasküler düz kas hücrelerinden yapılan primer hücre kültüründe;

- Ang II uyarımı sonucunda, spektrofotometrik yöntem ile süperoksit anyonu oluşumu ve Western Blot yöntemi ile Src aktivasyonu,
- Ang II + Losartan (AT1 reseptör inhibitörü) uyarımı sonucunda, spektrofotometrik yöntem ile süperoksit anyonu oluşumu ve Western Blot yöntemi ile Src aktivasyonu,
- Ang II + GF109203X (PKC inhibitörü) uyarımı sonucunda, spektrofotometrik yöntem ile süperoksit anyonu oluşumu ve Western Blot yöntemi ile Src aktivasyonu,
- Ang II + DPI (NAD(P)H oksidaz inhibitörü) uyarımı sonucunda, spektrofotometrik yöntem ile süperoksit anyonu oluşumu ve Western Blot yöntemi ile Src aktivasyonu,
- Ang II + PP1 (Src ailesi tirozin kinaz inhibitörü) uyarımı sonucunda, spektrofotometrik yöntem ile süperoksit anyonu oluşumu ve Western Blot yöntemi ile Src aktivasyonu ölçüldü.

3.2. Kan Basıncı Ölçümü [65]

Deney hayvanlarının kan basınçları invazif olmayan “tail-cuff” yöntemiyle kuyruk arterlerinden ölçüldü. Kuyruğa takılan halka şeklindeki basınç probuyla alınan sinyaller MP 150 veri toplama sistemi (BIOPAC Systems, CA-USA) ve MAY-BPHR 9610-PC (Commat Ltd, Ankara) ünitesi aracılığıyla bilgisayara aktarıldı ve ölçümler Acknowledge paket programıyla çizdirilen basınç traseleri üzerinden yapıldı. İstatistiksel analizleri Student T Test kullanılarak yapılmıştır.

3.3. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu [66, 67]

3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar

a) Transfer Medyumu

Solüsyon 0.2 mM olacak şekilde 2.94 mg CaCl_2 tartılıp 10 mL HBSS içinde çözüldü. Çözelti steril 0.22 μm 'lik filtrelerden geçirildi ve 90 mL steril HBSS eklenip final hacim 100 mL'ye tamamlandı. Total hacimde % 2 oranında 2 mL penisilin-streptomisin (PS) antibiyotiği eklendi ve +4 $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

b) Enzimatik Ayırıştırma Solüsyonu (EAS)

Final hacim 4 mL olacak şekilde steril HBSS solüsyonu içerisinde (Ca^{+2} - Mg^{+2} içermeyen) 0.2 mM Ca^{+2} (CaCl_2), 15 mM HEPES (pH: 7.2-7.3), 0.0625 mg/mL elastaz, 0.25 mg/mL soya tripsin inhibitör (STİ), 0.5 mg/mL kolajenaz, 2.0 mg/mL bovine serum albumin (BSA) çözüldü. Bunun için aşağıdaki stok solüsyonlar hazırlandı:

a. Kalsiyum Klorür (CaCl_2)

Solüsyon 0.2 mM olacak şekilde, 10 mL HBSS solüsyonu içerisinde 2.352 mg CaCl_2 çözüldü. Çözelti 0.22 μm 'lik steril filtreden geçirildi ve steril olarak +4 $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Final hacim 4 mL olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 0.5 mL alınıp enzimatik ayırıştırma solüsyonuna eklendi.

b. HEPES

Solüsyon 15 mM olacak şekilde, 10 mL HBSS içerisinde 143.1 mg HEPES çözüldü. Çözelti 0.22 μm 'lik steril filtreden geçirildi ve steril olarak +4 $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Final hacim 4 mL olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 1 mL alınıp enzimatik ayırıştırma solüsyonuna eklendi.

c. Elastaz

Steril toz şeklinde bulunan 5 mg tip E pankreatik elastaz (90 U), 5 mL HBSS'de çözüldü. Stok solüsyon, 10 adet 0.5 mL'lik steril plastik tüplere bölündü ve -20 $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Her plastik tüp 2 kullanımlık olacak şekilde ayarlandı. Her tüpde 0.0625 mg/mL elastaz olacak şekilde 250 μL stok solüsyon enzimatik ayırıştırma solüsyonu ile 4 mL'ye tamamlandı.

d. Soya Tripsin İnhibitör (STİ)

Solüsyon 0.25 mg/mL olacak şekilde, 5 mL HBSS solüsyonu içerisinde 5 mg STİ Tip I-S tartılıp çözüldü. Çözelti 0.22 μm 'lik steril filtreden geçirilir ve +4 $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Final hacim 4 mL olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 1 mL alınıp enzimatik ayırıştırma solüsyonuna eklendi.

e. Kolajenaz Tip I-A

Steril toz şeklinde bulunan 100 mg kolajenaz (125 U), 12.5 mL HBSS'de çözüldü. Stok solüsyon 25 adet 0.5 mL'lik steril plastik tüplere bölündü ve -20 $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Her tüp 2 kullanımlık olarak ayarlandı. Her tüpde 0.5 mg/mL kolajenaz olacak şekilde 250 μL stok solüsyon, enzimatik ayırıştırma solüsyonu ile 4 mL'ye tamamlandı.

f. Bovine Albumin

Solüsyon 2 mg/mL olacak şekilde, 5 mL HBSS solüsyonu içerisinde 80 mg albumin tartılıp çözüldü. Çözelti 0.22 µm'lik steril filtreden geçirildi ve +4 °C'de saklandı. Final hacim 4 mL olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 0.5 mL alınıp enzimatik ayrıştırma solüsyonuna eklendi.

3.3.2. Hücrelerin İzolasyonu

Ratlar, steril koşullar altında eter anestezisi uygulanarak torasik aorta ve abdominal aortanın üst kısmı dissekte edildi. Aorta buz içindeki steril bir petri kabı içine alındı. Petriye transfer medyumu konuldu. Enjektöre çekilen 5 mL transfer medyumu ile aortanın iç çeperi yıkandı. Bu sayede kan ortamdan uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler UV ile steril edilmiş ayrı bir odada, buz içinde ve disseksiyon mikroskobu altında, steril mikro-cerrahi set yardımıyla yapıldı. Aorta segmenti transfer medyumu içeren temiz bir parafinli petri kabına alındı. Aorta boyuna olacak şekilde toplu iğneler yardımıyla parafin bloğa tutturuldu. Disseksiyon mikroskobu altında steril mikro doku makası ve ince uçlu pens yardımıyla aortanın dış kısmındaki yağlar ve venöz yapılar temizlendi. Aorta boyuna kesildi ve dikdörtgen şeklinde açılarak hafif gerilmiş vaziyette uçlarından toplu iğneler ile parafin bloğa tutturuldu. Aortanın dış kısmındaki kılcal damarlar kesilerek alındı. Kalan yağ parçaları tamamen temizlendikten sonra steril bir bistüri yardımıyla aortanın dışı kazındı. Yaklaşık olarak aortanın dıştaki 1/3'lük kısmı bu şekilde temizlendi. Bu sayede, dış damar duvarındaki adventisya dokusu ortamdan uzaklaştırıldı. Disseksiyon mikroskobu altında adventisya dokusu ortamdan uzaklaştırdıktan sonra, petri kabı içerisindeki aortun iç kısmı pamuklu bir çubuk ile hafifçe sıyrıldı. Bu işlem birkaç kez tekrarlandı. Bu sayede aortun lümenine bakan tek katlı epitel dokusu ortamdan uzaklaştırıldı. Adventisya ve endotel ortamdan uzaklaştırdıktan sonra aorta transfer medyumu ile yıkandı ve içinde steril transfer medyumu bulunan 1.5 mL'lik plastik tüpe alındı. Plastik tüp buz içinde hücre kültürünün yapılacağı ortama taşındı.

3.4. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin Kültürü

Primer aortik vasküler düz kas hücre kültürü Gunther et al.'ın yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır [66, 67].

3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar

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

Kalsiyum ve magnezyum içermeyen HBSS solüsyonu 0.4 g/L potasyum klorid, 0.06 g/L potasyum fosfat, 8.0 g/L sodyum klorid, 0.04788 g/L sodyum fosfat, 1.0 g/L D-glukoz içermektedir.

b) 1X Trypsin-EDTA

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

c) Penisilin-Streptomisin Solüsyonu

Solüsyon, 10.000 U penisilin ve 10 mg streptomisin içermektedir.

d) Medyum (Besi Yeri) Hazırlanması

Besi yeri olarak Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kullanıldı. Solüsyon 425 mL medyum üzerine 50 mL fetal bovine serum (FBS) (%10 v/v), 5 mL (%1 v/v) penisilin-streptomisin, L-glutamin 0.584 g/L olacak şekilde, 20 mL saf DMEM'de çözülerek hazırlandı. Solüsyon steril filtrelerden geçirilir ve her şişeye 10 mL konuldu. Konsantrasyonu 25 mM olacak şekilde 5.9625 g Hepes tartıldı ve 20 mL saf DMEM içinde çözülüp steril filtrelerden geçirildi. Her şişeye 20 mL konuldu. Sonuçta toplam 500 mL'lik besi yerleri hazırlandı.

3.4.2. Düz Kas Hücrelerinin Kültürü

Plastik tüp içindeki temiz aorta ve transfer medyumunu steril kültür kabini içerisinde 15 mL'lik doku petrilerine transfer edildi. Transfer medyumunu otomatik pipet ile çekilerek ortamdaki uzaklaştırıldı. Aorta iki adet steril bistüri yardımıyla toplu iğne başı büyüklüğünde küçük parçalara ayrıldı. Bu sayede enzimle reaksiyona girecek olan dokunun yüzey alanı arttırılmış oldu. Daha önceden hazırlanmış ve 37 °C sıcaklığa getirilmiş 4 mL EAS petriye eklendi. Petrinin etrafı parafilm ile sarıldı ve 37 °C'lik etüvde, 45 dakika hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Bu süre içerisinde düz kas dokusu enzimler yardımıyla düz kas hücrelerine ayrıştırılmaya çalışıldı. 45 dakika sonunda petri etüvden çıkarıldı ve steril kültür kabini içerisine alındıktan sonra 10 mL'lik plastik enjektöre çekilen doku süspansiyonu 5-6 kez 14 µm'lik çelik uçlu kanülden geçirildi. 14 µm'lik metal kanül düz kas hücrelerinin mekanik etkiyle birbirinden ayrılmasını kolaylaştırmak için kullanıldı. Petri kabına EAS'nin 2 katı (8 mL) medyum eklendi. Bu sayede enzim konsantrasyonu dilüe edilmiş oldu. Toplam hacmi 12 mL olan hücre süspansiyonu 15 mL'lik steril plastik tüplere alındı ve 200g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra steril ortamda süpernatant kısmı tamamen çekilerek atıldı. Dipteki pellet 10 mL medyum ile tekrar resüspanse edildi. 200g'de 5 dakika santrifüj edildi ve üstteki süpernatant atıldı. Bunun amacı ortamda dilüe halde kalan ve dokuyu yıkan enzimleri (elastaz, kolajenaz) tamamen ortamdaki uzaklaştırmaktır. Hücre pelletleri ısı ile inaktive edilmiş 3 mL DMEM ile resüspanse edildi. Bu hücre süspansiyonu 12.5 cm²'lik doku kültür flaskına transfer edildi. Bu flask 37 °C'de nemlendirilmiş % 5 CO₂ - % 95 atmosferik hava içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin tutunmalarını kolaylaştırmak için ilk 24 saat hücrelere dokunulmadı. Primer kültür 2. günden itibaren rutin olarak her gün invert kontrast mikroskopi ile incelendi. Bu zaman içerisinde hücrelerde herhangi bir enfeksiyonun olup olmadığı kontrol edildi. İlk hücreler tutunmuş olarak flaskta görüldüğü gün veya en geç 4-5. günün sonunda ortamdaki doku yıkıntıları ve hücre atıklarını ortamdaki uzaklaştırmak için bir defaya mahsus olmak üzere hücreler 3 mL medyum ile bir kez yıkandı. Daha sonra hücreleri taze medyum ile beslemek amacıyla 5 mL 37 °C sıcaklıkta medyum eklendi. Medyumlar 24-72 saat aralıklar ile rutin olarak değiştirildi.

3.4.3. Hücrelerin Pasajlanması (Tripsinizasyon)

Pasajlanacak olan hücrelerin bulunduğu kültür kabının medyumunu çekildi. Hücreler 37 °C'ye getirilmiş 5 mL HBSS ile 1 kez yıkandı. HBSS aspire edildi. 5 mL 1X tripsin-EDTA flaskta konuldu ve 37 °C'lik etüvde 5 dakika inkübe edildi. Üzerine 5 mL medyum eklendi ve hafifçe çalkalandı. Steril pipet yardımıyla 10 mL'lik solüsyon 15 mL'lik plastik santrifüj tüpüne alındı. 1450 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve dipteki pelet 1 mL medyum ile süspanse edildi. Bölünecek flask sayısına göre her bir flaskta 5 mL medyum olacak şekilde medyum

eklendi ve flasklara bölündü. Bölünen flaskların 24 saat sonra medyumları değiştirildi.

3.4.4. Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığı Testi

Hücre kabı içerisindeki hücreler tripsinize edildi ve santrifüj sonrası dipte oluşan pellet 1 mL medyum ile süspanse edildi. 100 µL hücre süspansiyonu, 100 µl % 0.5'lik tripan blue ile süspanse edildi. Hücreler thoma lamına alındı ve mikroskopta 20x'lik büyütmeyle incelendi. Membranı mavi boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak kabul edildi.

Hücre sayımı için thoma lamı üzerindeki 5 farklı alan sayılıp toplandı. Toplam sayı 5'e bölündü ve çıkan değer 10^6 ile çarpılıp 1 mL'deki hücre sayısı hesaplandı.

3.4.5. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu

3.4.5.1. Hücrelerin İmmünohistokimya Preparatları Haliye Getirilmesi

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

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

İmmünohistokimyasal analizler için preparatlar 4 gruba ayrıldı.

- Vasküler düz kas hücrelerini göstermek için α - aktin primer antikorun 1/800 ve 1/1600 dilüsyonu çalışıldı.
- Endotel hücrelerini göstermek için Von Willebrand faktör primer antikorunun 1/500 ve 1/1000 dilüsyonu çalışıldı.
- İzotip kontrol için sekonder antikor olan fare kaynaklı IgG_{2a}'nın 1/800 ve 1/1600 dilüsyonları çalışıldı.
- Normal boyama kontrolü için PBS ile kontrol grubu çalışıldı.

3.4.5.2. Kullanılan Solüsyonlar

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

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

TBS solüsyonu hazırlamak için 60.55 g Tris, 87.66 g NaCl 800 mL distile suda çözüldü. Solüsyonun pH'sı HCl ile 7.4'e ayarlanır. Final hacim 1000 mL olarak distile su ile tamamlandı.

b) TBS (1X)

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

İmmünohistokimyasal analiz için aşağıdaki protokol takip edildi:

- 1) Hazırlanan preparatlar aseton tanklarına konuldu ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 2) Aseton tanklarından çıkarılıp 20 dakika oda ısısında kurutuldu.
- 3) TBS ile oda ısısında 3 kez 5 dakika yıkandı.
- 4) 5 dakika bloklama solüsyonuyla bloklandı.
- 5) Primer antikör damlatılıp 45 dakika beklendi.
- 6) 3 kez TBS ile 5 dakika yıkandı.
- 7) Sekonder antikör eklenip 30 dakika beklendi.
- 8) 3 kez TBS ile 5 dakika yıkandı.
- 9) Sekonder antikora bağlanması için enzim (biyotin- HRP kompleksi) verildi ve 30 dakika inkübe edildi.
- 10) Enzime Amino Etil Karbizol (AEC) substratı verilip 3-5 dakika inkübe edildi.
- 11) Preparatlar TBS ile yıkandı, kurutuldu ve kayser jelatin ile kapatılıp karanlıkta buz dolabında saklandı.
- 12) Preparatlar mikroskop altında incelenip fotoğraflandı.

3.4.6. VDKH Kültürlerinin Western Blot Analizi için Lizatlarının Hazırlanması

3.4.6.1. Kullanılan Solüsyonlar

a) Lizis Tamponu

Lizis tamponu 25 mM Tris HCl, pH 7.4, %1 Triton X-100, %10 Gliserol, 10 mM sodyum pirofosfat, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Fenilmetilsülfonil florid, 10 µg/mL Leupeptin içermektedir.

b) PBS (Fosfat Tamponlu Salin, 10X konsantre)

10X konsantre PBS için 2 g KCl, 80 g NaCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄ tartılıp 1 L distile suya tamamlandı. pH'sı 7,4'e ayarlandı. Kullanım esnasında 1:10 oranında sulandırıldı.

3.4.6.2. Kullanılan Aktivatörler

Anjiyotensin II

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

3.4.6.3. Kullanılan İnhibitörler

Losartan

Toz halindeki AT1 reseptör blokörü losartan 4,6201 mg tartılıp 10 mL PBS içinde çözüldü (1×10^{-3} M) ve 500 µl'lik alikuatlara bölünüp -20 °C'de saklandı. İnhibisyon ortamında 1×10^{-5} M olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

GF109203X

Toz halindeki 250 µg PKC inhibitörü GF109203X, 5 mL DMSO'da çözüldü (120 µM) ve 100 µl'lik alikuatlara bölünüp -20 °C'de saklandı. İnhibisyon ortamında 2 µM olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

PP1 Analog

Toz halindeki 1 mg Src ailesi tirozin kinazları inhibitörü PP1 analog konsantrasyonu 6300 µM olacak şekilde DMSO içerisinde çözüldü. 30 µl'lik alikuatlara bölünüp -20 °C'de saklandı. İnhibisyon ortamında 10 µM olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

DPI

Toz halindeki 10 mg NAD(P)H oksidaz inhibitörü olan DPI, 1mM olacak şekilde 31.7 ml DMSO içinde çözüldü ve 50 µl'lik alikuatlara bölünüp -20 °C'de saklandı. İnhibisyon ortamında 10 µM olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

3.4.6.4. Lizat Hazırlama Prosedürü

Düz kas hücreleri 6-kuyucuklu petrilere pasajlandı ve % 80 yoğunluğa gelinceye kadar rutin olarak beslendi.

Yoğunluğu % 80'e gelen hücreler serum içermeyen DMEM ile bir kez yıkandı.

Serum içermeyen 2 mL DMEM (pH 7,4) hücrelere eklendi ve 24 saat inkübe edildi.

6 kuyucuklu petriler deneye uygun inhibitör ve aktivatörler ile belirli zaman periyotlarında inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonu bitirmek için buz üzerinde medyum hızlı bir şekilde aspire edildi.

Hücreler 1 mL 1X PBS ile 2 kez yıkandı ve PBS ortamdan uzaklaştırıldı.

Hücrelerin üzerine 200 µL soğuk liziz tamponu eklendi.

Hücreler kuyucuklardan özel hücre kazıyıcısı yardımıyla kazındı ve plastik tüplere toplandı.

Tüp içerisindeki hücreler ultrasonik homojenizatör ile 9000 rpm'de 10 saniye sonike edildi.

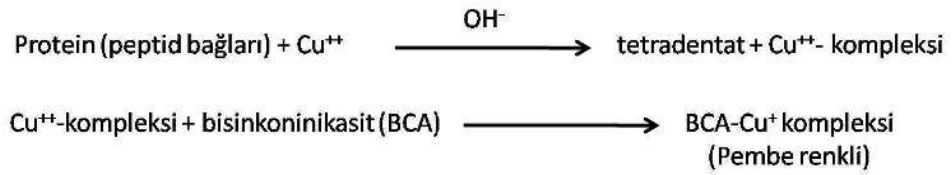
Hücreler sonikasyon işleminden sonra santrifüjde +4 °C’de 12500 rpm’de 25 dakika santrifüj edildi.

Tüp içerisindeki temiz süpernatant kısmı western analizi için kullanıldı.

3.4.7. Protein Miktarının Tayini

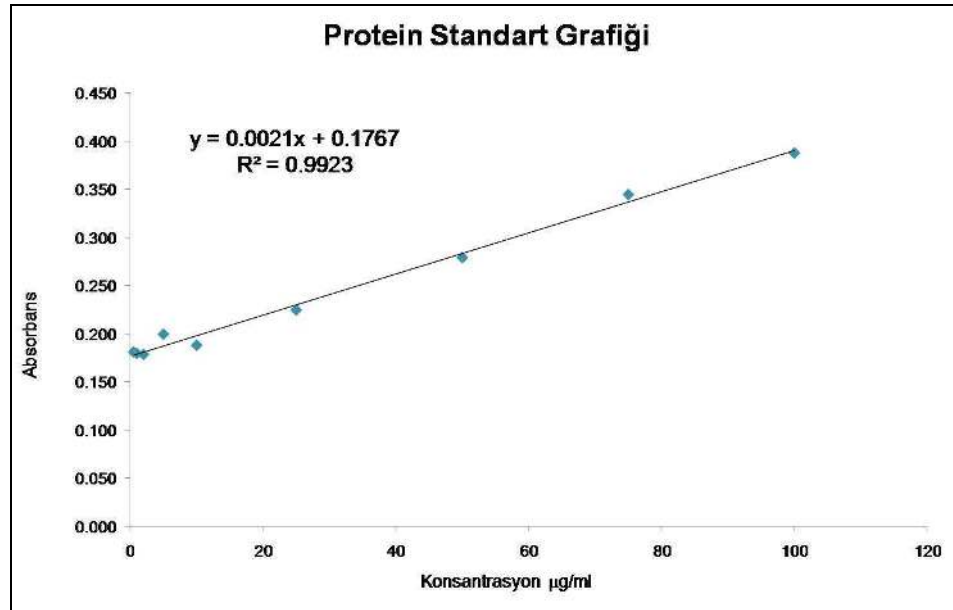
3.4.7.1. Mikro BCA (Bisinkoninikasit) Deney Kitinin Prensibi

Proteinlerin peptid bağları OH⁻ iyonu varlığında Cu⁺⁺ iyonlarıyla reaksiyona girip Cu⁺⁺-kompleksi oluşturur. Cu⁺⁺-kompleksi bisinkoninikasit ile reaksiyona girerek pembe renkli BCA - Cu⁺ kompleksi’ni oluşturur. Oluşan pembe renk 562 nm dalga boyunda spektrofotometre’de okundu.



3.4.7.2. Numunelerin Protein Miktar Tayini

Hücre kültürlerinden hazırlanan lizatlar protein tayini için kullanıldı. Hazırlanan her bir lizattan 20 µl alınıp 80 µl distile su ile tamamlanıp numune 1/5 oranında dilüe edildi. 100 µl numune üzerine 100 µl WR (working reagent: çalışma reaktifi) pipetlenir ve 37 °C’de 96-kuyucuklu petrilerde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda numuneler çift kontrollü olarak spektrofotometrede 562 nm’de körüne karşı okundu. Elde edilen absorbans değerleri, Şekil 3.1’de gösterilen protein standart grafiği kullanılarak, örneklerin protein miktarları µg/ml cinsinden tayin edildi.



Şekil 3.1. Protein standart grafiği

3.4.8. Src Fosforilasyonunun SDS-PAGE ve Western Immünoblot Analizi

Rat aortik düz kas hücre kültürlerinde Ang II uyarımı sonrasında Src fosforilasyonu ve bu fosforilasyonda NAD(P)H oksidaz kompleksinin ve PKC' nin rolü western blot tekniği uygulanarak belirlendi.

3.4.8.1. Elektroforez Jelinin Hazırlanması

Solüsyonların Hazırlanması

a) Ayırışma jeli tamponu (Resolving Buffer) (1,5 M Tris pH 8,8)

9.085 g Tris tartılır ve 20 mL distile su içinde çözülür. pH, 1.5 M HCl ile 8.8'e ayarlandı ve son hacim 50 mL'ye tamamlandı. 0.2 g SDS tartılıp solüsyona eklenip çözülür. Solüsyon +4 °C'de saklandı.

b) Yükleme jeli tamponu (Stacking Buffer) (0.5 M Tris, pH 6.8)

6.05 g Tris tartıldı ve 40 mL distile su içinde çözülür. Çözeltinin pH'sı, 1N HCl ile 8.8'e ayarlandı. 0.4 g SDS tartıldı ve Tris çözeltisi içerisinde çözülür. Tampon +4 °C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

c) Akrilamid – Bisakrilamid Solüsyonu

30 g Akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid tartıldıktan sonra 100 mL distile su içerisinde çözülür.

d) Amonyum persülfat (%10; APS)

50 mg Amonyum persülfat tartıldı ve 0.5 mL distile su içinde çözülür.

e) TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin)

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

Jelin Hazırlanması ve Gerekli Kimyasalların Miktarı

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

a) Ayırışma Jeli (%10'luk)

Ayırışma jeli %10'luk olarak aşağıdaki tablo da verilen miktarların karıştırılması ile elde edildi.

Tablo 3.1. Ayırışma jeli tamponu ve miktarları

	% 10'luk Ayırışma jeli	
Distile Su	3.125	mL
Resolving buffer (pH: 8.8)	1.875	mL
Akrilamid	2.5	mL
% 10 APS	0.025	mL
TEMED	0.005	mL

b) Yükleme Jeli (%5)

Yükleme jeli aşağıdaki tablo da verilen miktarların karıştırılması ile elde edildi.

Tablo 3.2. Yükleme jeli tamponu ve miktarları

	% 5'lik Yükleme jeli
Distile Su	1.525 mL
Stacking buffer (pH: 6.8)	0.625 mL
Akrilamid	0.325 mL
% 10 APS	0.0125 mL
TEMED	0.0025 mL

Jelin Dökülmesi İşlemi

- Jelin döküleceği camlar, üzerlerinde olabilecek partiküllerin jeli bozmaması ve proteinlerin düzgün bir şekilde yürümesini sağlamak için distile su ile yıkandı, %70'lik alkolden geçirildi ve kurutuldu.
- Camlar hazır hale geldikten sonra ön ve arka cam birleştirildi ve kısıkaçlar yardımı ile sıkıştırıldı.
- Kısıkaçlara yerleştirilmiş camlar jelin sızıntısını engellemek için camların alt kısmı bantların üzerine gelecek şekilde dikey olarak yerleştirildi ve üsteki mandala tutturularak iyice sıkıştırıldı.
- Ayırışma jelinin ilk 3 solüsyonu karıştırıldı ve 5 dakika beklendi. 5 dakika bitiminde APS ve TEMED eklendikten hemen sonra jel karıştırılıp camlar arasına üstten 1-1.5 cm kalacak şekilde döküldü. TEMED polimerizasyon başlangıcında önemli bir rol oynadığından jel karışımına en son eklendi.
- Jelin hava ile temasını kesmek ve düzgün bir şekilde donmasını sağlamak için jelin üzerindeki boş bırakılan kısma yavaş yavaş distile su ilave edildi.
- Jel oda ısısında yaklaşık 60 dakika sonra katılaştı. Üst jelin (yükleme jeli) ilk 3 solüsyonu karıştırıldı. Alt jelin üzerindeki distile su boşaltılarak kurutma kağıdı ile kurutuldu.
- İki cam arasına 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi. Üst jele, APS ve TEMED eklendi ve hızlı bir şekilde karıştırılarak iki cam plak arasına tarakların içinde hava kalmayacak şekilde döküldü.

- Üst jel oda ısısında tamamen donduktan (yaklaşık 30 dakika) sonra camlar kısıkaçların içerisinden çıkarıldı ve camların üzerindeki jel artıkları temiz bir kağıt peçete ile silindi.
- Jelin içerisinde bulunduğu camlar üzerinde kutupların bulunduğu kısıkaçların içine yerleştirildi ve hemen elektroforez tankına alındı.

3.4.8.2. Elektroforez İşlemi

Solüsyonların Hazırlanması

a) Redüklenmemiş Numune Tamponu (Loading Dye, Laemli, 5X konsantre)

Laemli tamponu için 10 mL gliserol, 10 mL %10 SDS, 1.25 mL 1 M (pH 6.8) Tris, 7.5 mL β -merkaptoetanol ve brom fenol mavisi karıştırılıp 50 mL distile suya tamamlandı. Kullanım sırasında numune ile 1:5 oranında dilüe edildi.

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

15 g Tris, 72 g Glisin, 5 g SDS tartılıp, 1000 mL distile su içinde çözüldü. Elektroforez aşamasında, bu stok solüsyon 1:5 oranında dilüe edildi.

Elektroforeze Konacak Örneklerin Hazırlanması

- Protein miktarları tayin edilmiş lizatlar -20 °C' den alınarak buz içeren bir kaba kondu.
- Örnekler çözüldükten sonra kuyucuğa yüklenen 25 μ L içerisinde 5-15 μ g protein olacak şekilde her numuneden çekilip lizis tamponu ile 60 μ L' ye tamamlandı. Üzerine 15 μ L 5X laemli sample buffer pipetlendi. Örnekler boya ile iyice karıştırıldı.
- Hazırlanan örnekler 95 °C'de 5 dakika kaynatıldı.

Elektroforez Prosedürü

- Elektroforez tankı elektroforez tamponu ile dolduruldu ve camlar arasındaki taraklar çıkartıldı. Tarağın oluşturduğu kuyucukların içerisine girebilecek ince uçlu enjektör ile hava pipetlenerek kuyucuklar temizlendi.
- İlk kuyucuğa molekül ağırlıkları bilinen proteinlerden oluşan karışım pipetlendikten sonra diğer kuyucuklara da örnekler yüklendi.
- Örneklerin yüklenmesi tamamlandıktan sonra uygun kutuplar bağlanarak tankın kapağı kapatıldı. Tank güç kaynağına bağlandı ve akım 80 V, 65 mA'e ayarlanarak elektroforez gerçekleştirildi.
- Yükleme boyası jelden çıktığında elektroforez sona erdirildi. Bu süre yaklaşık 2,5 saat kadardır.
- Yükleme jeli kesilerek atıldı.

- Proteinleri içeren ayırma jeli protein transfer tamponuna konuldu. Bu aşamadan sonra jel, proteinlerin membrana transferi için hazır hale gelmiş oldu.

Elektroforez Jelinin Membrana Aktarılması

Solüsyonların Hazırlanması

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

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

b) Metanol

Transfer sırasında membranın şişmesi ve yapışan proteinlerin korunabilmesi için gereklidir.

İşlemler

- Nitroselüloz membran, blotting kağıtları, kurutma kağıtları ve süngerler buz soğukluğundaki blotting tamponu ile ıslatıldı ve 2-5 dakika tamponda bekletildi.
- Sandviç aparatının arasına gelecek şekilde en alta (–) kutup olmak şartıyla, transfer tamponu ile doyurulmuş sünger konuldu.
- Süngerin üzerine yine transfer tamponu ile doyurulan blotting kağıdı konuldu.
- Blotting kağıdının üzerine de tamponda beklemiş olan kurutma kağıdı konuldu.
- Kurutma kağıdının üzerine alt ve üst kısımlarına dikkat edilerek jel yerleştirildi.
- Jel üzerine nitroselüloz membran yerleştirildi.
- Üzerine transfer tamponu ile doyurulan blotting kağıdı konuldu.
- Son olarak, üzerine transfer tamponu ile doyurulan bir sünger daha konuldu ve bir silindir yardımı ile sandviçin içindeki hava kabarcıkları alındı. Sandviç aparatı üzerinden sıkıştırılarak kapatıldı.
- Hazırlanan sandviçin anot kutbu anota, katot kutbu katota bakacak şekilde elektroforez tankına yerleştirildi. Tank, blotlama tamponu ile dolduruldu.
- 1.5 saat +4 °C’ de yaklaşık 350 mA’de magnetik balık ve magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak ve her 30 dakika bir buz kabı değiştirilerek işlem yürütüldü.
- 1.5 saat sonra sandviç tanktan çıkartıldı ve böylece membran antikor ile işaretlemeye hazır hale getirilmiş oldu.

Membranların Antikor ile İşaretlenmesi

Solüsyonların Hazırlanması

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

TBS solüsyonu hazırlamak için 60.55 g Tris ve 87.66 g NaCl 800 mL distile suda çözüldü. pH, HCl asit ile 7.4'e ayarlandı. Son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

b) TBS (1X)

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

c) TBST (1X)

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

d) Süt Tozu Çözeltisi (Bloklayıcı Çözeltisi)

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

e) Fosfo-Src Primer Antikoru

100 µg toz halindeki primer antikor, 100 µl steril distile su ile çözüldü. 15 µl'lik alikatlara bölünerek -20 °C'da saklandı. TBST çözeltisinin 7 ml'sinde 7 µl primer antikor olacak şekilde 1:1000 dilisyonla kullanıldı.

f) HRP (Horse-Radish Peroxidase) konjuge mouse sekonder Antikoru

Enzim işaretli, mouse kökenli sekonder antikor +4 °C'de saklandı. 1:2000 oranında dilüe edilerek kullanıldı. TBST çözeltisinin 10 ml'sinde 5 µl sekonder antikor çözüldü.

g) ECL (Enhanced Chemiluminescence)

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

İşlemler

- Membran, temiz ve membranın sığabileceği büyüklükteki bir petri kabında TBST ile yıkandı.
- Membranın yüzeyini örtecek şekilde bloklayıcı çözeltisi ilave edilerek 1 saat oda ısısında çalkalayıcı üzerinde hafifçe çalkalandı.
- TBST ile 30 dakika (3 x 10 dk) yıkandı.
- Primer antikor ile membran tüm gece +4 °C'de çalkalayıcı üzerinde hafifçe çalkalandı.

- Süre sonunda antikoru içeren çözelti döküldü ve membran 30 dakika (3 x 10 dk) TBST ile hafifçe çalkalandı. Böylece zayıf olarak bağlanan ya da bağlanamamış antikörler membran üzerinden temizlendi.
- Yıkama işlemi bittikten sonra TBST ortamdan uzaklaştırıldı ve enzim işaretli sekonder antikör ile membran 1 saat çalkalandı.
- 1 saat sonunda tekrar TBST ile 30 dakika (3 x 10 dk) yıkama işlemi yapıldı.
- Yıkama işlemi sonunda membranlar pens yardımı ile yıkama solüsyonu içerisinden alındı ve üzerindeki solüsyon temiz bir kağıt peçeteye emdirildi.
- Membranlar hızlı bir şekilde temiz ve düzgün bir yüzeye yerleştirildi. Üzerine 1:1 oranında karıştırılan ECL-1 ve ECL-2 tüm yüzeyi kaplayacak şekilde yayıldı.
- Membranlar ECL ile yaklaşık 3 dakika muamele edildi.
- Sürenin sonunda membran üzerindeki ECL temiz bir kağıt peçeteye emdirildi ve membranlar streç film üzerine yerleştirildi.
- Hızlı bir şekilde membranın üzeri de streç film ile kaplandıktan sonra membran film kasetinin içerisine bantlandı.
- Bu aşamadan sonraki işlemler karanlık odada yapıldı.

3.4.8.3. Membrandaki Sinyallerin Filme Aktarılması

Kullanılan Solüsyonlar

a) Developer

Developer 1:10 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

b) Fiksatif

Fiksatif 1:10 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

c) Hyperfilm

Kemilüminesan sinyallere yüksek afiniteli film kullanıldı.

İşlemler

- Kasete bantlanan membranın üzerine karanlık odada film konuldu ve 10 dakika beklendi.
- Sürenin sonunda kaset açıldı ve film membranın üzerinden alınıp karanlıkta developer içine konuldu. Filmin üzerinde sinyaller görününceye kadar hafifçe sallandı.

- Daha sonra film developerdan alınıp fiksatafe konuldu. Bu aşamadan sonra ışık açılabilir.
- Fiksatiften çıkan film distile suyla yıkandı ve kuruması için temiz bir yere asıldı.

3.4.8.4. Sinyallerin Grafik Haline Dönüştürülmesi

Filme aktarılan sinyaller, bilgisayar ortamında Windows XP işletim sisteminde çalışan Igidoc 1000 programı ile grafik haline dönüştürüldü. Bir bandın yoğunluğu 100 birim kabul edildi ve her grupta diğer bantlar 100 birim üzerinden değerlendirildi. Normal şartlar altında semi-kantitatif bir yöntem olan Western-blot tekniği, bandların bu yöntem dahilinde “Microsoft Office-Excel” kullanılarak sütun grafiği haline getirildi.

3.4.9. Sitokrom C Redüksiyonu Yöntemi ile Süperoksit Anyonu Ölçümü

Ölçüm sırasında sübstrat olarak kullanılan NADPH’tan 0.8334 mg tartıldı ve 1 mL distile suda çözüldü. 2mL ölçüm tamponuna 200 µL pipetlenerek son konsantrasyon 100 µmol/L olarak ayarlandı. Her deneyden önce taze hazırlandı ve +4 °C’da saklandı.

Işıktan etkilenen, toz halindeki ferrisitokrom c’den 50 mg alındı ve 1 mL distile suda çözüldü. 250 µL’lik alikatlara bölünerek -20 °C’da karanlıkta saklandı. 1 mL ölçüm ortamında 40 µM final konsantrasyonu olacak şekilde 10 µL pipetlendi. Bütün uygulamalar karanlıkta yapıldı.

Hepes modifiye Tyrode’s solüsyonu için toz halindeki; 92.61 mg kalsiyum klorid iki sulu ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 67.84 mg KCl, 2802.19 mg NaCl, 15.117 mg NaH_2PO_4 , 34.865 mg MgCl_2 , 353.192 mg glukoz ve 834.05mg HEPES tartılıp her biri 50’şer mL distile suda çözüldü ve stok halinde +4 °C’da saklandı. Her ölçümden önce eşit miktarlarda karıştırılıp pH 7.4’e ayarlandı. Sıcak su banyosunda 37 °C’da 15 dakika bekletildikten sonra kullanıldı.

Süperoksit anyonu miktarlarının Sitokrom C redüksiyonu ile ölçümü Görlach et al.[68] metoduna göre yapıldı. 6 kuyucuklu plaklarda büyütülen hücreler 24 saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra; tüm kuyucuklar HEPES modifiye Tyrode’s solüsyonu (pH:7.4; 1.8 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.6 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.36 mM NaH_2PO_4 , 0.49 mM MgCl_2 , 5.6 mM glukoz ve 10 mmol/L HEPES içermektedir) ile 2-3 kez yıkandı. Ardından bu kuyucuklara HEPES modifiye Tyrode’s solüsyonu 2 mL hacimde olacak şekilde eklendi. Ang II ve inhibitörler uygun konsantrasyonlarında ve inkübasyon sürelerinde ortama eklendi. Inkübasyon sonunda, sitokrom c’nin ışıқта redüksiyonunu engellemek amacıyla karanlık ortamda 20 µL sitokrom c (40 µM) tüm kuyucuklara konuldu. Tüm ölçümlerde NADPH 100 µmol/L konsantrasyonda olacak şekilde sitokrom c ile beraber pipetlendi. Yarım saat içinde tüm kuyucuklardaki solüsyonların 300 – 600 nm dalga boylarında absorbans spektrumu taramaları yapıldı ve maksimum absorbans görülen dalga boyundaki veriler alındı. Her ölçümde dalga boyu spektrumunda sitokrom c redüksiyon piklerine bakılarak deneyler doğrulandı. Hem substrat (NADPH) kontrol hücrelerinden hem de Ang II uygulanmış hücrelerden elde edilen tüm değerler, substrat kullanılmadan sitokrom c ile süperoksit anyonu ölçümü yapılan kontrol

hücrelerinin (kör) verdiği absorbans değerlerinden çıkartıldı. Çıkan protein miktarlarına göre de absorbans değerleri hesaplandı. Her kuyucuğun protein miktarlarının ölçümü için plaklar, ölçümden hemen sonra buz üzerinde bekletildiler.

3.4.9.1. Süperoksit Anyonu Ölçümünün İstatistiksel Analizi

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. İstatistiksel analizler SPSS 17.0 paket programı ile yapıldı. SHR ve WKY gruplarının kendi içindeki farklılık Wilcoxon eş testi kullanılarak, gruplar arasındaki farklılık ise Mann-Whitney U testi kullanılarak belirlendi.

3.5. Materyal ve Kimyasal Malzemeler

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS), kalsiyum klorid (CaCl_2), hepes, elastaz, kolajenaz, soya tripsin inhibitör, bovine serum albumin, fetal bovine serum, L-glutamin, penisilin-streptomisin ve tripsin-EDTA (etilen daimin tetraasetik asit) Sigma'dan satın alınmıştır.

Hücre kültüründe kullanılan petripler, flasklar ve 15 ml'lik plastik tüpler ile benzeri sarf malzemeler R&D Falcon firmasından satın alınmıştır.

Medyum saklama amacıyla 100 ml hacimde Simax marka otoklavlanabilir kapaklı cam şişeler kullanılmıştır.

Hücre kültüründe aktivatör olarak kullanılan Anjiyotensin II, inhibitör olarak kullanılan GF109203X, Difenileniyodoniyum (DPI) Sigma'dan, PP1 analog Calbiochem'den satın alınmıştır. AT1 antagonisti losartan, Merck Sharp&Dohme firması tarafından hediye edilmiştir.

Kullanılan primer antikor anti-phospho-SRC Upstate'den ve bu antikorlara karşılık gelen sekonder anti-mouse immün globülin (IgG) (Fc spesifik)-peroksidaz Sigma'dan temin edilmiştir.

İmmünohistokimyasal analizler için Dako marka immünositokimya kiti kullanıldı. İmmünositokimya için kullanılan primer ve sekonder antikorlar Sigma'dan satın alınmıştır.

Protein ölçümleri için Pierce marka micro protein deney kiti kullanılmıştır.

Western blot için Bio-Rad marka Mini-Protean Western Blot setinden yararlanılmıştır.

Sinyallerin dedeksiyonunda kemilüminesan olarak Bio-Rad kitinden faydalanılmıştır.

Membran olarak 0,2 ve 0,45 µm por genişliğindeki Whatman Protran marka nitroselüloz membran kullanılmıştır.

Membranlar filme aktarılırken Amersham marka yüksek kaliteli film kullanılmıştır. Filmlerin geliştirilmesi esnasında Illugater marka developer ve fiksatif kullanılmıştır.

Metanol Merck'den satın alınmıştır.

3.6. Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler

Buzdolabı	: Beko 9610NM, Vestel NT 465 HG (+4°, -20° C)
Soğutucu	: Bosch (-20° C)
Dondurucu	: Hettich HS 2486 (-80° C)
Sıcak su banyosu	: Raypa (20° ~ 80° C)
Santrifüj	: Beckman & Coulter Microfuge 22R (+4° C)
Santrifüj	: Nüve NF400
İnkübatör	: Heraeus HeraCell 150 [Karbon dioksit (CO ₂), 37°]
Kültür kabini	: Bilser
Mikroskop	: Olympus CKX41 (Inverted)
Görüntüleme	: Olympus imaging Corr-dijital kamera E330
Sonikatör	: Bendelin UW2070
Karıştırıcı	: LabLine Thermal Rocker (kapaklı, 37° C)
Karıştırıcı	: Biometra WT17
Karıştırıcı	: Heidolph MR Hei-Standart Q-02 (manyetik)
Thermoblock	: Biometra TB1
Hassas terazi	: Presica XB220A
Kaba terazi	: Kern 440-43N
pH metre	: Hanna pH211
Tansiyon aleti	: MP 150 (BIOPAC Systems)
Spektrofotometre	: Shimadzu UV-1601

Plastik ve cam malzemeler Akdeniz Üniversitesi Sterilisasyon Merkezi'nde steril edildi.

Vasküler düz kas hücrelerinin izolasyon işlemleri, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nde yapıldı.

Primer hücre kültürü işlemleri, protein ölçümleri, süperoksit anyonu ölçümleri, immünohistokimya ve Western Blot teknikleri, Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapıldı.

BULGULAR

4.1. İmmünohistokimyasal Analiz Bulguları

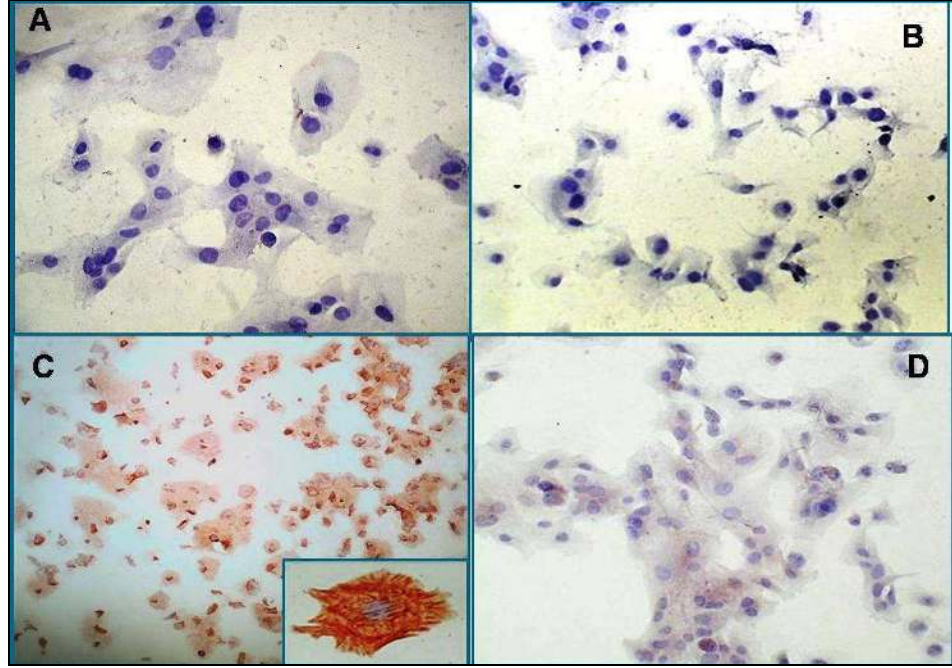
Rat aortalarından elde edilen hücrelerin vasküler düz kas hücresi olduğu immünohistokimyasal analiz yapılarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmada üretilen hücrelerin vasküler düz kas hücreleri olduğu birçok çalışmada da gösterilmiş ve çalışmalar rutin hale gelmiştir [67, 69-71].

Kontrol Grubu: Kontrol gruplarında hiçbir boyanmanın olmaması boyanmaların proteine spesifik olduğunu gösterdi (Şekil 4.1. A).

İzotip Kontrolü: İmmünohistokimyasal analizlerde boyanmaların sekonder antikordan kaynaklanmadığını göstermek amacıyla kullanıldı. Preparatlarda boyanmanın olmaması sekonder antikordan kaynaklanan non spesifik bağlanmaların olmadığını, boyanmaların primer antikora spesifik olduğunu gösterdi (Şekil 4.1. B).

α -Aktin Grubu: Vasküler düz kas hücrelerini gösterebilmek amacıyla düz kas hücrelerinin α -aktin'leri, VDK hücrelerine spesifik α -aktin primer antikoruyla boyandı. Preparattaki kırmızı boyalı alanlar α -aktin'e spesifik düz kas hücrelerini göstermektedir (Şekil 4.1. C). Şekilde tek bir hücredeki α -aktin fiberleri net olarak görülmektedir. Bu boyanmalar izole edip ürettiğimiz hücrelerin düz kas hücresi olduğunu gösterdi.

Von Willebrand Faktör Grubu: İzole edilip kültüre aktarılan hücrelerde endotel hücresi bulunup bulunmadığını göstermek amacıyla, Von Willebrand Faktör primer antikoru kullanılarak hücreler boyandı. Preparatlarda kırmızı boyalı alanların olmayışı izole edilen hücrelerde endotel hücresi bulunmadığını göstermektedir (Şekil 4.1. D).



Şekil 4.1. Vasküler düz kas hücrelerinin immünohistokimya bulguları: A: Kontrol, B: İzotip kontrolü, C: α -Aktin grubu, D: Von Willebrand Faktör Grubu

4.2. Spontan Hipertansif ve Wistar Kyoto Ratlara Ait Kan Basınçları

Hayvanlar deneye alınmadan 1 hafta önce “tail-cuff” yöntemiyle kuyruktan ölçülen kan basınçlarının ortalama değerleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir. SHR grubunun ve WKY grubunun kan basıncı değerleri karşılaştırıldığında, SHR grubunun kan basıncı değerlerinin WKY grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür ($p < 0.001$).

Tablo 4.1. Deney gruplarının sistolik kan basıncı değerleri (mmHg). Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. n: Denek sayısı.

Gruplar	Kan Basıncı (mmHg)
SHR (n=20)	189.6 $\pm$ 1.4 *
WKY (n=20)	132.6 $\pm$ 2.8

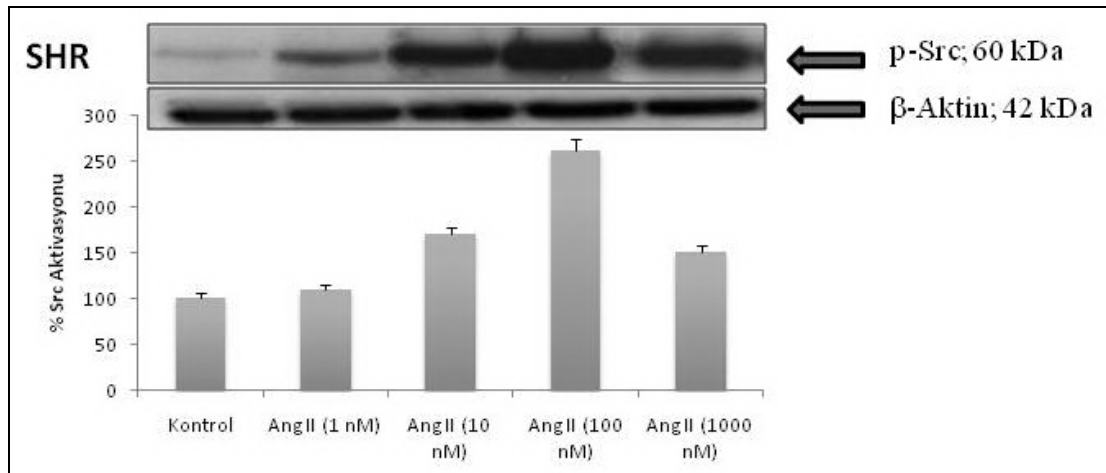
*, $p < 0.001$; WKY grubu ile karşılaştırıldığında

4.3. Spontan Hipertansif ve Wistar Kyoto Ratlardan Elde Edilen Vasküler Düz Kas Hücre Kültürlerinde Ang II Uyarımıyla Src Aktivasyonu

Western blot tekniği kullanılmadan önce vasküler düz kas hücrelerinin canlılığı test edildi ve kültürü yapılan hücrelerin % 99 canlı hücreler olduğu tesbit edildi. Hücreler tarafından oluşturulan yanıtları standartlaştırmak amacıyla üretilen hücrelerin 5-15 pasajları deneye alındı. Deneylerde Src aktivasyonunu veya inhibisyonunu göstermek için yapılan western blot analizleri 3 kez çalışıldı.

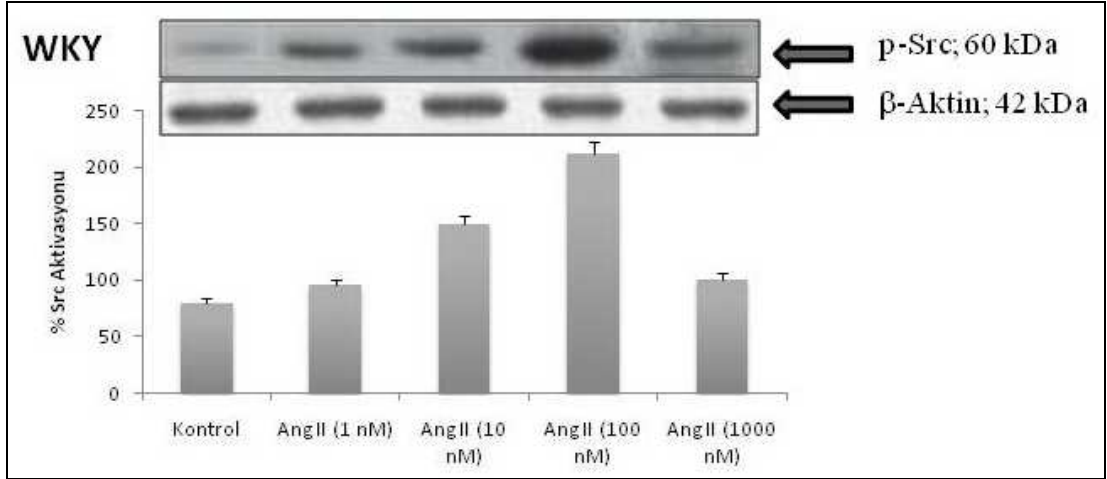
4.3.1. Spontan Hipertansif ve Wistar Kyoto Ratlardan Elde Edilen Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımı Sonrasında Src Aktivasyonu Konsantrasyon Deneyleri

Spontan hipertansif ratlardan elde edilen vasküler düz kas hücre kültürlerinde, Ang II'nin Src aktivasyonunu gerçekleştirdiği en iyi konsantrasyonunu görebilmek için hücre kültürleri; 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM olarak belirlediğimiz farklı Ang II konsantrasyonlarıyla 5 dakika 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hazırlanan hücre lizatlarında western blot tekniği kullanılarak Src aktivasyonuna bakıldı. Sonuçlara göre, Ang II uygulanan hücrelerde fosforilasyona bağlı olarak kontrole göre en yüksek Src aktivasyonu 100 nM Ang II uygulamasıyla elde edildi (Şekil 4.2). Bu sonuçlara göre Ang II, VDKH'nde Src aktivasyonunu doza bağımlı olarak değiştirmiştir. Elde edilen western blot sonuçlarının daha iyi yorumlana bilmesi için veriler grafiğe aktarıldı ve kontrol bantı baz alınarak diğer bantların yoğunluğu değerlendirildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Spontan hipertansif ratlarda farklı Ang II konsantrasyonlarında Src aktivasyonu. Farklı konsantrasyonlarda 5 dakika Ang II uygulanan hücrelerde en yüksek Src aktivasyonunun 100 nM Ang II konsantrasyonunda olduğu görülmüştür.

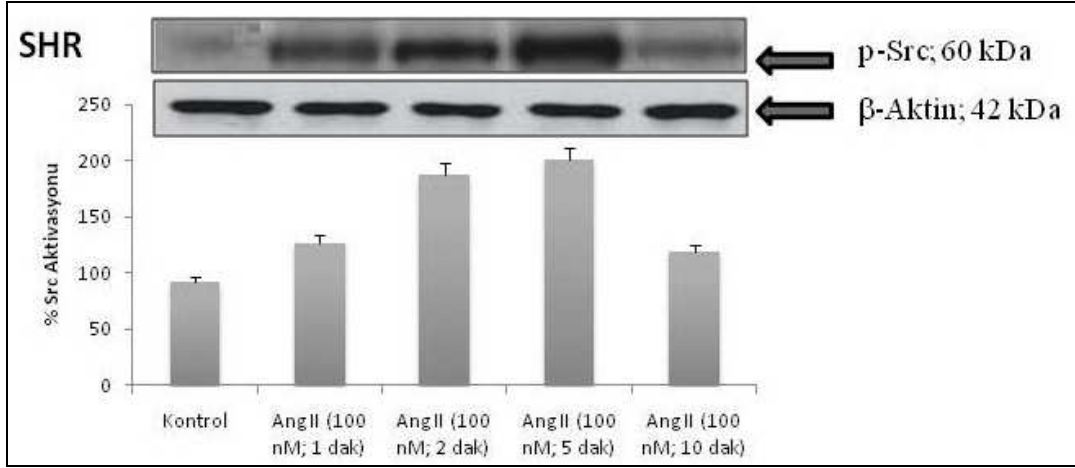
Deney sonuçlarının anlamlılığını sağlamak amacıyla Wistar Kyoto ratlardan elde edilen vasküler düz kas hücre kültürlerinde, Ang II'nin Src aktivasyonunu gerçekleştirdiği en iyi konsantrasyonunu görebilmek için de yine aynı Ang II konsantrasyonları uygulanarak inkübasyon gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek Src aktivasyonu 100 nM Ang II uygulaması yapılan kültürde gözlemlendi (Şekil 4.3). Wistar Kyoto rat grubunun sonuçları SHR grubunun sonuçlarıyla benzerlik gösterdi.



Şekil 4.3. Wistar Kyoto ratlarda farklı Ang II konsantrasyonlarında Src aktivasyonu. Farklı konsantrasyonlarda 5 dakika Ang II uygulanan hücrelerde en yüksek Src aktivasyonunun 100 nM Ang II konsantrasyonunda olduğu gözlemlenmiştir.

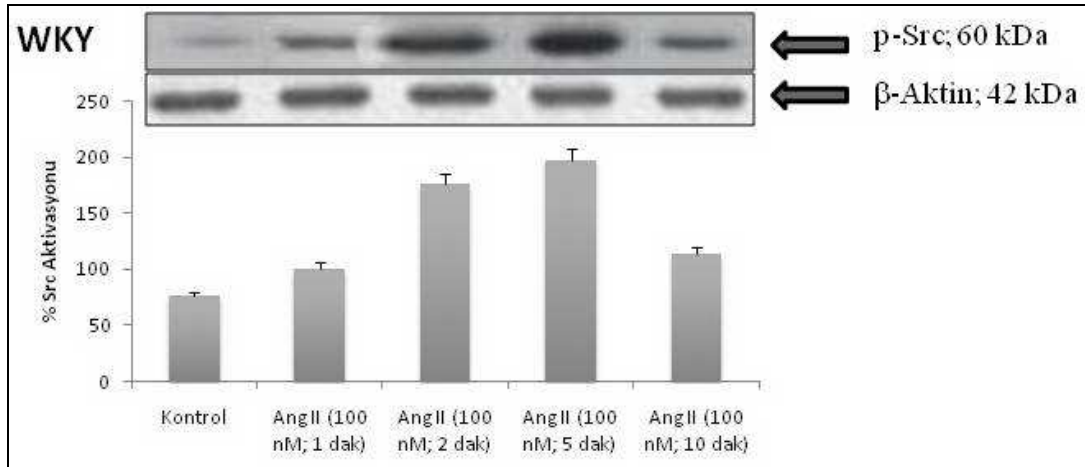
4.3.2. Spontan Hipertansif ve Wistar Kyoto Ratlardan Elde Edilen Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımı Sonrasında Src Aktivasyonu Süre Deneyleri

Spontan hipertansif ratlardan elde edilen vasküler düz kas hücre kültürlerinde, Ang II uyarımıyla Src aktivasyonunun gerçekleştiği en iyi süreyi görebilmek için hücre kültürleri 100 nM Ang II ile 1, 2, 5 ve 10 dakika olarak belirlediğimiz farklı sürelerde 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hazırlanan hücre lizatlarında western blot tekniği kullanılarak Src aktivasyonuna bakıldı. Sonuçlara göre 2 ve 5 dakika 100 nM Ang II uygulanan hücrelerde fosforilasyon değerleri birbirine yakın çıkmasına rağmen, fosforilasyona bağlı olarak kontrole göre en yüksek Src aktivasyonu 5 dakika 100 nM Ang II uygulamasıyla elde edildi (Şekil 4.4). Bu sonuçlara göre de Ang II VDKH’nde Src aktivasyonunu süreye bağımlı olarak değiştirmiştir. Elde edilen western blot sonuçlarının daha iyi yorumlana bilmesi için veriler grafiğe aktarıldı ve kontrol bantı baz alınarak diğer bantların yoğunluğu değerlendirildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Spontan hipertansif ratlarda 100 nM Ang II'nin zamana bağlı olarak Src aktivasyonuna etkisi. Farklı sürelerde 100 nM Ang II uygulanan hücrelerde en yüksek Src aktivasyonunun 5 dakikada gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Deney sonuçlarının anlamlılığını sağlamak amacıyla Wistar Kyoto ratlardan elde edilen vasküler düz kas hücre kültürlerinde, Ang II'nin Src aktivasyonunu gerçekleştirdiği en iyi zamanı görebilmek için de yine 100 nM Ang II konsantrasyonu aynı sürelerde uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek Src aktivasyonu 5 dakika 100 nM Ang II uygulaması yapılan kültürde gözlemlendi (Şekil 4.5). Wistar Kyoto rat grubunun sonuçları SHR grubunun sonuçlarıyla benzerlik gösterdi.

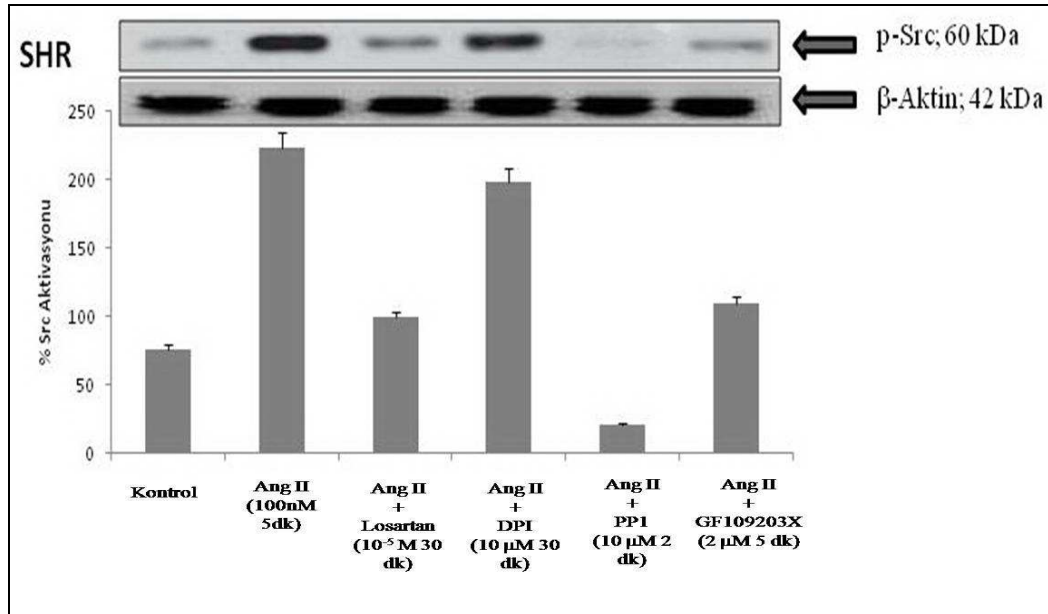


Şekil 4.5. Wistar Kyoto ratlarda 100 nM Ang II'nin zamana bağlı olarak Src aktivasyonu üzerine etkisi. Farklı sürelerde 100 nM Ang II uygulanan hücrelerde en yüksek Src aktivasyonunun 5 dakikada gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

4.4. Spontan Hipertansif ve Wistar Kyoto Ratlardan Elde Edilen Vasküler Düz Kas Hücre Kültürlerinde İnhibitor Uygulamalarını Takiben Ang II Uyarımında Gözlenen Src Fosforilasyonu

Spontan hipertansif ve wistar kyoto ratlardan elde edilen vasküler düz kas hücre kültürlerinde, Ang II uyarımıyla Src aktivasyonunun gerçekleştiği en iyi konsantrasyon ve süre 100 nM 5 dakika olarak tespit edildiğinden bundan sonraki tüm çalışmalara bu süre ve doz konsantrasyonları kullanılarak devam edildi.

Spontan hipertansif ratlardan elde edilen VDKH'nde Ang II uyarımı sonrasında, AT1 reseptörü üzerinden meydana gelen hücre içi sinyal iletim yolağında, Src'nin NAD(P)H oksidaz'dan önce mi yoksa sonra mı aktive olduğunu belirlemek amacıyla, AT1 reseptör blokörü Losartan; PKC inhibitörü GF109203X; Src inhibitörü PP1; NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI kullanılarak western blot yöntemiyle Src aktivasyonuna bakıldı.



Şekil 4.6. Spontan hipertansif ratlarda Ang II uyarımı ile birlikte çeşitli inhibitörlerin Src aktivasyonu üzerine etkisi. DPI dışındaki diğer inhibitörlerle inkübasyon sonrasında Ang II ile uyarılan hücrelerde Src fosforilasyonun inhibe olduğu gözlenmiştir.

Şekil 4.6'da görülen bantlar:

Birinci bant; hiç bir aktivatör ve inhibitörle uyarılmayan kontrol grubu olarak adlandırılan VDKH'ne aittir.

İkinci bant; Ang II (100 nM, 5 dakika) uyarımı sonrasında VDKH'nde meydana gelen Src aktivasyonunu göstermektedir. Src aktivasyonunun bu konsantrasyon ve süre uygulamasında gerçekleştiği gösterildi.

Üçüncü bant; Losartan (10⁻⁵ M, 30 dakika) ile inkübasyonun ardından, Ang II (100 nM, 5 dakika) uyarımı sonrasında VDKH'nde meydana gelen Src aktivasyonunu göstermektedir. Hücrelerde Ang II uyarımı olduğu halde, AT1

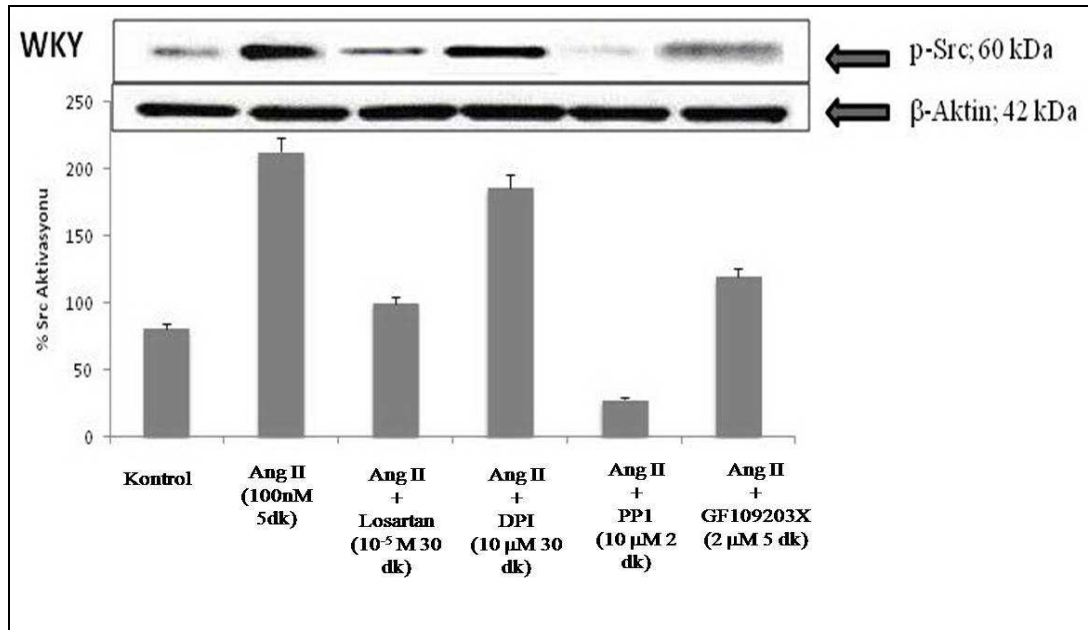
reseptörünün Losartan ile inhibe edilmesi sonucunda Src aktivasyonunda azalma olduğu gözlemlendi.

Dördüncü bant; DPI (10 μ M, 30 dakika) ile inkübasyonun ardından, Ang II (100 nM, 5 dakika) uyarımı sonrasında VDKH'nde meydana gelen Src aktivasyonunu göstermektedir. NAD(P)H oksidaz inhibitörü (DPI) uygulanan hücrelerde Ang II uyarımı sonrasında Src aktivasyonunda önemli bir azalma olmadığı tesbit edildi.

Beşinci bant; PP1 (10 μ M, 2 dakika) ile inkübasyonun ardından, Ang II (100 nM, 5 dakika) uyarımı sonrasında VDKH'nde meydana gelen Src aktivasyonunu göstermektedir. Hücrelerin Src inhibitörü (PP1) ile inkübasyonunu takiben Ang II ile uyarılması sonucunda Src aktivasyonunun gerçekleşmediği gözlemlendi.

Altıncı bant; GF109203X (2 μ M, 5 dakika) ile inkübasyonun ardından, Ang II (100 nM, 5 dakika) uyarımı sonrasında VDKH'nde meydana gelen Src aktivasyonunu göstermektedir. PKC inhibitörü uygulanan hücrelerde, Ang II uyarımı sonucunda Src aktivasyonunun azaldığı gözlemlendi.

Wistar Kyoto ratlardan elde edilen VDKH'nde kullanılan aktivatör ve inhibitörler, SHR grubunda belirtilen konsantrasyon ve sürelerle aynı tutularak uygulandı (Şekil 4.7). Wistar Kyoto rat grubuna ait western blot sonuçları, SHR grubunun sonuçlarına yakın bulunmuştur.



Şekil 4.7. Wistar Kyoto ratlarda Ang II uyarımı ile birlikte çeşitli inhibitörlerin Src aktivasyonuna etkisi. DPI dışındaki diğer inhibitörlerle inkübasyon sonrasında Ang II ile uyarılan hücrelerde Src fosforilasyonunun inhibe olduğu gözlemlenmiştir.

Birinci bant; herhangi bir uyarılmaya maruz kalmayan, kontrol grubu olarak adlandırılan VDKH'ne aittir.

İkinci bant; Ang II (100 nM, 5 dakika) uyarımı sonrasında VDKH'nde meydana gelen Src fosforilasyonunu göstermektedir. Src fosforilasyonunun bu konsantrasyon ve süre uygulamasında gerçekleştiği gösterildi.

Üçüncü bant; Losartan (10^{-5} M, 30 dakika) ile inkübasyonun ardından, Ang II (100 nM, 5 dakika) uyarımı sonrasında VDKH'nde meydana gelen Src aktivasyonunu göstermektedir. Hücrelerde Ang II uyarımı olduğu halde, AT1 reseptörünün Losartan ile bloke edilmesi sonucunda Src aktivasyonun da azalma olduğu tesbit edildi.

Dördüncü bant; DPI (10 μ M, 30 dakika) ile inkübasyonun ardından, Ang II (100 nM, 5 dakika) uyarımı sonrasında VDKH'nde meydana gelen Src aktivasyonunu göstermektedir. NAD(P)H oksidaz inhibitörü (DPI) uygulanan hücrelerde Ang II uyarımı sonrasında Src aktivasyonunda çok fazla bir azalma olmadığı gözlemlendi.

Beşinci bant; PP1 (10 μ M, 2 dakika) ile inkübasyonun ardından, Ang II (100 nM, 5 dakika) uyarımı sonrasında VDKH'nde meydana gelen Src aktivasyonunu göstermektedir. Hücrelerin Src inhibitörü (PP1) ile inkübasyonunu takiben Ang II ile uyarılması sonucunda Src aktivasyonunun gerçekleşmediği gözlemlendi.

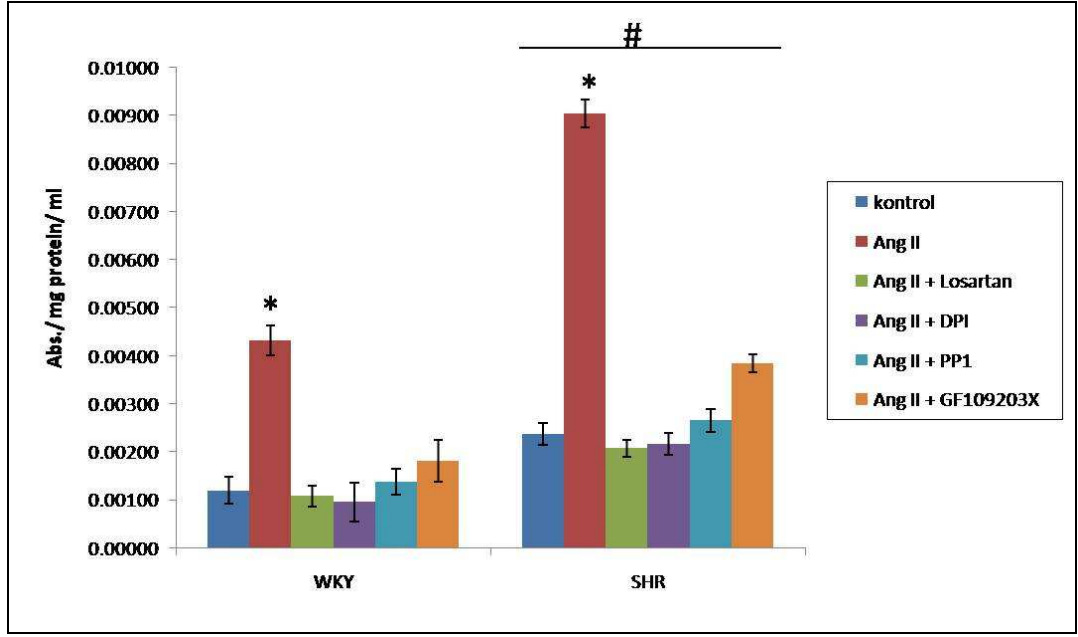
Altıncı bant; GF109203X (2 μ M, 5 dakika) ile inkübasyonun ardından, Ang II (100 nM, 5 dakika) uyarımı sonrasında VDKH'nde meydana gelen Src aktivasyonunu göstermektedir. PKC inhibitörü uygulanan hücrelerde, Ang II uyarımı sonucunda Src aktivasyonunun azaldığı gözlemlendi.

4.5. Spontan Hipertansif ve Wistar Kyoto Ratlardan Elde Edilen Vasküler Düz Kas Hücre Kültürlerinde Ang II ile Uyarılan Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Süperoksit Anyon Ölçümü

Wistar kyoto ratlardan (WKY) ve spontan hipertansif ratlardan (SHR) elde edilen VDKH ile yapılan Ang II uyarımı ve/veya inhibitor uygulamaları sonucunda ölçülen süperoksit anyon miktarları ve istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.8 ve Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

WKY ve SHR gruplarında, herhangi bir uyarımın olmadığı (kontrol) hücrelerdeki süperoksit anyon miktarları, Ang II uyarımı sonrasında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p<0.05$). Ang II uyarımı öncesinde inhibitörlerle (Losartan, DPI, PP1 ve GF109203X) inkübasyona bırakılan hücrelerde süperoksit anyon miktarları, yalnızca Ang II ile uyarılmış hücrelere göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$).

SHR ve WKY gruplarını birbirleri ile karşılaştırdığımızda ise SHR grubunda, hem kontrol hemde aktivatör ve/veya inhibitör uygulamaları sonucunda oluşan süperoksit anyon miktarları WKY grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 4.8. Süperoksit anyonu ölçüm sonuçlarına ait grafik. Yalnızca Ang II uyarımı sonrasında süperoksit anyonu miktarları, inhibitörler ile inkübasyonun ardından Ang II ile uyarılmış hücrelerde oluşan süperoksit anyonu miktarlarına göre anlamlı derecede artış göstermektedir. Ayrıca SHR grubunun Ang II ile uyarılması sonucunda oluşan süperoksit anyonu miktarı WKY grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir.

*; $p < 0,05$; grup içinde diğer inhibitör uygulamaları ve kontrol ile kıyaslandığında,
 #; $p < 0,05$; WKY grubu ile karşılaştırıldığında.

Tablo 4.2. Süperoksit anyonu ölçüm sonuçları (n=6). Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

	Kontrol	Ang II	Ang II + Losartan	Ang II + DPI	Ang II + PP1	Ang II + GF109203X
	(Abs/ μ g protein/ml)	(Abs/ μ g protein/ml)	(Abs/ μ g protein/ml)	(Abs/ μ g protein/ml)	(Abs/ μ g protein/ml)	(Abs/ μ g protein/ml)
WKY	1.19x10 ⁻³ $\pm$ 0.22 x10 ⁻³	4.32 x10 ⁻³ $\pm$ 0.29 x10 ⁻³ *	1.08 x10 ⁻³ $\pm$ 0.18 x10 ⁻³	0.95 x10 ⁻³ $\pm$ 0.23 x10 ⁻³	1.38 x10 ⁻³ $\pm$ 0.28 x10 ⁻³	1.81 x10 ⁻³ $\pm$ 0.23 x10 ⁻³
SHR	2.37 x10 ⁻³ $\pm$ 0.28 x10 ⁻³ #	9.04 x10 ⁻³ $\pm$ 0.31 x10 ⁻³ *,#	2.07 x10 ⁻³ $\pm$ 0.24 x10 ⁻³ #	2.15 x10 ⁻³ $\pm$ 0.26 x10 ⁻³ #	2.65 x10 ⁻³ $\pm$ 0.24 x10 ⁻³ #	3.84 x10 ⁻³ $\pm$ 0.18 x10 ⁻³ #

TARTIŞMA

Hipertansiyonun sebepleri ya da mekanizmaları yıllar boyunca iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi, sempatik sinir sistemi, endotelin sistemi, vazopressin sistemi ve yakın geçmişte tanımlanan reaktif oksijen türleri de dahil olmak üzere çok sayıda vazokonstrüktif mekanizmanın deney modellerinde veya insanlarda hipertansiyon gelişimiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, hipertansiyonda ROS üretimin artış olduğu gösterilmiştir. Çeşitli enzimatik oksidasyon-redüksiyon tepkimeleri süperoksit anyonu oluşumuna sebep olmasına rağmen, kardiyovasküler dokulardaki süperoksit anyonu oluşumunun esas kaynağının NAD(P)H oksidaz aktivasyonu olduğu düşünülmektedir [72].

NAD(P)H oksidaz ilk olarak immün sistemde tanımlanmış ve süperoksit anyonu üreten bir enzim olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, VDKH'nde Ang II'nin NAD(P)H oksidazı aktive ettiğinin bulunmasını takiben, kardiyovasküler alandaki araştırmacıların NAD(P)H oksidaza olan ilgileri önemli derecede artmıştır. Birçok farklı NAD(P)H oksidaz alt ünitesinin kardiyovasküler dokularda eksprese edildiğinin kanıtlanması ve bu enzim ile kardiyovasküler rahatsızlıklar arasındaki ilişkiyle ilgili büyük miktarlarda veri toplanması, enzimi kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde potansiyel bir hedef haline getirmiştir [64]. Araştırmacılar tarafından kardiyovasküler sistemdeki süperoksit anyonu kaynaklarının, mitokondri, lipooksijenaz, siklooksijenaz, sitokrom p450, ksantin oksidaz ve NAD(P)H oksidaz gibi çeşitli sistemleri içerdiği ve serbest radikallerin kaynaklarının rahatsızlıkların tipine göre farklılık gösterebileceği söylenmektedir. Örneğin iskemi-reperfüzyon hasarında, oluşan büyük miktardaki süperoksit anyonundan sitokrom p450 sorumlu tutulmaktadır [73]. Bununla birlikte, yapılan bazı çalışmalar diğer süperoksit kaynaklarıyla birlikte ateroskleroz gelişiminde NAD(P)H oksidazın başrol oynadığını işaret etmektedir [74]. NAD(P)H oksidaz'ın kardiyovasküler hastalıklardaki öneminden dolayı, NOX'un aşırı aktivasyonu ile ilişkili hücresel yolaklar ve mekanizmalar son yıllarda geniş bir şekilde araştırılmaktadır. Ancak NAD(P)H oksidaz'ın üst yolak aktivatörlerinin oldukça fazla olması, bu yolakların bilinenden daha kompleks olduğunu düşündürmektedir [7, 75, 76].

Munzel et al. [77] yaptıkları çalışmada kardiyovasküler hücrelerdeki NAD(P)H oksidazın, hücre büyümesi ve proliferasyon gibi temel hücresel fonksiyonlarla birlikte kardiyovasküler yeniden yapılanma ve damar içi basıncın kontrolünü düzenlediğini görmüşlerdir.

Morawietz et al. [78] elde ettikleri bulgulara göre, renin-anjiyotensin sistemi kardiyovasküler rahatsızlıklarla yakın bir şekilde ilişkilidir ve spontan hipertansif ratlarda NAD(P)H oksidaz alt ünitelerinin aşırı ekspresyonunu rapor etmişlerdir.

Araştırmacılara göre, NAD(P)H oksidaz sinyalizasyonu sırasında, çok sayıda uyarıcı olması ve aktivasyonu sırasında birbirine yaklaşan birçok yolak bulunması, bu sinyalizasyon mekanizmasının anlaşılmasını güçleştirmektedir. NAD(P)H oksidaz sinyalizasyonunun en karmaşık yönlerinden biri muhtemelen onun ana ürünü olan süperoksit anyonu ve bundan türeyen diğer radikallerdir. Bu radikaller çeşitli yolakları etkileyebilen kuvvetli sinyal molekülleridir. Süperoksit anyonu ve H_2O_2 gibi serbest radikaller, tirozin kinazları aktive ederler [79] ve Src aktivasyonu veya MAPK aktivasyonu gibi süreçlerle ilişkilidir. Bu ilişki, özellikle artan NAD(P)H oksidaz aktivitesi ile alakalıdır [15, 80].

Vaziri et al. [81] tarafından ileri sürülen ve desteklenen iki pozitif geribildirim mekanizması vardır. Yüksek kan basıncı, NAD(P)H oksidaz uyarımını artırır. Bu durumun tersi de mümkün görülmektedir. NAD(P)H oksidazın aşırı aktivasyonu kan basıncını artırır.

Touyz RM. et al. [82] yaptıkları çalışmada, SHR'dan elde ettikleri VDKH kültürlerinde, Ang II-uyarımli Src üst regülasyonunun ERK1/2 fosforilasyonunu artırıp arttırmadığına bakmışlardır. Deneylerde yetişkin wistar kyoto ve spontan hipertansif rat grupları kullanılmıştır. SHR grubunun sistolik kan basınçları WKY grubuna (SHR: $189 \pm 1,4$ mmHg; WKY: $112 \pm 1,6$ mmHg) göre daha yüksek bulunmuştur. Vasküler düz kas hücreleri deneye alınmadan önce serumsuz ortamda 30 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin Ang II (10^{-7} mol/L) ile uyarımı ve/veya Src inhibitörü olan PP2 (5×10^{-7} mol/L) ve/veya Ang II reseptör antagonisti irbesartan ile inkübasyonu sonucunda, Ang II'nin, WKY'lerde Src fosforilasyonunu 2 kat SHR'lerde ise 4 kat arttırdığı bulunmuştur. Ang II reseptör antagonisti irbesartanın her iki grupta da Src fosforilasyonunu ortadan kaldırdığı görülmüştür. Src inhibitörü PP2'nin Ang II'nin etkisini tam olarak inhibe etmese de Src fosforilasyonunu azalttığı gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda, Ang II'nin NAD(P)H oksidazı aktive ederek süperoksit anyonu oluşumunu uyardığı ve bu enzimatik yolun DPI ile inhibisyonu sonucunda Ang II uyarımli hipertrofinin inhibe edildiği gösterilmiştir. Çeşitli vasküler hastalıklarda, Ang II'nin VDKH'nin proliferasyonundaki pro-oksidan etkilerinin önemli olduğu söylenmektedir. Ang II aracılı VDKH'nin proliferasyonunda çok sayıda sinyal mekanizmasının ilişkili olduğu ve kullanıldığı bilinmesine rağmen, oksidatif stresin bununla ilişkisi tam olarak açığa çıkarılamamıştır [25]. Zafari AM et al. [25] yaptıkları çalışmada, NAD(P)H oksidazın Ang II ile uyarılması sonucunda oluşan H_2O_2 miktarını ve H_2O_2 birikimine Ang II'nin etkisini ve bununla birlikte SOD aktivitesini araştırmışlardır. Araştırmacılar Ang II (100 nM, 4 saat) uyarımı sonrasında NAD(P)H oksidaz ve SOD aktivitesi sonucunda oluşan H_2O_2 birikiminde artış olduğunu bulmuşlardır. Ang II uyarımı öncesinde DPI (10 μ M) ile inkübe edilen hücrelerde NAD(P)H oksidazın tamamen inhibe olduğunu görmüşlerdir. Yine VDKH'nin AT1 reseptör blokörü losartan (10 μ M) ile inkübasyonu sonucunda Ang II uyarımı ile H_2O_2 artışının inhibe olduğu gözlemlenmiştir.

Cruzado MC et al. [83] yaptıkları çalışmada SHR'lardan elde edilen VDKH'lerinde Ang II uyarımıyla ROS oluşumunda değişiklik olup olmadığına ve Ang II aracılı olaylarda IGF-1R rolüne bakmışlardır. Kontrol grubu olarak sağlıklı WKY kullanılmıştır. Çalışma 4 haftalık (prehipertansif), 9 haftalık (hipertansiyonun gelişim dönemi) ve 16 haftalık (hipertansiyon oluşmuş) hayvanlardan kültüre edilmiş VDKH'nde yapılmıştır. Kan basınçları tail-cuff yöntemiyle ölçülmüştür. ROS üretimi ve NAD(P)H oksidaz aktivasyonu floresans ve kemilüminesans yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. ROS oluşumundaki değişimi 10 μ M DPI (NAD(P)H oksidaz inhibitörü) kullanarak test etmişler. Sistolik kan basınçlarının 9 ve 16 haftalık SHR gruplarında WKY oranla anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. Doz bağımlı Ang II uyarımının hem SHR hem de WKY de ROS oluşumunu arttırdığını ve VDKH'de Ang II uyarımına karşı oluşan yanıtın SHR'lerde WKY'lere göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ang II uyarımına karşı oluşan yanıtların DPI ile inhibe edildiğini görmüşler, bunu da "NAD(P)H oksidaz, Ang II-uyarımli ROS oluşumun muhtemel kaynağıdır." şeklinde yorumlamışlardır.

Laboratuvarımızda anjiyotensinin NAD(P)H oksidaz aktivitesine etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, Ang II uyarımı sonrasında VDKH'ndeki süperoksit anyonu miktarları belirgin şekilde artış göstermiştir. AT1 reseptör inhibitörü Losartan ve NOX inhibitörü DPI, Ang II ile yapılan uyarımın ardından oluşan süperoksit anyonu miktarlarını bazal hücre içi seviyelere yakın bir değere kadar anlamlı şekilde azaltmıştır. Tüm deneyler hem rezasurin hem de sitokrom c redüksiyonu yöntemleri ile gösterilmiş ve her iki yöntemde de benzer sonuçlara ulaşılmıştır [71].

Çalışmamızda; SHR ve WKY gruplarının tansiyonları tail-cuff yöntemiyle ölçüldü ve SHR grubunun kan basınçları, literatür bilgisi ile uyumlu olarak WKY grubunun kan basınçlarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu (SHR: 189.6 ± 1.4 mmHg; WKY: 132 ± 2.8 mmHg).

SHR ve WKY gruplarından izole edilen VDKH'lerinde yapmış olduğumuz aktivatör ve inhibitor denemelerinde; Ang II (100 nM 5 dakika) ile uyarım sonucunda her iki grupta da Src fosforilasyonunda ve NAD(P)H oksidaz aktivasyonunda artış olduğunu western blot analizleri ve süperoksit anyonu ölçümleri ile gözlemledik. Ang II uyarımı sonrasında meydana gelen süperoksit anyonu miktarlarına bakıldığında, SHR grubunda oluşan süperoksit anyonu miktarı WKY grubuna göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuç literatür ile de uyum göstermektedir. Buna göre birçok patolojik süreçte rol oynadığı düşünülen süperoksit anyonunun ve dolayısı ile NAD(P)H oksidaz aktivitesinin hipertansiyonda artış gösterdiğini söyleyebiliriz. Ang II uyarımı öncesinde, AT1 reseptör blokörü losartan ile inkübe edildikten sonra deneye alınan hücrelerde, Src fosforilasyonunda ve süperoksit anyonu oluşumunda azalma olduğunu tespit ettik. Ang II uyarımı öncesinde, NAD(P)H oksidaz inhibitörü DPI ile inkübe edilen hücrelerde ise süperoksit anyonu oluşumunda anlamlı bir azalma gözlenirken, Src fosforilasyonunda bir azalma gerçekleşmedi. Elde edilen sonuçlara göre Src fosforilasyonunun ve NAD(P)H oksidaz aktivasyonunun Ang II uyarımı sonrasında AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştiğini söyleyebiliriz. DPI ile inkübe edilen hücrelerde Ang II uyarımı sonrasında NAD(P)H oksidaz aktivasyonunda azalma

olmasına rağmen, Src fosforilasyonunda bir değişim olmaması, bize Src'nin NAD(P)H oksidazdan daha önce uyarıldığını düşündürmektedir. Sesiah PN. et al. [15]'in sonuçlarına göre, Src, NAD(P)H oksidaz aktivasyonunu takiben fosforile olurken aynı zamanda NAD(P)H oksidaz üzerinden oluşan ROS tarafından da Src aktivasyonu gerçekleşmektedir. Touyz RM. et al. yaptıkları çalışmalarda, Ang II uyarımı sonrasında NAD(P)H oksidaz aktivasyonunun gerçekleşmesinde, Src fosforilasyonunu önemli unsurlardan biri olarak tanımlamıştır. Src'nin NAD(P)H oksidazın üst yolağında bulunduğunu ve p47^{phox}'un, Src'nin alt yolağındaki önemli bir hedef proteini olduğunu ileri sürmektedirler [12, 82]. Laplante MA. et al. [64] ise NAD(P)H oksidaz'ı Src'nin aktive ettiğini ve aynı zamanda PKC'nin de bir NAD(P)H oksidaz alt ünitesi olan p47^{phox}'u doğrudan aktive edebileceğini söylemektedir.

Sesiah PN. et al. [15] yaptıkları çalışmada VDKH'nde Ang (100 nM) uyarımını takiben bir NAD(P)H oksidaz alt ünitesi olan Rac'ın aktivasyonunda artış görmüşlerdir. Bu hücrelerin Src ailesi tirozin kinaz inhibitörü olan PP1 ile inkübasyon sonrasında Ang II uyarımı sonucunda Rac aktivasyonunda bir azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. PP1'in aynı zamanda Ang II uyarımlı ROS oluşumunun stimülasyonunu da inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre, Rac aktivasyonu ve ROS oluşumunun Src bağımlı bir yolak üzerinden meydana geldiğini düşünmüşlerdir. Yaptıkları çalışmada elde ettikleri başka bir sonuca göre de VDKH'nde NAD(P)H oksidaz aktivasyonunun başlamasında, yine NAD(P)H oksidaz kaynaklı düşük miktarda ROS aracılığı ile Src'nin aktivasyonunu içeren bir ileri besleme mekanizmasının var olduğunu ve böylece kesintisiz oksidaz aktivasyonunun sürdürüldüğünü ileri sürmüşlerdir.

Touyz RM. et al. [12] yaptıkları çalışmada Ang II uyarımlı ROS oluşumunun Src bağımlı olup olmadığını değerlendirmek için başka bir Src ailesi tirozin kinaz inhibitörü olan PP2 varlığında süperoksit anyonu ve H₂O₂ oluşumunu floresan yöntemiyle ölçmüşlerdir. Ang II'nin doza bağımlı olarak süperoksit anyonu ve H₂O₂ oluşumunda artışa sebep olduğunu bulmuşlar ve DPI'ın, Ang II uyarımlı NAD(P)H oksidaz aktivasyonunu inhibe ettiğini görmüşlerdir. Yine PP2 varlığında Ang II uyarımlı süperoksit anyonu oluşumunda azalma tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada kemilüminesans yöntemiyle NAD(P)H oksidaz aktivasyonuna da bakmışlar ve Ang II ile uyarılan hücrelerde NAD(P)H oksidaz aktivasyonunda kayda değer bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Hücrelerin PP2 ile inkübasyonu sonrasında Ang II ile uyarılması sonucunda ise NAD(P)H oksidaz aktivasyonunda anlamlı bir azalma olduğunu bulmuşlardır. Aynı araştırmacıların daha önce yaptıkları bir çalışma da, insan rezistans arter VDKH'nde NADPH aktivasyonunu Src'nin düzenlediğini ikna edici bir şekilde göstermiştir. Bu çalışma, Ang II uyarımlı p47^{phox} fosforilasyonu ve translokasyonunun ve NAD(P)H oksidaz aktivasyonuna özgü yolakların, insan VDKH'de Src inhibisyonu vasıtasıyla tamamen bloke olduğunu açık bir şekilde göstermiştir. Src'nin NAD(P)H oksidazın üst yolağında bulunduğunu ve p47^{phox}'un, Src'nin alt yolağındaki önemli bir hedef proteini olduğunu ileri sürmektedirler. Bu bulgular, Sesiah PN. et al. [15]'ün çalışmaları sonucunda, ratlarda Src'nin NAD(P)H oksidazı aktive ettiğini gösteren diğer bulgularla tutarlıdır.

Yaptığımız deneyler sonucunda, Ang II uyarımı öncesinde, Src inhibitörü PP1 ile inkübe edilen hücrelerde, Src fosforilasyonun bazal seviyenin de altına düştüğünü ve süperoksit anyonu miktarında anlamlı bir azalma olduğunu gördük. Literatür ile uyumlu olan bu verilere göre, Src fosforilasyonunun NAD(P)H oksidaz aktivasyonunda majör bir rol oynadığını söyleyebiliriz.

Touyz RM. et al. çalışmalarında büyüme faktörü reseptörleri ve Src fosforilasyonunun, Ang II vasıtasıyla NAD(P)H oksidaz aktivasyonunda anahtar unsurlarından biri olarak tanımlamıştır. Yapılan bir çalışmada, bir Src inhibitörü olan PP2'nin, Ang II vasıtasıyla süperoksit anyonu oluşumunu % 80 oranında bloke ettiği gözlemlenmiştir [12, 15]. Buna ek olarak, PKC'nin Ang II vasıtasıyla NOX'u direk olarak aktive edebilen önemli bir molekül olduğu düşünülmektedir. Çünkü PKC, NOX'un p47^{phox} alt ünitesini fosforilleyebilir [64]. Cai H. et al. [84] tarafından büyüme faktörü reseptörleri ve Src'nin aktivasyonunun, Ang II vasıtasıyla NOX uyarımından sorumlu ana yolak olduğu tanımlanmıştır. Ang II aracılı NOX aktivasyonunun başlıca mekanizmaları farklı inkübasyon sürelerine bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Sesiah PN. et al. ve Laplante MA. et al.'un yapmış oldukları süre dizisi çalışmaları başlangıçtaki süperoksit anyonu üretiminin 1 saat sonra düşmeye başladığını göstermiştir [15, 85].

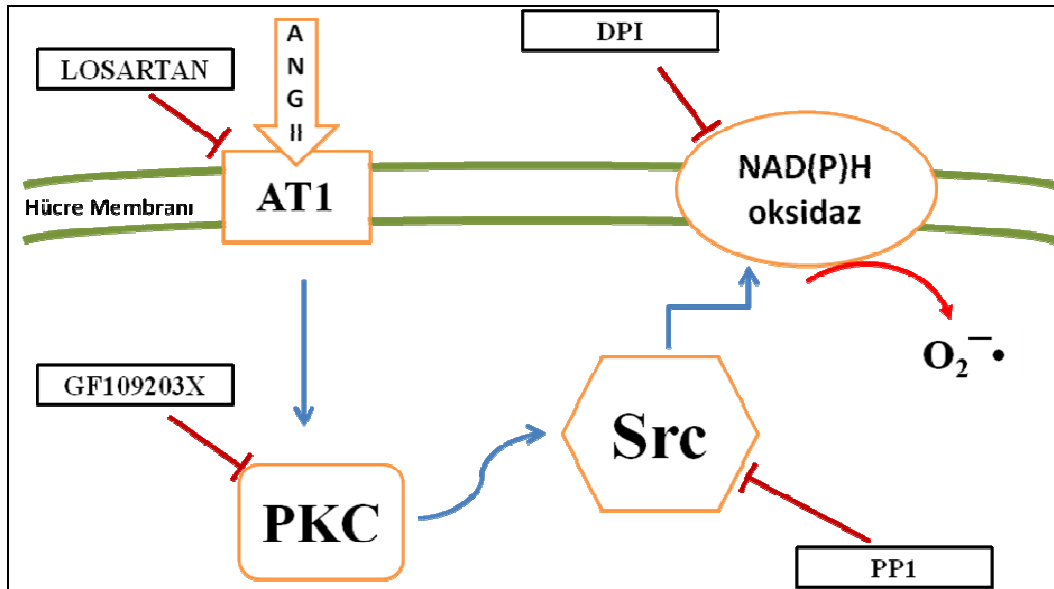
Vasküler düz kas hücrelerinde gp91^{phox} homologları (NOX-1 ve NOX-4)'nın varlığı ve p67^{phox}'un olmadığı koşullarda önemli ölçüde farklılık gösterir. Vasküler p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} ve NOX-2'nin üst düzenlenmesi, aktif de novo sentezini ve hormonal uyarım sırasında meydana gelen alt ünitelerin toplanmasını işaret etmektedir. Cifuentes ME. et al. [63]'ün yaptıkları çalışmada Ang II'nin vasküler düz kas hücrelerinde p47^{phox}'un fosforilasyonuna ve translokasyonuna ve tabi ki sonuç olarak da artmış oksidatif aktiviteye sebep olduğu gösterilmiştir. NAD(P)H oksidaz'ın üst yolak regülasyonu ile ilgili olarak hayvan modellerinde yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Ang II uyarımlı NAD(P)H oksidaz aktivitesi, fosfolipaz D fosforilasyonu vasıtasıyla açıklanabilir. Fagositlerde, PKC, p47^{phox}'un fosforilasyonu ve oksidaz aktivasyonunda önemli bir araçtır. Son veriler PKC'nin vasküler hücrelerde oksidaz aktivitesiyle doğrudan ilişkili olduğunu işaret etmektedir.

Touyz RM. [83]'ye göre süperoksit anyonu ve hidrojen peroksiti içine alan reaktif oksijen türleri (ROS) VDKH'nin fonksiyonlarını düzenleyen sinyal molekülleridir. Vasküler düz kas hücrelerindeki süperoksit anyonunun asıl kaynağı olan NAD(P)H oksidaz aktive olduğunda, elektron vericisi olarak oksijene 1 elektron aktarılmasını katalizleyerek, süperoksit anyonu oluşumuna sebep olur [83]. Vasküler düz kas hücrelerinde NAD(P)H oksidazın düzenlenmesinden sorumlu birçok faktör vardır. Ang II bunlardan en önemlisi gibi görünmektedir. Vasküler düz kas hücrelerinde Ang II-aracılı büyüme, kasılma/gevşeme ve inflamasyonda NAD(P)H oksidaz üzerinden oluşan süperoksit anyonu önemli bir rol oynar. Tirozin kinazların fosforilasyonu ve hücre içi kalsiyumun mobilizasyonu gibi birçok süreç redoks bağımlı sinyal iletimi olaylarıyla ilişkilidir. Buna ek olarak, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ve insülin benzeri büyüme faktör 1 reseptörü (IGF-1R) gibi büyüme faktörü reseptörleri süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit vasıtasıyla aktive

olur. Aktifleşmiş EGFR hücre içi ROS oluşumunu uyarır. Araştırmacılar ROS'un tirozin kinazların hem üst hem de alt yolaklarında bulunduğunu ifade etmektedirler.

Hipertansiyon gibi damar hasarı ile ilişkili durumlarda, Ang II-uyarımli NAD(P)H oksidaz stimölasyonunun arttığı ve ROS türevlerinde artışın gerçekleştiğı görölür [31]. Hipertansiyonda, NAD(P)H oksidazın alt yolakları tam olarak açığa çıkmamasına rağmen, artmış Src, PKC ve PLD aktivasyonu önemli bir rol oynuyor olabilir [15]. Özellikle SHR'lardan izole edilen VDKH'inde AT1 reseptörü üzerinden EGFR transaktivasyonunun artmış olması, reseptör tirozin kinazların rol oynadığını düşündürebilir [82].

Literatür bilgileri doğrultusunda yaptığımız çalışmada, Ang II uyarımı öncesinde, PKC inhibitörü GF109203X ile inkübe edilen hücrelerde, Src fosforilasyonunda ve süperoksit anyonu oluşumunda azalma olduğunu gözlemledik. Bu sonuca göre, Ang II uyarımı sonrasında oluşan sinyal yolağında Src'nin, PKC'den sonra aktive olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 5.1. Ang II uyarımı sonrasında NAD(P)H oksidaz üzerinden süperoksit anyonu oluşumu
Ang II: Anjiyotensin II, AT1: Anjiyotensin II reseptör 1, PKC: Protein kinaz C

Tüm western blot sonuçları ve süperoksit anyonu ölçümlerine göre, Ang II uyarımı sırasında, AT1 reseptörünün bloke edilmesi ve PKC'nin inhibe edilmesi fark edilebilir ölçüde Src inhibisyonuna ve süperoksit anyonu miktarında anlamlı bir azalmaya sebep olmuştur. Src'nin inhibisyonu da süperoksit anyonu oluşumunu anlamlı derecede azaltmıştır. Ancak NAD(P)H oksidaz inhibisyonu sonucunda Src aktivasyonunda bir azalma gerçekleşmemiştir. Buna bağlı olarak, PKC ve Src'nin NAD(P)H oksidaz'ın üst yolağında olduğunu ve NAD(P)H oksidaz aktivasyonu için Src'nin fosforile olması gerektiğini söyleyebiliriz (Şekil 5.1).

SONUÇLAR

Bu çalışmada, SHR ve WKY gruplarından izole edilen vasküler düz kas hücrelerinde Ang II uyarımı sonucunda NAD(P)H oksidaz aktivitesine ve buna bağlı olarak oluşan süperoksit anyonu miktarına ve bu yolda Src'nin rolüne bakılmıştır.

Bulduğumuz deneysel verilere göre sonuçlarımızı şu şekilde özetleyebiliriz:

1. SHR grubunun kan basınçları WKY grubuna göre yüksek çıkmıştır.
2. Yapılan western blot analizlerinde, hem SHR hem de WKY gruplarında 5 dakika 100 nM Ang II uyarımıyla Src aktivasyonu en yüksek düzeyde gözlemlenmiştir.
3. SHR ve WKY gruplarında, Src fosforilasyonunun Ang II uyarımı ile AT1 reseptörü üzerinden olduğu görülmüştür.
4. SHR ve WKY gruplarında Ang II uyarımı sonrasında Src fosforilasyonu, PKC aktivasyonundan sonra gerçekleşmektedir.
5. SHR ve WKY gruplarında Ang II uyarımı sonrasında Src fosforilasyonu, NAD(P)H oksidaz aktivasyonundan önce gerçekleşmektedir.
6. Ang II uyarımı öncesinde AT1 reseptörünün bloke edilmesi ve PKC'nin inhibe edilmesi fark edilebilir ölçüde Src inhibisyonuna sebep olmuştur. Ancak NAD(P)H oksidaz inhibisyonu sonucunda Src aktivasyonunda bir azalma gerçekleşmemiştir. Buna bağlı olarak PKC ve Src'nin NAD(P)H oksidaz'ın üst yolağında olduğu söylenebilir.
7. WKY grubuna göre SHR grubunda, Ang II uyarımı sonrasında NAD(P)H oksidaz enzim kompleksi üzerinden oluşan süperoksit anyonu miktarı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Buna bağlı olarak hipertansiyonda süperoksit anyonu oluşumunun arttığı söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, et al., Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*. 25(3): 305-313, 1995.
2. Lifton RP, Gharavi AG, and Geller DS, Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. 104(4): 545-556, 2001.
3. Ferrario CM and Strawn WB, Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 98(1): 121-128, 2006.
4. Touyz RM and Berry C, Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res*. 35(9): 1001-1015, 2002.
5. Brandes RP, A radical adventure: the quest for specific functions and inhibitors of vascular NADPH oxidases. *Circ Res*. 92(6): 583-585, 2003.
6. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, et al., Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 97(8): 1916-1923, 1996.
7. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, et al., p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res*. 80(1): 45-51, 1997.
8. Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, and Pagano PJ, Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular $O_2^{\cdot-}$ and systolic blood pressure in mice. *Circ Res*. 89(5): 408-414, 2001.
9. Paravicini TM and Touyz RM, Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*. 71(2): 247-258, 2006.
10. Landmesser U, Cai H, Dikalov S, et al., Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*. 40(4): 511-515, 2002.
11. Li JM, Wheatcroft S, Fan LM, Kearney MT, and Shah AM, Opposing roles of p47phox in basal versus angiotensin II-stimulated alterations in vascular $O_2^{\cdot-}$ production, vascular tone, and mitogen-activated protein kinase activation. *Circulation*. 109(10): 1307-1313, 2004.

12. Touyz RM, Yao G, and Schiffrin EL, c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(6): 981-987, 2003.
13. Touyz RM and Schiffrin EL, Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 34(4 Pt 2): 976-982, 1999.
14. Touyz RM and Schiffrin EL, Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens.* 19(7): 1245-1254, 2001.
15. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, et al., Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res.* 91(5): 406-413, 2002.
16. Oda Y, Renaux B, Bjorge J, et al., cSrc is a major cytosolic tyrosine kinase in vascular tissue. *Can J Physiol Pharmacol.* 77(8): 606-617, 1999.
17. Touyz RM, He G, Wu XH, et al., Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension.* 38(1): 56-64, 2001.
18. Francis CK, Lip GYH, Hypertensive Heart Disease. *Cardiology* ed. Crawford MH, DiMarco JP, Mosby Ltd., 1 ed., Sec. 3: 11.1-11.16, 2001
19. World Health Organization (WHO), International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens.* 21: 1983-1992, 2003.
20. Canadian Hypertension Education Program (CHEP), Recommendations for the Management of Hypertension. 2008.
21. Joint National Committee, The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC VII), (Publication No: 03- 5233), 2003.
22. Onat A, Sansoy V, Soydan İ, Tokgözoğlu L, Adalet K, Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri (TEKHARF) Çalışması, Oniki yıllık izleme deneyimine göre Türk erişkinlerinde kalp sağlığı. İstanbul Türkiye,. 2003.
23. Kumbasar D, Kardiyovasküler Hastalıklar, Arteriyel Hipertansiyon. İç Hastalıkları, ed. İliçin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G, Ünal S, 2 Baskı, Cilt 1. 409-415. 2003
24. Babalık E, Hipertansiyon Patofizyolojisi. *Klinik Gelişim.* 18(2): 25-32, 2005.

25. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, et al., Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 32(3): 488-495, 1998.
26. Touyz RM and Schiffrin EL, Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 52(4): 639-672, 2000.
27. İlerigelen B, Hipertansiyon Tedavisi. *Klinik Gelişim*. 18(2): 33-41, 2005.
28. Michel JB, Thaumat O, Houard X, et al., Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27(6): 1259-1268, 2007.
29. Köksoy AA, Damar Düz Kas Proliferasyonunda Sinyal İletimi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 55(4): 297-306, 2002.
30. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Vascular/Images/VesWall.jpg>.
31. Touyz RM, Tabet F, and Schiffrin EL, Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 30(11): 860-866, 2003.
32. Mulvany MJ, Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 4(1): 49-55, 2002.
33. Brasier AR, Recinos A, 3rd, and Eledrisi MS, Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22(8): 1257-1266, 2002.
34. Catanzaro DF, ed. Angiotensinogen: Physiology, molecular biology, and relevance to hypertension. *Hypertension*, ed. Oparil S, Weber MA. WB Saunders Company, Philadelphia. 77-89. 2000
35. Haber E; Carlson W, ed. Renin-angiotensin system. In: *Hypertension. Physiopathology and treatment*, ed. Genest J, Kuchel O, Homet P, Cantin M. McGraw-Hill Book Company, New York, U.S. 171-184. 1983
36. Nickenig G and Harrison DG, The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: Part II: AT(1) receptor regulation. *Circulation*. 105(4): 530-536, 2002.
37. Şen S, Primer Hipertansiyon patogenezinde RAAS'nin rolü. *Türk Nefroloji ve Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*. 13 (2): 45-50, 2004.
38. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, and Diz DI, Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 30(3 Pt 2): 535-541, 1997.

39. Wollert KC and Drexler H, The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovasc Res.* 43(4): 838-849, 1999.
40. Hollenberg NK, Fisher ND, and Price DA, Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension.* 32(3): 387-392, 1998.
41. Laragh JH, Lewis K. Dahl Memorial Lecture. The renin system and four lines fo hypertension research. Nephron heterogeneity, the calcium connection, the prorenin vasodilator limb, and plasma renin and heart attack. *Hypertension.* 20(3): 267-279, 1992.
42. Inagami T, The renin-angiotensin system. *Essays Biochem.*, 28: 147-163. 1994
43. Inagami T, A memorial to Robert Tiegerstedt: the centennial of renin discovery. *Hypertension.* 32(6): 953-957, 1998.
44. Williams GH, Fisher ND, Hunt SC, et al., Effects of gender and genotype on the phenotypic expression of nonmodulating essential hypertension. *Kidney Int.* 57(4): 1404-1407, 2000.
45. Urata H, Boehm KD, Philip A, et al., Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest.* 91(4): 1269-1281, 1993.
46. Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, et al., Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem.* 268(33): 24539-24542, 1993.
47. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, et al., Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem.* 268(33): 24543-24546, 1993.
48. de Gasparo M, Husain A, Alexander W, et al., Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension.* 25(5): 924-927, 1995.
49. Cetin A, Ozturk OH, Tokay A, et al., Angiotensin II-induced MAPK phosphorylation mediated by Ras and/or phospholipase C-dependent phosphorylations but not by protein kinase C phosphorylation in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Pharmacology.* 79(1): 27-33, 2007.
50. Zhuo J, Moeller I, Jenkins T, et al., Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J Hypertens.* 16(12 Pt 2): 2027-2037, 1998.
51. Nahmias C and Strosberg AD, The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci.* 16(7): 223-225, 1995.

52. Tamura M, Wanaka Y, Landon EJ, and Inagami T, Intracellular sodium modulates the expression of angiotensin II subtype 2 receptor in PC12W cells. *Hypertension*. 33(2): 626-632, 1999.
53. Ciuffo GM, Alvarez SE, and Fuentes LB, Angiotensin II receptors induce tyrosine dephosphorylation in rat fetal membranes. *Regul Pept*. 74(2-3): 129-135, 1998.
54. Gallinat S, Busche S, Raizada MK, and Sumners C, The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278(3): 357-374, 2000.
55. Nistala R, Whaley-Connell A, and Sowers JR, Redox control of renal function and hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 10(12): 2047-2089, 2008.
56. Krause KH, Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis*. 57(5): 28-29, 2004.
57. Geiszt M, NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res*. 71(2): 289-299, 2006.
58. Hordijk PL, Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res*. 98(4): 453-462, 2006.
59. Sumimoto H, Miyano K, and Takeya R, Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun*. 338(1): 677-686, 2005.
60. Gill PS and Wilcox CS, NADPH oxidases in the kidney. *Antioxid Redox Signal*. 8(9-10): 1597-1607, 2006.
61. Babior BM, NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 16(1): 42-47, 2004.
62. Groemping Y and Rittinger K, Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J*. 386(Pt 3): 401-416, 2005.
63. Cifuentes ME and Pagano PJ, c-Src and smooth muscle NAD(P)H oxidase: assembling a path to hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23(6): 919-921, 2003.
64. Laplante MA and de Champlain J, The interrelation of the angiotensin and endothelin systems on the modulation of NAD(P)H oxidase. *Can J Physiol Pharmacol*. 84(1): 21-28, 2006.
65. Kuru O, Nitrik oksit sentaz inhibisyonuna bağlı hipertansiyon modelinde egzersizin çizgili kas rezistans arter yanıtlarına etkisi, Doktora Tezi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 2006

66. Gunther S, Alexander RW, Atkinson WJ, and Gimbrone MA, Jr., Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 92(2): 289-298, 1982.
67. Çetin A, Kültüre edilmiş rat aortik düz kas hücrelerinde anjiyotensin II uyarımı ile p42/p44 MAPK (ERK1/2) fosforilasyonunda fosfolipaz C ve protein kinaz C'nin rolü, Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 2005
68. Gorlach A, Brandes RP, Bassus S, et al., Oxidative stress and expression of p22phox are involved in the up-regulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets. *FASEB J.* 14(11): 1518-1528, 2000.
69. Çağlar S, Kültüre edilmiş rat aortik düz kas hücrelerinde anjiyotensin II uyarımı ile NAD(P)H sinyal yolu üzerinden p38mitojen aktiviteli protein kinaz (MAPK) fosforilasyonunun gösterilmesi, Uzmanlık Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı, Akdeniz Üniversitesi, Antalya 2005
70. Öztürk OH, Hipergliseminin, kültürde edilmiş rat aortik düz kas hücrelerinde anjiyotensin II uyarımlı JAK2 ve STAT 1 fosforilasyon yoluna etkisi ve bu yolda PDGF- β reseptörünün rolü, Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 2006
71. Akçit F, Rat aortası vasküler düz kas hücrelerinden yapılan primer hücre kültüründe Ang II'nin NAD(P)H oksidaz enzim kompleksi üzerinden süperoksit anyonu üretimine etkisi, Uzmanlık Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 2005
72. de Champlain J, Wu R, Girouard H, et al., Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 26(7-8): 593-601, 2004.
73. Gottlieb RA, Cytochromes P450 and ischemic heart injury: Potential role for inhibitors in the treatment of myocardial infarction. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.* 2(1): 123-127, 2005.
74. Schleicher E, Weigert C, Rohrbach H, et al., Role of glucooxidation and lipid oxidation in the development of atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1043: 343-354, 2005.
75. Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, et al., Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res.* 88(9): 888-894, 2001.
76. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, and Griending KK, p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced

hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 271(38): 23317-23321, 1996.

77. Munzel T, Hink U, Heitzer T, and Meinertz T, Role for NADPH/NADH oxidase in the modulation of vascular tone. *Ann N Y Acad Sci.* 874: 386-400, 1999.
78. Morawietz H, Weber M, Rueckschloss U, et al., Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase subunit gp91phox and impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.* 285(5): 1130-1135, 2001.
79. Wu L and de Champlain J, Superoxide anion-induced formation of inositol phosphates involves tyrosine kinase activation in smooth muscle cells from rat mesenteric artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 259(2): 239-243, 1999.
80. Laplante MA, Wu R, El Midaoui A, and de Champlain J, NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* 21(5): 927-936, 2003.
81. Vaziri ND and Ni Z, Expression of NOX-I, gp91phox, p47phox and P67phox in the aorta segments above and below coarctation. *Biochim Biophys Acta.* 1723(1-3): 321-327, 2005.
82. Touyz RM, Wu XH, He G, Salomon S, and Schiffrin EL, Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 39(2 Pt 2): 479-485, 2002.
83. Cruzado MC, Risler NR, Miatello RM, et al., Vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase activity during the development of hypertension: Effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *Am J Hypertens.* 18(1): 81-87, 2005.
84. Cai H, Griendling KK, and Harrison DG, The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 24(9): 471-478, 2003.
85. Laplante MA, Wu R, Moreau P, and de Champlain J, Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats. *Free Radic Biol Med.* 38(5): 589-596, 2005.

ÖZGEÇMİŞ

Fatih UZUNER, 11.02.1979 tarihinde Antalya’da doğdu. İlkokulu 1990 yılında Antalya Gazi Mustafa Kemal İlkokulu’nda, ortaokulu 1993 yılında Antalya Atatürk Ortaokulu’nda, liseyi 1996 yılında Antalya Lisesi’nde ve lisans öğrenimini de 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde tamamladı. 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir. Yabancı dili İngilizcedir.