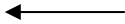
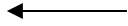


← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

YÜKSEK GLUKOZLU ORTAMDA MİNOSİKLİN'İN DAMAR
YANITLARINA OLAN ETKİSİNDE JNK VE ERK YOLAKLARININ ROLÜ

ÇAĞLA KÖSE

DANIŞMAN
PROF. DR. A. GÖKHAN AKKAN

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2019

Bu çalışma 12.04.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Programı Doktora
Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. A. Gökhan AKKAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Sibel ÖZYAZGAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Hafize UZUN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Aydın BURLAS
Altınbaş Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Ece GENÇ
Yeditepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Çağla KÖSE



İTHAF

Tüm desteğiyle yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum..

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca tüm desteği ile gerek eğitim gerekse sosyal hayatımda tecrübeleriyle sağladığı katkıları için, çok değerli vaktini ihtiyacım olduğu her noktada bana ayırıp ilerlememi kolaylaştırdığı için, saygıdeğer tez hocam bölüm başkanımız *Prof. Dr. A. Gökhan AKKAN*'a,

Yüksek lisansta tezimde danışmanlığımı yapan, farklı projelerde de desteğini ve bilgilerini esirgemeyen, her konuda danışabileceğim kıymetli hocam *Prof. Dr. Sibel ÖZYAZGAN*'a,

Tecrübeleri ile hayatıma katkı sağlayan *Prof. Dr. Okan YILLAR*'a,

Eğitim hayatımdaki katkıları, değerli bilgi paylaşımlarından dolayı *Prof. Dr. Öner SÜZER*'e,

Desteğini ve muhabbetini her zaman yanımda hissettiğim *Prof. Dr. Zeliha YAZICI*'ya,

Değerli bilgileri ve pozitifliği ile motive eden *Prof. Dr. Aydın BARLAS*'a,

Arkadaşlığı, bilimsel desteği, samimiyeti ile her zaman yanımda olan Dr. Öğr. Gör. *Andleeb SHAHZADİ*'ye

Tez çalışmam sürecinde desteğini aldığım sayın *Prof. Dr. Hafize UZUN*'a,

Lisansüstü eğitimimde, tez çalışmalarımda destek aldığım, yardımları ile hep yanımda olan sevgili arkadaşlarım *Dr. İkbal SÖNMEZ*, *Dr. Hande ERDAL*, Vet. Hek. *Tuğçe USKUR* başta olmak üzere tüm bölüm arkadaşlarıma,

Arkadaşlığı ile yanımda hissettiğim, sabırla her koşulda yardımlarını esirgemeyen sevgili sekreterimiz *Esmâ KARAASLAN*'a,

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımları ve işleri kolaylaştıran bilgi ve emek paylaşımlarından dolayı laborantımız *Necmi TÜRKER*'e,

Farmakoloji bölümü çok değerli çalışanları *Faruk ÇAĞMAN* ve *İbrahim KOÇER*'e,

Doktoramda çalışmalarımı ve tezimi tamamlamak için bana gerekli zaman ve fırsatı tanıyan, desteklerini esirgemeyen başta Haliç Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı *Prof. Dr. Feridun VURAL* olmak üzere tüm *Haliç Üniversitesi Tıp Fakültesi Ailesine*,

Hayatım boyunca koşulsuz desteği ile yanımda olan sevgili aileme ve ayrıca tüm yardımları ve katkıları için sevgili eşim *Erdinç Köse*'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 25618

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Diabetes mellitus (DM).....	4
2.1.1. Tip I Diyabet	6
2.1.2. Tip II Diyabet.....	6
2.1.3. Gestasyonel Diyabet	7
2.2. Endotel Yapısı ve Görevleri.....	7
2.3. Endotelyal Disfonksiyon.....	10
2.4. Endotelyal Disfonksiyon Patofizyolojisi	12
2.5. Endotel Disfonksiyonu ve Yüksek Glukoz İlişkisi	13
2.6. Transkripsiyon faktörü (Nükleer Faktör Eritroid 2) ile İlişkili Faktör 2 (Nrf2)	16
2.7. Nrf2 Diyabet İlişkisi	20
2.8. Minosiklin	24
2.9. Minosiklin ve Nrf2 İlişkisi.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Deney Hayvanları	31
3.2. Çalışmada Kullanılan Araç Gereçler	31
3.3. Kimyasal Ajanlar	32
3.3.1. Krebs Çözeltisi.....	32
3.3.2. SP600125 ((Sigma Aldrich, ABD)	33
3.3.3. U0126 (Sigma Aldrich, ABD)	33
3.3.4. Mannitol (Sigma Aldrich, ABD)	34

3.3.5. Asetilkolin (Sigma Aldrich, ABD)	34
3.3.6. Noradrenalin.....	35
3.4. Organ Banyosu.....	35
3.4.1. Organ Banyosu Yüksek Glukoz Metodu	36
3.5. Deneş Protokolü	37
3.5.1. Organ Banyosu Deneyleri	37
3.5.2. Biyokimyasal Ölçümler	41
3.5.2.1. Homojenijasyon İşlemleri	41
3.5.2.2. ELISA Deneyleri.....	42
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. Damar Kasılma ve Gevşeme Yanıtları	44
4.1.1. Damar Gevşeme Yanıtları (Ach)	44
4.1.1.1. Kontrol Grupları Gevşeme Yanıtları Karşılaştırılması	44
4.1.1.2. Tedavi Grupları Gevşeme Yanıtları Karşılaştırılması.....	48
4.1.1.3. İnhibitör Grupları Gevşeme Yanıtları Karşılaştırılması.....	51
4.1.2. Damar Kasılma Yanıtları	54
4.1.2.1. Kontrol Gruplarının Kasılma Yanıtları Karşılaştırılması.....	54
4.1.2.2. Tedavi Grupları Kasılma Yanıtları Karşılaştırılması	57
4.1.2.3. İnhibitör Grupları Kasılma Yanıtları Karşılaştırılması	60
4.2. Biyokimyasal Parametre Ölçümleri (ELISA Deneyleri Sonuçları).....	63
4.2.1. TAS ELISA Ölçüm Sonuçları.....	63
4.2.2. TOS ELISA Ölçüm Sonuçları.....	65
4.2.3. HO-1 ELISA Ölçüm Sonuçları	67
4.2.4. eNOS ELISA Ölçüm Sonuçları	69
4.2.5. ICAM ELISA Ölçüm Sonuçları.....	71
4.2.6. VCAM ELISA Ölçüm Sonuçları	73
5. TARTIŞMA	75
KAYNAKLAR	83
ETİK KURUL KARARI	105
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	106
ÖZGEÇMİŞ	107

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Sağlıklı ve disfonksiyonel endotel farkları	12
Tablo 2-2: Diyabette endotel disfonksiyon.....	15
Tablo 2-3: Nrf2-ARE aktivatörlerinin diyabetik komplikasyonlardaki etkileri	21
Tablo 3-1: Krebs Çözeltisi Kimyasalları	32
Tablo 4-1: Deney Grupları isimleri	44



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1-1: Oksidatif stres (Yüksek Glukoz) ile indüklenen ERK/JNK/Nrf2 yolağı	3
Şekil 2-1: Diyabetin sebep olduğu mikro ve makro hastalıklar (Matzinger, Fischhuber, ve Heiss 2018)	5
Şekil 2-2: Endotelin çeşitli görevleri (Sena, Pereira, ve Seica 2013)	9
Şekil 2-3: Endotel hücreler bir çok fizyolojik fonksiyondan sorumludurlar;	10
Şekil 2-4 Aktivatör moleküller ile Nrf2'nin Keap 1'den ayrılması (de Haan 2011)	17
Şekil 2-5: Oksidatif stres mekanizması (Liu ve ark. 2017)	20
Şekil 2-6: ROS, antioksidan ve Nrf2'nin Denge Rollerini	21
Şekil 2-7: T2D'nin farklı aşamalarında Nrf2-ARE aktivitesi, ROS sinyali iletimi, redoks durumu (Fu ve ark. 2016).	23
Şekil 2-8: Minosiklin ve Ailesi Tetrasiklin'in kimyasal Yapısı	24
Şekil 2-9: Minosiklin'in antibiyotik ve antimikrobiyal etkisi ile ilişkili olmayan klinik potansiyeli (Garrido-Mesa, Zarzuelo, ve Galvez 2013)	26
Şekil 2-10: Minosiklin'in antiinflamatuvar etkisine dahil olan mekanizmalar, antioksidan özellikler	27
Şekil 3-1: SP600125 Kimyasal Yapısı	33
Şekil 3-2: U0126 Kimyasal Yapısı	33
Şekil 3-3: Mannitol Kimyasal Yapısı	34
Şekil 3-4: Asetilkolin Kimyasal Yapısı	34
Şekil 3-5: Noradrenalin Kimyasal Yapısı	35
Şekil 3-6: İzole Organ Banyosu Deney Düzenegi	37
Şekil 3-7: Ratın aorta çıkarılmadan önce sabitlemesi	38
Şekil 3-8: Torasik aortanın kan ve pıhtılardan temizlenme aşaması	39
Şekil 4-1: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 20 Gruplarının %Gevşeme Doz-Yanıt Grafiği	45
Şekil 4-2: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 20 Gruplarının pD2 Grafiği	46
Şekil 4-3: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 20 Gruplarının Emax Grafiği	47
Şekil 4-4: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino20+YG Grupları % Gevşeme Doz-Yanıt Grafiği	48
Şekil 4-5: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino20+YG Grupları pD2 Grafiği	49
Şekil 4-6: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino20+YG Grupları Emax Grafiği	50
Şekil 4-7: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+SP ve Mino10+YG+MIX gruplarının %Gevşeme Doz-Yanıt Grafiği	51
Şekil 4-8: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+SP ve Mino10+YG+MIX gruplarının Gevşeme pD2 Grafiği	52
Şekil 4-9: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+SP ve Mino10+YG+MIX Gruplarının Gevşeme Emax Grafiği	53
Şekil 4-10: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 20 Gruplarının Kasılma Doz-Yanıt Grafiği	54
Şekil 4-11: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 20 Gruplarının Kasılma pD2 Grafiği	55
Şekil 4-12: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 20 Gruplarının Kasılma Emax Grafiği	56
Şekil 4-13: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino20+YG Grupları Kasılma Doz-Yanıt Grafiği	57
Şekil 4-14: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino20+YG Grupları Kasılma pD2 Grafiği ...	58

Şekil 4-15: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino20+YG Grupları Kasılma Emax Grafiği	59
Şekil 4-16: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+SP ve Mino10+YG+MIX Gruplarının Kasılma Doz-Yanıt Grafiği	60
Şekil 4-17: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+SP ve Mino10+YG+MIX Gruplarının Kasılma pD2 Grafiği	61
Şekil 4-18: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+SP ve Mino10+YG+MIX Gruplarının Kasılma Emax Grafiği	62
Şekil 4-19: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 10+YG grupları arası TAS değerleri karşılaştırılması	63
Şekil 4-20: Kontrol, YG, Mino 10+YG, Mino10+YG+SP, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+MIX grupları arası TAS değerleri karşılaştırılması	64
Şekil 4-21: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 10+YG grupları arası TOS değerleri karşılaştırılması	65
Şekil 4-22: Kontrol, YG, Mino 10+YG, Mino10+YG+SP, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+MIX grupları arası TOS değerleri karşılaştırılması	66
Şekil 4-23: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 10+YG grupları arası HO-1 değerleri karşılaştırılması	67
Şekil 4-24: Kontrol, YG, Mino 10+YG, Mino10+YG+SP, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+MIX grupları arası TOS değerleri karşılaştırılması	68
Şekil 4-25: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 10+YG grupları arası eNOS değerleri karşılaştırılması	69
Şekil 4-26: Kontrol, YG, Mino 10+YG, Mino10+YG+SP, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+MIX grupları arası eNOS değerleri karşılaştırılması	70
Şekil 4-27: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 10+YG grupları arası ICAM değerleri karşılaştırılması	71
Şekil 4-28: Kontrol, YG, Mino 10+YG, Mino10+YG+SP, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+MIX grupları arası ICAM değerleri karşılaştırılması	72
Şekil 4-29: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 10+YG grupları arası VCAM değerleri karşılaştırılması	73
Şekil 4-30: Kontrol, YG, Mino 10+YG, Mino10+YG+SP, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+MIX grupları arası VCAM değerleri karşılaştırılması	74
Şekil 5-1: Minosiklin'in olası etki mekanizmaları	82

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- Ach: Asetilkolin
- AGE: Glikasyon son ürünleri
- ARE: Antioksidan yanıt elementi
- CSF: Serebro Spinal Sıvı
- MSS: Merkezi Sinir Sistemi
- DNA: Deoksiribonükleik asit
- EC-SOD: Hücre dışı süperoksit dismutaz
- EC50: Maksimum yanıtın %50'si için gerekli olan ilaç konsantrasyonu
- EDHF: Endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörü
- eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz
- ERK: Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz
- ET-1: Endotelin-1
- FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
- GCL: Glutamat sistein ligaz
- GDM: Gestasyonel diyabetes mellitus
- GR: Glutasyon redüktaz
- GST: Glutasyon S-transferaz
- HIV: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
- HO – 1: Heme oksijenaz – 1
- H₂O₂: Hidrojen peroksit
- ICAM-1: Hücreiçi adezyon molekülü-1
- IDF: Uluslararası Diyabet Vakfı
- iNOS: İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentaz
- IBS: İrritabl bağırsak hastalığı
- Keap 1: Kelch-benzeri ECH-ilişkili protein 1
- JNK: c-Jun N-Terminal Kinaz
- MAPK: Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz

MCP-1: Makrofaj kemoatraktan peptit-1
MI: Miyokard infarktüsü
Mino: Minosiklin
MMPs: Matriks Metaloproteinaz
NA: Noradrenalin
NF- κ B: Nükleer faktör kappa B
NO: Nitrik Oksit
NQO1: NAD(P)H Kinin Oksidoredüktaz 1
Nrf2: Nükleer faktör eritroid-2- faktör 2
NTD: Nöronal tüp defekti
PAI-1: Plazminojen aktivator inhibitörü 1
PARP-1: Poli ADP riboz polimeraz
pD2: Potens (Gücü)
PGI₂: Prostaglandin I₂
PKC: Protein kinaz C
RA: Retinoik asit
RAGE: Glikasyon son ürünleri reseptörü
ROS: Reaktif oksijen radikalleri
RNS: Reaktif azot türleri
SOD: Süperoksit dismutaz
STZ: Streptozotosin
TAS: Total antioksidan
TOS: Total oksidan
T2DM: Tip 2 Diabetes Mellitus
VCAM: Vasküler adezyon molekülü
VSMC: Vasküler düz kas hücreleri
YG: Yüksek glukoz

ÖZET

Köse, Ç. Yüksek Glukozlu Ortamda Minosiklin'in Damar Yanıtlarına Olan Etkisinde JNK ve ERK Yolaklarının Rolü. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Tez çalışmamızda, rat aortasında yüksek glukoz inkübasyonu ile deneysel olarak oluşturulan endotel disfonksiyonun neden olduğu vazoreaktivite bozukluklarına Minosiklin'in etkileri ve bu etkilerde ERK, JNK ve Nrf2 yolaklarının rolü araştırılmıştır.

Wistar Albino rat aortaları izole edilerek gruplara göre normal (11mM) ya da yüksek glukozlu (44mM) Krebs çözeltisinde 2 saat inkübe edilmişlerdir. İnhibitörlü gruplar ise glukozla inkübasyon öncesi 30 dakika inhibitöre maruz bırakılmıştır. Daha sonra izole preparatlarda kasılma ve gevşeme yanıtları organ banyosu düzeneğinde değerlendirilmiştir. ELISA yöntemi ile de biyokimyasal parametreler (ICAM, VCAM, TAS, TOS, eNOS, HO-1) ölçülmüştür.

Gevşeme yanıtlarında yüksek glukozlu grupların Emax verileri kontrole göre anlamlı olarak düşükken ($p<0,0001$) Minosiklin ile tedavi edilen grupların Emax değerleri kontrol seviyelerine geri dönmüştür (YG grubuna göre; $p<0,001$). JNK inhibitörü SP600125 grubunun Emax yanıtı da yüksek glukoz grubu gibi kontrolden anlamlı olarak düşüktür ($p<0,001$).

Kasılma yanıtlarının Emax değerleri yüksek glukoz grubunda kontrolden anlamlı olarak yüksekken ($p<0,01$), tedavi gruplarında düşmüştür (YG grubuna göre; $p<0,0001$). SP600125 grubunda ise yüksek glukozlu grup ile benzer şekilde Emax değeri yüksektir ($p<0,001$).

Yüksek glukoz grubunun eNOS ($p<0,05$) ve TAS ($p<0,001$) verileri kontrole göre düşükken, HO-1 ($p<0,001$) ve TOS ($p<0,05$) değerleri yüksektir. Minosiklin ile tedavi bu biyokimyasal değişiklikleri kontrol değerlerine geri döndürmüştür. SP600125 grubunda ise tüm biyokimyasal veriler yüksek glukoz grubu ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre; Minosiklin'in tedavi edici etkisinde özellikle JNK yolağı ile eNOS/NO yolağının önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Minosiklin, Yüksek Glukoz, Nrf2, JNK, Rat Aorta

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 25618

ABSTRACT

Köse, Ç. The Role of JNK and ERK Paths in the Effect of Minocycline on Vascular Responses in a High Glucose Medium. Istanbul University - Cerrahpasa Institute of Graduate School, Medical Pharmacology and Clinical Pharmacology Department Doctoral Thesis, Istanbul.

In this study, the effect of minocycline and role of ERK, JNK and Nrf2 pathways were investigated on endothelial dysfunction and vaso-reactivity disorders induced by high glucose incubation of rat aorta.

Wistar Albino rat aortas were isolated and incubated for 2 hours in normal (11mM) or high glucose (44mM) Krebs solution. Inhibitor groups were exposed to respective inhibitors for 30 minutes before glucose incubation. Contraction and relaxation response of isolated preparations were investigated through organ bath. Biochemical parameters (ICAM, VCAM, TAS, TOS, eNOS, HO-1) were measured via ELISA technique.

Emax data was found to be significantly low at relaxation response in high glucose group in comparison to control group ($p < 0.0001$) whereas, minocycline treatment returned Emax values to normal (compared to high glucose group; $p < 0.001$). Emax response of SP600125 (JNK inhibitor) group was low just like high-glucose group ($p < 0.001$) in comparison to control.

Emax values of contraction response for high glucose group were high ($p < 0.01$) compared to control and were low in treatment group (compared to high-glucose; $p < 0.0001$). Emax values in SP600125 group were found to be similar with high-glucose group ($p < 0.001$).

For high glucose group, eNOS ($p < 0.05$) and TAS ($p < 0.001$) values were low and HO-1 ($p < 0.001$) and TOS ($p < 0.05$) values were high compared to control group. Minocycline treatment returned these values to normal. Whereas, SP600125 and high glucose group shared the similar biochemical profile.

In conclusion, it is observed that JNK and eNOS/NO pathways have an important role on Minocycline's treatment effect.

Keywords: Minocycline, high glucose, Nrf2, JNK, Rat Aorta

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet, dünya nüfusunun ciddi bir bölümünü etkileyen hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Yaklaşık 500 milyon yetişkin diyabetliken sadece 2 kişiden biri tedavi görmektedir. IDF (Uluslararası Diyabet Örgütü) verilerine göre 2040 yılında 10 yetişkinden birinin diyabetli olacağı düşünülürken, diyabet için ayrılan bütçenin 802 milyon doları aşacağı öngörülmektedir (IDF).

Diyabet, vücudun sadece belirli bölgesine etki gösteren bir hastalık olmayıp, birçok organda olumsuz etkileri gözlenmektedir. Diyabete bağlı nefropati, retinopati yarattığı hasarlardan bazılarıdır. Aynı zamanda kardiyovasküler sistem üzerinde de diyabetin hasar oluşturucu etkileri fazladır (Davignon ve Ganz 2004). Diyabet hastalarında MI (miyokard infarktüs) riskinin diğerlerine göre çok daha fazla olması, endotel hasarı gibi dolaşımsal sıkıntılar gözlenmektedir. Gözlenen endotel hasarı, oksidatif stres sonucu ortaya çıkmaktadır (Kaur, Kaur, ve Singh 2018).

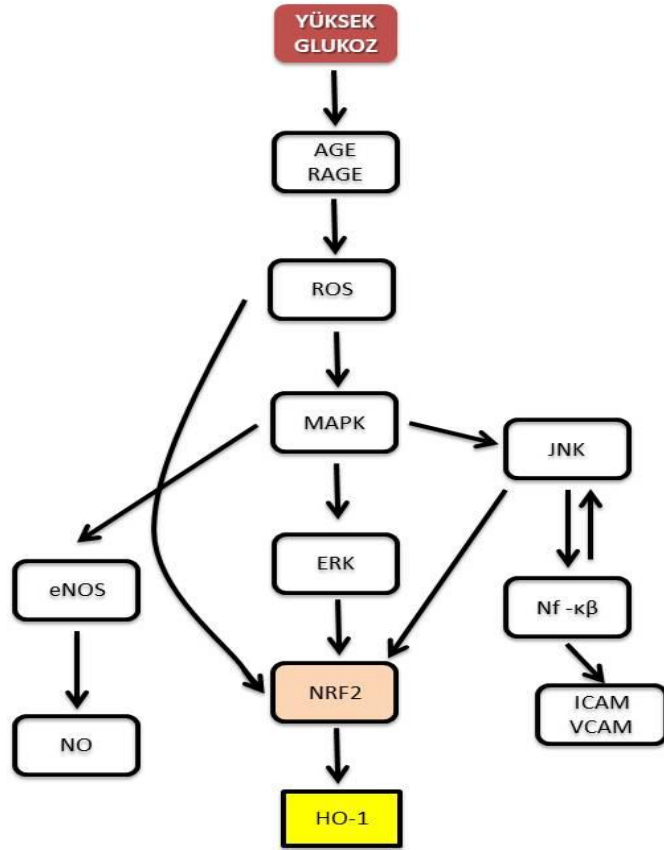
Hiperglisemide nitrik oksit (NO) sentezi azalmakta ve endotelde reaktif oksijen türleri (ROS) artmaktadır (Son ve ark. 2004; Reyes-Toso ve ark. 2002). Reaktif oksijen türlerinin artmasıyla oksidan etki gözlenir ve DNA, enzim ve endotel hücre membranı hasarı görülür, bu da endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır (Sies ve Cadenas 1985). Bu durumda hücre savunma mekanizması ile antioksidan mekanizmalar aktive olmaktadır. ROS artışı Mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) mekanizmasını indükleyerek protein kinaz c (PKC), ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) ve c-jun N-terminal kinaz (JNK) yollarını aktive eder. Bu yollar ile antioksidan etkisi olan Nükleer factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) bağlı olduğu Keap1 proteininden ayrılarak aktive olur. Nrf2 aktivasyonu; NADP-H:quinone oxidoreductase (NQO-1), heme oxygenase 1 (HO-1) gibi antioksidan enzimlerin sentezini arttırmakta (Huang ve ark. 2015; Zhu ve Fahl 2001; Nguyen, Huang, ve Pickett 2000) ve vücudun savunma mekanizması devreye girmektedir.

Minosiklin, tetrasiklin grubundan bir antibiyotiktir. Yapılan son çalışmalar minosiklinin hücrede apoptozu önlediği, inflamasyonu inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Wang ve ark. 2004). Minosiklin'in ayrıca endojen Nrf2 ekspresyonunu arttırarak antioksidan etkiyle oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (Shahzad ve ark. 2016).

İzole organ banyosu Farmakolojide sık kullanılan deney yöntemlerinden biridir. Sıçan torasik aortası çıkarılarak organ banyosu düzeneğinde çeşitli ilaç denemeleri, kasılma-gevşeme yanıtlarına göre mekanizmasal araştırmalar yapılmaktadır (Altınok ve ark. 2015). İzole sıçan aortalarının akut yüksek glukoza maruz bırakılmaları, diyabette oluşan stres benzeri etki yaratan ve endotel hasarını gösteren bir yöntem olarak tercih edilmektedir. Yüksek glukozun yarattığı oksidatif stres, farklı mekanizmalara bağlı endotel hasar oluşumu model olarak kullanılmaktadır (He ve ark. 2009). Yüksek glukoza akut olarak maruz kalmak diyabetin damarda yarattığı hasar benzeri etki göstererek, asetilkolinin endotel-bağımlı damar gevşeme yanıtlarını azaltmaktadır (Guo ve ark. 2000). Aynı şekilde endotel-bağımlı kasılma yanıtlarında da azalma ya da artma gibi iki şekilde de değişim gözlenmektedir (El-Awady ve ark. 2014).

Bu çalışmada, sıçan ortaları yüksek glukozlu ortamda inkübe edilerek endotel disfonksiyonu oluşturulmuş ve oluşan disfonksiyonun vazoreaktivite üzerine etkilerini göstermek için damarlarda kasılma-gevşeme yanıtları incelenmiştir. Endotel disfonksiyonu ayrıca hücre içi adhezyon molekülü-1 (ICAM), vasküler adhezyon molekülü (VCAM) gibi adhezyon molekülleri, total antioksidan (TAS), toktal oksidan seviye (TOS), hemeoksijenaz 1 (HO-1) gibi oksidan-antioksidan ile endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) gibi biyokimyasal parametreler ELISA yöntemi ile ölçülerek de ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bütün bu damar yanıtları ve biyokimyasal parametrelere minosiklinin etkisi araştırılmıştır. Son olarak ERK ve JNK yolaklarının inhibitörleri olan U0126 ve SP600125 kullanılarak Minosiklin'in gösterdiği etkilerde Nrf2 yolağının rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızın olası mekanizmaları Kegg Pathway Database sitesindeki yollardan yararlanılarak aşağıda grafik üzerinde de gösterilmiştir (Şekil 1-1).



Şekil 1-1: Oksidatif stres (Yüksek Glukoz) ile indüklenen ERK/JNK/Nrf2 yolağı

Kegg pathway database sitesinden yararlanılarak hazırlanmıştır (*kegg pathway*).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes mellitus (DM)

Diyabet, pankreasın yeterince insülin üretmediği ya da üretilen insülinin vücut tarafından etkin bir şekilde kullanılmadığı durumda ortaya çıkan kronik bir hastalıktır. İnsülin, vücut kan şekeri düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Hiperglisemi durumu, zamanla vücuttaki birçok sisteme, sinir hücrelerine ve kan damarlarına ciddi zararlar vermektedir.

Yıllara göre WHO verilerine bakıldığında; 2014 yılında 18 yaş üstü erişikilerin %8,5'inde diyabet görülmekteydi. 2016 yılında 1,6 milyon ölümün direkt olarak nedeni diyabet olarak belirtilmiştir (WHO 2019).

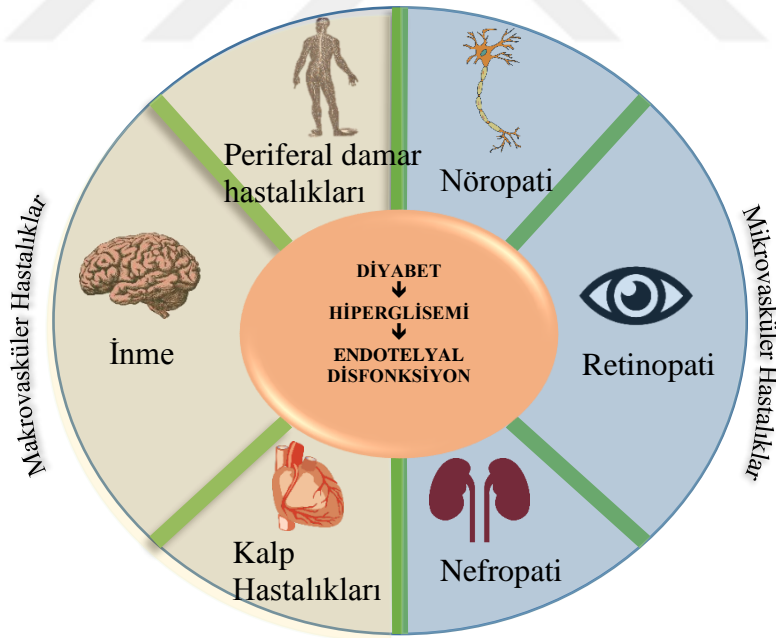
Diyabetes Mellitus gelişimindeki risk faktörlerine bakıldığında;

- Bozulmuş açlık glukozu, bozulmuş glukoz toleransı,
- Diyabetli birinci derece yakının bulunması (Stumvoll, Goldstein, ve van Haeften 2005),
- Etnik köken (Menke ve ark. 2015; Shai ve ark. 2006),
- Obezite (Menke ve ark. 2014),
- Sedanter yaşam (Crump ve ark. 2016),
- Sigara (Willi ve ark. 2007),
- Polikistik over sendromu (Ehrmann ve ark. 1999),
- Hipertansiyon (Conen ve ark. 2007),
- Kardiyovasküler hastalık (Mozaffarian ve ark. 2007)
- Metabolik sendrom (Ford, Li, ve Sattar 2008) şeklinde faktörler sayılabilmektedir.

Diyabetes Mellitusun genel sonuçlarına bakıldığında ise;

- Diyabetli yetişkinlerde kalp krizi ve inme riski 2-3 kat daha fazladır (Emerging Risk Factors ve ark. 2010)
- Kan akışının azalmasıyla, ayaklardaki nöropati; ayak ülseri riskini artırır, enfeksiyon ve sonucunda amputasyona sebep olabilir.
- Diyabetik retinopati körlüğün önemli bir nedenidir ve retinadaki küçük kan damarlarındaki hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkar. Global körlüğün %2,6'sı diyabete bağlanabilir (Bourne ve ark. 2013).
- Diyabet, böbrek yetmezliğinin önde gelen sebepleri arasındadır (Saran ve ark. 2015).

Diyabet, vasküler komplikasyonlar ile de ilgilidir. Kronik hiperglisemi özellikle endotel ve sinir hücreleri için zararlıdır. Bu hücrelerde meydana gelen fonksiyon bozuklukları, temel olarak diyabet hastalarının yaşadığı mikro ve makro vasküler komplikasyonların artması riskini oluşturur (Matzinger, Fischhuber, ve Heiss 2018) (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Diyabetin sebep olduğu mikro ve makro hastalıklar (Matzinger, Fischhuber, ve Heiss 2018)

2.1.1. Tip I Diyabet

Önceleri çocukluk diyabeti, insüline bağımlı diyabet olarak bilinmekte olan diyabet çeşididir. Pankreasın az insülin ürettiği ya da üretmediği durumlarda geçerlidir. Vücutta eksik insülin üretimi ile karakterizedir. Tip I diyabet, genellikle çocukluk çağından itibaren görülse de yetişkin dönemde de gelişebilir. Tip I diyabet hastaları, kandaki glukoz miktarını düzenlemek için günlük dışarıdan insülin uygulamasına ihtiyaç duyarak hayatlarına devam ederler. İnsülin, glukozun enerji vermek üzere hücrelere girişini sağlayan hormondur.

Tip I diyabetin kesin sebebi bilinmemekle birlikte önlenemez durum da değildir. Tedavi komplikasyonlarını önlemek için kan şekeri seviyesi, diyet, yaşam tarzı, insülin ile dengede tutulmaya çalışılır (WHO 2019; Clinic 2019).

2.1.2. Tip II Diyabet

Tip II diyabet (daha önceleri insüline bağımlı olmayan olarak adlandırılırdı), vücudun pankreas tarafından üretilen insülinin etkisine uygun şekilde cevap verememesinden kaynaklanır. Vücut insüline dirençli hale gelir ya da pankreas tarafından yeterince insülin salgılanamamaya başlar. Yani insülin direnci ve beta hücre disfonksiyonu durumlarını içeren patofizyolojiye sahiptir (Stumvoll, Goldstein, ve van Haeften 2005). Hastalarda kademeli olarak hiperglisemi olduğundan diyabetin semptomları başta görülmeyebilir. Semptomlar görülme bile, hastada mikro ve makrovasküler komplikasyonlar görülebilir, komplikasyonları önlemek için teşhis edilmesi büyük önem taşımaktadır (American Diabetes 2018). Neden gerçekleştiği tam olarak bilinmemekle beraber, genetik, aşırı kilolu ve inaktif olmak gibi faktörler de çevresel faktörler gibi sebebinde rol oynamaktadır. Tip II diyabet, Tip I'e göre çok daha yaygındır ve dünya genelindeki diyabet vakalarının %90'ını oluşturur. Yetişkinlerde çok sık görülürken ergenlerde de giderek artış gösterdiği dikkat çekmektedir (WHO 2019; Martinez, Sherling, ve Holley 2019).

2.1.3. Gestasyonel Diyabet

Gestasyonel diyabet, gebelik sırasında kan şekeri değerlerinin normalin üstünde olan diyabet tanısı altındaki hiperglisemidir. Gebelik diyabeti olan kadınlar, hamilelik ve doğum sırasında komplikasyon riski altındadır. Ayrıca anne ve bebek de gelecekte tip II diyabet riski altındadır (Group 2002). Gebelik diyabeti, bildirilen semptomlar yerine doğum öncesi tarama ile teşhis edilir (WHO 2019).

Gestasyonel diyabetes mellitus (GDM) gebeliklerin yaklaşık %5'inde görülür, ancak populasyonun demografik özelliklerine ve kullanılan kriterlere bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterir. Gittikçe artan şişmanlık problemi devam ettikçe prevalansın artması beklenmektedir (Ben-Haroush, Yogev, ve Hod 2004). GDM'den etkilenen gebeliklerde yenidoğan hipoglisemisi, hiperbilirinemi gibi risk faktörleri artmaktadır (Catalano ve Ehrenberg 2006). Bu nedenle GDM'un teşhisi anne ve bebek için de büyük önem taşımaktadır (Kampmann ve ark. 2015).

2.2. Endotel Yapısı ve Görevleri

Endotel, damarların kan lümen yüzeyini kaplayan bir hücre tabakasıdır. Endotel, ilk olarak 1980 yılında, “damar duvarının iç yüzünü örten ve damar tonusunu düzenleyen doku” olarak tanımlanmıştır (Furchgott ve Zawadzki 1980). 1980'lerden önce elektrolit ve su geçişi için seçici geçirgen özellikte damar yüzeyini saran astar olarak düşünülmüştür. Yapılan çalışmalar, endotel hücrelerinin kalpten kılcal damarlara kadar tüm vasküler sistemde, damar yüzeylerinde etkili, önemli fonksiyonlara sahip bir endokrin organ olduğunu göstermektedir. Bunlardan bazıları;

- Böbrek glomerüllerindeki gibi sıvı filtrasyonu
- Platelet lökosit etkileşimi
- Koagülasyon mekanizması
- Vasküler tonus ve büyüme regülasyonu kontrolü
- Hemostazis
- Hücre proliferasyonu ve anjiogenezis
- Hormon trafiği

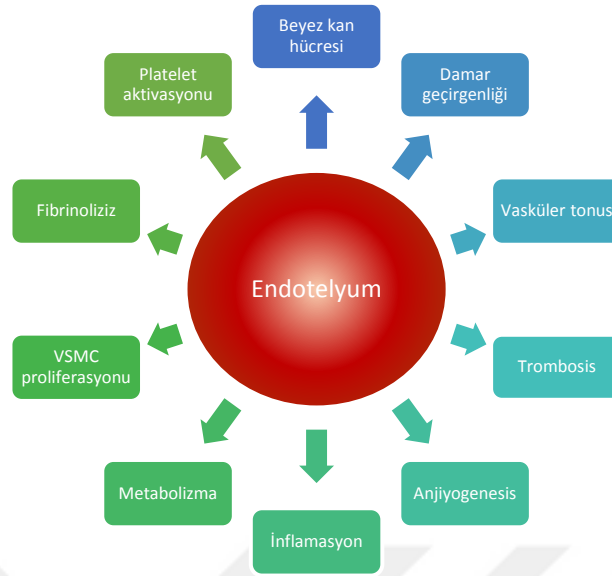
- İnflamasyon durumunda sitokin salınması
- Damar kasılma-gevşeme yanıtları
- Tromboz, tromboliz gelişim kontrolü şeklinde sıralanabilir.

Endotelin rolü; proteinler, lipit taşıyan parçacıklar, metabolitler ve hormonların yanı sıra hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini yöneten spesifik proteinler ve reseptörler dahil olmak üzere çeşitli moleküller için membrana bağlı reseptörlerin varlığıyla gerçekleştirilmesidir (Anderson 1999; Feletou 2011; Feletou ve Vanhoutte 2006).

Endotel hücreleri ayrıca kan akışını düzenlemede önemli bir rol oynar. Plazma ve hücresele bileşenlerin damar yayılımı boyunca geçişini kolaylaştıran antitrombotik yüzey oluşturma kapasitesi ile kanın laminer akışını sağlar.

İnflamasyon, oksidatif stres gibi durumlarda meydana gelen problemler endotelin normal aktivitesinin bozulmasına sebep olur. Endotel, hücrelerin protrombotik ve antifibrinolitik bir ortam oluşturmaya sebep olur. Kan akışı da kısmi olarak endotel tarafında vasküler yatakları daraltmak veya genişletmek için salgılanan ya da emilen vazoaktif maddeler ile düzenlenmektedir.

Vasküler homeostazın önemli bir regülatörü olan endotel, vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon arasındaki dengeyi, migrasyonun engellenmesi ve ilerletilmesini ve düz kas hücrelerinin proliferasyonunu, fibrinolizi ve trombojenezini ve aynı zamanda trombositlerin adezyon ve agregasyonunun önlenmesi ve stimülasyonunu sağlar (Sena, Pereira, ve Seica 2013). Vazodilatör ve antiproliferatif etki gösterir (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Endotelin çeşitli görevleri (Sena, Pereira, ve Seica 2013)

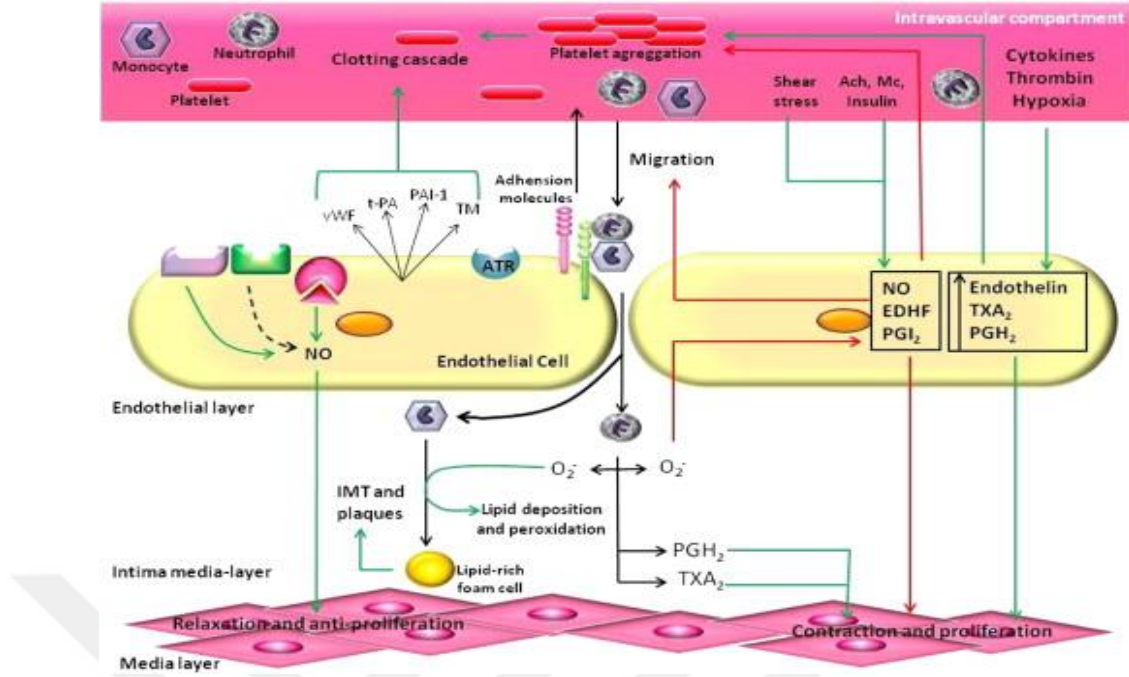
Endotel kaynaklı faktörlere bakıldığında;

- Endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörü (EDHF) (Chen, Suzuki, ve Weston 1988)
- Nitrik oksit (NO) (Ignarro ve ark. 1987)
- Prostaglandin (PGI₂) (Moncada ve ark. 1976)
- Endotelin-1 (ET-1) (Yanagisawa ve ark. 1988)
- Anjiyotensin II (Endemann ve Schiffrin 2004)
- Reaktif oksijen türevleri (ROS) (Just, Whitten, ve Arendshorst 2008)

vazokonstriktör etki gösteren mediyatörlerdir.

Endotelyal hücreler ayrıca hem antitrombotik (NO ve PGI₂ hem trombosit agregasyonunu inhibe eder) hem de protrombotik molekülleri trombosit agregasyonunu destekleyen Willebrand faktörü ve fibrinolizi inhibe eden plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) üretirler (Feletou 2011) (Şekil 2-3).

Bu dengenin bozulması, endotel disfonksiyonuna yol açmaktadır.



Şekil 2-3: Endotelial hücreler birçok fizyolojik fonksiyondan sorumludurlar;

- 1- Vazodilatör ve vazokonstriktörler ile vasküler tonusun düzenlenmesi
- 2- Trombosit aktivitesi, pıhtılaşma kaskadı ve fibrinolitik sistemi düzenleyen faktörler ile kan akışkanlığı ve pıhtılaşma kontrolü
- 3- Sitokin ve adhezyon moleküllerin ekspresyonu yoluyla inflamatuvar süreçlerin regülasyonu (Ach, ATR, BK, EDHF, NO, PAI-1, PGH₂, PGI₂, O₂⁻, t-PA, TM, TxA₂, vWf).

2.3. Endotelial Disfonksiyon

Endotelial disfonksiyon, endotelium aktivitesinin azalmış vazodilatasyon, proinflamatuvar duruma ve protrombik özelliklere kayması durumu ile karakterizedir. Hipertansiyon, koroner arter hastalığı, kronik kalp yetmezliği, periferik arter hastalığı, diyabet ve kronik böbrek yetmezliği gibi birçok kardiyovasküler hastalık ile ilişkilidir. Endotelial disfonksiyonda azalmış vazodilatatör cevaplara katılan mekanizmalar arasında nitrik oksit üretimi, oksidatif fazlalık ve hiperpolarize edici faktörün azalmış üretimi sayılabilir. Adezyon moleküllerinin upregülasyonu, makrofaj kemoreatraktan peptit-1 gibi kemokinlerin üretimi ve plazminojen aktivatör inhibitör-1'in üretimi inflamatuvar tepkiye katılır ve protrombik duruma katkıda bulunur. Endotel disfonksiyonu, aterosklerozun patogenezinde önemli bir erken olaydır ve plağın başlangıcına ve ilerlemesine katkıda bulunur.

Endotel disfonksiyon şiddetinin, kardiyovasküler olaylar için prognostik değere sahip olduğu gösterilmiştir. Endotel disfonksiyonunun düzeltilmesi kardiyovasküler riskin azalmasıyla ilişkili olabilir. Dolaşımdaki endotelial progenitör hücreler, endotelial disfonksiyona potansiyel bir terapötik yaklaşım için kullanılabilir (Endemann ve Schiffrin 2004).

En erken aşamalarda, ana endotelial değişiklik sadece fonksiyoneldir. Vasküler endotelial fonksiyonel bozukluğu, tüm kardiyovasküler hastalıklarda ve ayrıca insülin direnci, obezite ve tip 2 diyabetlilerde bulunmaktadır (Endemann ve Schiffrin 2004; Wheatcroft ve ark. 2003). Endotelial disfonksiyonun ayırt edici özelliği bozulmuş NO biyoyararlanımıdır.

Ayrıca endotelial disfonksiyon, aşağıdaki özelliklerin bir veya daha fazlasıyla karakterize edilir (Taddei ve ark. 2003; Cade 2008; Hirose ve ark. 2010) (Tablo 2-1):

- Endotel aracılı gevşeme yanıtlarının azalması,
- Hemodinamik düzenlemelerin azalması,
- Fibrinolitik yeteneğin bozulması,
- Büyüme faktörlerinin aşırı üretimi,
- Adhezyon molekülleri ve inflamatuvar gen ekspresyonunun artması,
- ROS artışı,
- Oksidatif stres artışı,
- Hücre katmanlarının geçirgenliğinin artması

Endotel disfonksiyonuna birçok risk faktörü doğrudan katkıda bulunmaktadır. Risk faktörlerine baktığımızda;

- Yüksek LDL, düşük HDL kolesterol seviyeleri (hiperlipidemi)
- Yüksek trigliserit seviyeleri
- Hipertansiyon
- Yüksek c-reaktif protein (CRP) seviyeleri
- Yüksek omega6/omega3 oranı
- Artmış homosistein değerleri
- Sigara kullanımı

- Yetersiz D vitamini seviyeleri birçok risk faktöründen bir kısmı olarak sayılabilir.

Endotel disfonksiyonunun varlığı ateroskleroz ve tromboz patogenezinde, hem koruyucu kabiliyetinin kaybı hem de protrotrombotik mekanizmaların uyarılmasında rol oynamaktadır (Versari ve ark. 2009; Grover-Paez ve Zavalza-Gomez 2009).

Tablo 2-1: Sağlıklı ve disfonksiyonel endotel farkları

Sağlıklı Endotelyum	Disfonksiyonel Endotelyum
<ul style="list-style-type: none"> • Vazodilatasyon (↑ NO, PGI₂) • ↓ Oksidatif stres, düşük ürik asit • Anti-koagülant (↓ PAI-1, vWF, P-selektin) • Anti-inflamatuvar (↓ , sICAM, sVCAM, E-seleksiyon, CRP, TNF-a, IL-6, MCP-1) • ↑ Tamir (ECPs), ↓ tahrip (CECs, MPs) 	<ul style="list-style-type: none"> • Vazodilatasyon (↓ NO, PGI₂) • ↑ Oksidatif stres, ürik asit • Pro-koagülant (↑ PAI-1, vWF, P-selektin) • Pro-inflamasyon (↑ , sICAM, sVCAM, E-seleksiyon, CRP, TNF-a, IL-6, MCP-1) • ↓ Tamir (ECPs), ↑ tahrip (CECs, MPs)

2.4. Endotelial Disfonksiyon Patofizyolojisi

Endotel disfonksiyonun patofizyolojisi karmaşıktır ve çoklu mekanizmalar ile gerçekleşir. Bunun yanı sıra, görülen mekanizmaların çoğu diğer hastalıklarla da ortak olarak görülmektedir.

Endotelyum tarafından salınan, vazodilatör olarak aktivite gösteren, inflamasyonu önleyen ve trombositler üzerinde anti agregan etkileri olan NO'dur. Azalmış NO seviyeleri, bozulmuş endotel fonksiyonu durumlarında sıkça bildirilmiştir. Bu durum endotelial NO sentezinin (eNOS; endojen veya eksojen inhibitörlerin bir sonucu olarak veya substratın varlığındaki azalma) ya da biyoyararlanımının azalmasından kaynaklı olabilmektedir (Endemann ve Schiffrin 2004).

ROS'un sitotoksik oksidan olan peroksinitrit ile NO'yu baskıladığı ve protein fonksiyonunu etkilediği, bu şekilde endotel disfonksiyonu da etkilediği bilinmektedir (Koppenol ve ark. 1992). Peroksinitrit, proaterojenik olarak LDL oksidasyonunda önemli bir araçtır. Ayrıca eNOS kofaktörünün bozulmasına sebep olarak eNOS ayrılmasına yol açar (Milstien ve Katusic 1999).

Diyabetik farelerde peroksinitritin bozulmasını sağlayan FP15 maddesi denendiğinde endotel ve kardiyak disfonksiyonun önlenebileceği gösterilmiştir (Szabo ve ark. 2002). Bu şekilde endotel disfonksiyon üzerinde ROS etkisi de gösterilmiştir.

Oksidasyon durumu arttığında, eNOS aktif dimerinin oksijenaz aktivitesi ve dolayısıyla NO üretimi azalır. eNOS'un redüktaz formu aktive olur ve daha çok ROS üretimi gerçekleşir. NO yerine ROS üretimi gerçekleştiği için oksidan fazlalığı, endotel ve vasküler fonksiyon üzerinde zararlı etkiler meydana getirir (Landmesser ve ark. 2003). Oksidatif artış, damar duvarındaki proinflatuar süreç ile bağlantılıdır. ROS, adhezyon (ICAM-1 ve VCAM-1) ve kemotaktik moleküllerin (MCP-1) üretimini upregüle eder. İnflamasyon, NO biyoyararlanımını azaltır. C-reaktif proteinin (CRP) de eNOS aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Venugopal ve ark. 2002).

2.5. Endotel Disfonksiyonu ve Yüksek Glukoz İlişkisi

Diyabette, bazı mekanizmalar endotel disfonksiyonunu tetikleyebilir. Tip 2 diyabet (T2DM) gibi insülin direnci durumlarında, insülin sinyali değiştirilir ve insülin reseptöründen çıkan iki ana yolu farklı şekilde etkiler. Fosfoinositid 3-kinaz, fosfoinositide bağımlı kinaz-1 ve Akt / protein kinaz B üzerinden eNOS'un fosforilasyonu ve aktivasyonuna giden yol downregüle edilirken, MAPK yoluyla mitojenik etkilere giden yol ve büyüme etkilenmez. Dahası, hiperglisemi, endotel disfonksiyona sebep olması, aminoguanidin ile glikozilasyonu inhibe ettiği gibi AGE'ye de yol açar (Bucala, Tracey, ve Cerami 1991). AGE, interlökin-6, VCAM-1 ve MCP-1'in ekspresyonu ile ROS'u indükler ve vasküler inflamasyon oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Zhang ve ark. 2003). Bu durum, diyabetik nefropatide kısır döngüye dönüşmektedir, çünkü böbrek yetmezliğinde, AGE'nin klerensi gecikir, bu durum da vasküler hasar ve böbrek hasarını artırır (Makita ve ark. 1991). Akut hipergliseminin

kendisi NO'yu azaltabilir ve insanlarda *in vivo* endotel bağımlı vazodilatasyonunu azaltabilir sonucuna varılmaktadır (Williams ve ark. 1998).

Çeşitli çalışmalarda, endotel fonksiyonunun, hem makro hem de mikro-vasküler komplikasyonlarda, hayvan modellerinde ve insan çalışmalarında uzun süreli, geçici ve akut hiperglisemiye bağlı ortaya çıktığı gösterilmiştir (Grassi ve ark. 2012; Kaur, Kaur, ve Singh 2018). Mikro vasküler komplikasyonlar, makro-vasküler komplikasyonlarla karşılaştırıldığında daha yoğun olduğu görülmektedir (Skyler ve ark. 2009). Hipergliseminin, NO biyoyararlanımı ve ROS birikimi ile reaktif azot türlerinin (RNS, endotel disfonksiyonuna yol açar) birikmesi arasında dengesizlik yaratarak damar hasarını tetiklediği düşünülmektedir. Ayrıca hiperglisemi (Brownlee 2005);

- çeşitli hücrel mekanizmalarla vasküler yatağa zarar vermektedir.
- AGE'lerin fazla üretimine sebep olmaktadır.
- AGE reseptörlerinin (RAGE) ekspresyonlarında artışa sebep olmaktadır.
- heksozamin yolağının aşırı aktivasyonuna sebep olmaktadır.
- Protein kinaz C aktivasyonuna sebep olmaktadır.

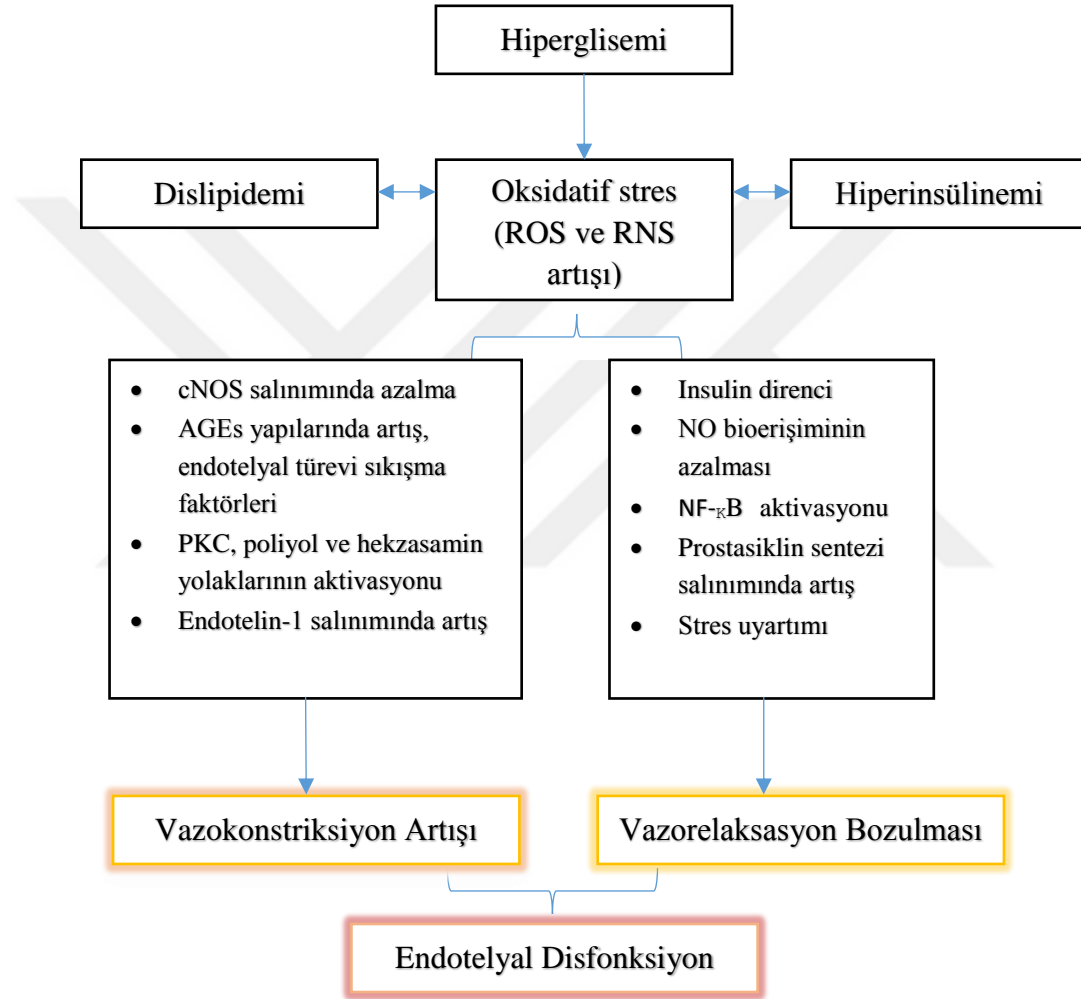
Altta yatan ana sebep oksidatif streştir.

Ayrıca, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, kronik oksidatif stres seviyelerinin insülin direnci ve T2DM'nin yol açtığı ilk anormallikler arasında olduğunu göstermiştir (Kuroki ve ark. 1996; Vincent ve ark. 2004) (Tablo 2-2).

Artan ROS, glikol metabolizmasını glikolizle bozar ve alternatif poliol ve heksozamin yolları ile değişime sebep olur (Brownlee 2001). Ayrıca, hipergliseminin aracılık ettiği oksidatif stres, nükleer poli (ADP-riboz) polimerazın (PARP) aktivasyonu ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz aktivitesinin azaltılmasıyla DNA hasarını ve ADP-riboz polimerinin üretimini indükler. Bunun sonucunda, yukarıda bahsedilen çeşitli zarar verme mekanizmalarını tetikleyen glikolitik ara maddelerin seviyelerini artırır. Bu mekanizmaların genel sonuçları artmış vasküler geçirgenlik, oksidatif stres ve apoptozdur. Hiperglisemi ayrıca düşük dereceli vasküler inflamasyona aracılık eden nükleer faktör- κ B'yi (NF- κ B) aktive eder (Brownlee 2005; Creager ve ark. 2003; D'Souza ve ark. 2009). Ayrıca, NF- κ B aktivasyonu, vasküler duvarda inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ile sonuçlanan vasküler adezyon moleküllerinin, sitokinlerin

üretiminin artmasına yol açar. Ek olarak, glukotoksisite, protrombotik bir duruma yol açan, PAI-1 gibi pıhtılaştırıcı doku faktörlerinin ekspresyonunun artmasına neden olur. Hiperglisemi ile birlikte dislipidemi ve hiperinsülinemi de vasküler ton düzenleyicilerin dengesizliği yoluyla vasküler tonu etkilemektedir (Potenza ve ark. 2009).

Tablo 2-2: Diyabette endotel disfonksiyon



AGE'lerin oluşumu ayrıca matriks bileşenlerinin yapısal, fonksiyonel ve reseptör tanıma özelliklerinin değişmesine neden olur. AGE reseptörü RAGE'ye bağlanma, makrofaj kaynaklı vasküler inflamasyonu teşvik eden süperoksit üretimini artırır (Schmidt ve ark. 1999; Wautier ve ark. 2001; Chavakis, Bierhaus, ve Nawroth 2004). AGE'ler ayrıca eNOS ekspresyonunda azalmayı bunun yanında NO sentezinde azalmayı, ET-1 ekspresyonunda artışı indüklerken endotel disfonksiyona yol açar. Bu nedenle, hiperglisemik koşullarda AGE, ROS, RNS, 3-deoksiglukozon, diaçilgliserol ve metilglioksal gibi çeşitli biyokimyasal ürünlerin oluşumundaki değişiklikler diyabetik hastalarda endotel disfonksiyonuna belirgin bir katkıda bulunur (Sena, Pereira, ve Seica 2013).

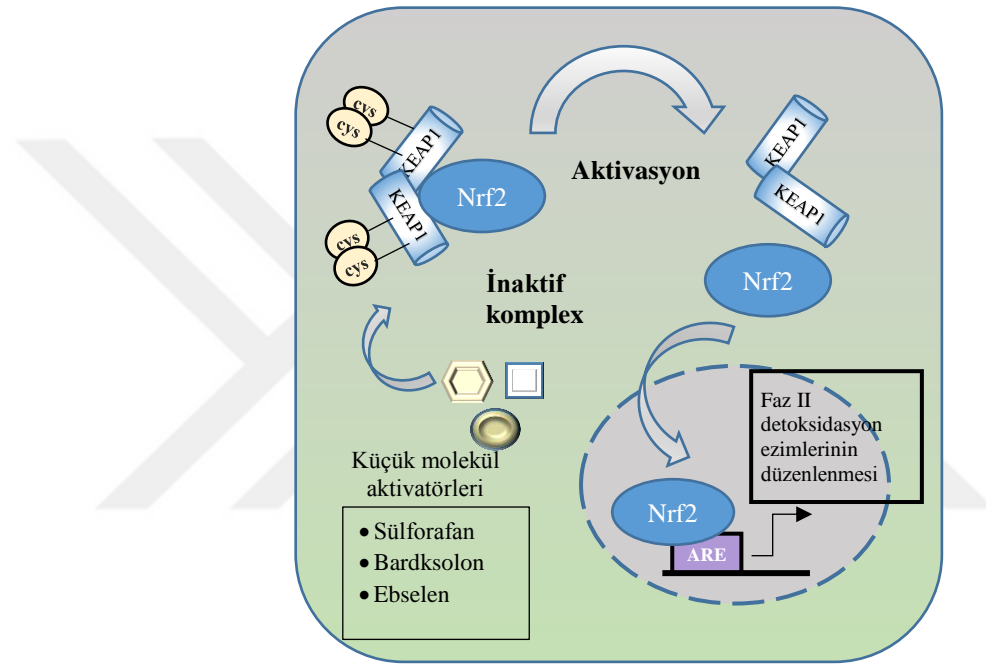
Kardiyovasküler hastalık tanısı yeni konmuş T2DM hastalarında iyi bir glisemik kontrol yapıldığında gelişmiş mikrovasküler fonksiyon görülmüştür (Casanova ve ark. 2017). Ancak, hastalık süresi uzamış hastalarda bu ilişki ortadan kalkmıştır. Dekstroz aracılı hiperglisemi, ERK, p38 ve Akt yolaklarını inhibe ederek insan umbilikal ven endotel hücrelerinde göçün yanı sıra endotel hücre proliferasyonunun bozulmasına neden olmuştur (Chen ve ark. 2017).

2.6. Transkripsiyon faktörü (Nükleer Faktör Eritroid 2) ile İlişkili Faktör 2 (Nrf2)

Evrimsel süreçte, tüm organizmalar çeşitli stres unsurlarına maruz kalmışlardır ve yalnızca işlevsel savunma sistemlerine sahip organizmalar hayatta kalıp sürece devam edebilmiştir. Bu sistem, Transkripsiyon faktörü (nükleer faktör eritroid 2) ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) ve sitosolik reseptör protein Kelch-benzeri ECH-ilişkili protein 1 (Keap1) arasındaki etkileşimler ile düzenlenmektedir (Bellezza ve ark. 2018). Bazik lösin fermuar proteinlerinin Cap-n-Collar ailesinin bir üyesi olan Nrf2 ilk önce Moi ve arkadaşları tarafından β -globin gen ekspresyonunun bir aktivatörü olarak tarif edilmiş (Moi ve ark. 1994) ve daha sonra hücrede oksidatif stresin ana algılayıcısı olarak tanımlanmıştır (Itoh ve ark. 1999; Martin ve ark. 1998).

Nrf2 oksidatif stresin ana düzenleyicisidir. Nrf2, hücredeki redoks homeostazını korumak için birçok antioksidan genin ve detoksifiye edici proteinlerin ekspresyonunu yönetmektedir (Niture, Khatri, ve Jaiswal 2014; Baird ve Dinkova-Kostova 2011). Homeostatik koşullar altında, Keap-1 sitoplazma içinde Nrf2 ile bağlıdır. Bu şekilde

düşük Nrf2 konsantrasyonları korunmuş olur. Aktivasyon gerçekleştiğinde, Nrf2'nin Keap-1 bağımlı ubiquinasyonu inhibe olur, Nrf2 antioksidan yanıt elementi (ARE) güdümlü genleri transaktive ettiği çekirdekte toplanır (Şekil 2-4) (de Haan 2011). Nrf2 oksidatif strese cevap olarak aktive olan transkripsiyon faktörüdür. Nrf2-Keap1-ARE yolağı hücresel homeostazın düzenlenmesi için primer düzenleyicidir. Bu yolak üzerinden oksidatif stres ile ilişkili çok sayıda gen fonksiyonu düzenlenir (Kensler, Wakabayashi, ve Biswal 2007).



Şekil 2-4 Aktivatör moleküller ile Nrf2'nin Keap 1'den ayrılması (de Haan 2011)

Antioksidan enzimler, antiinflamatuvar faktör ve detoksifiye edici proteinler gibi proteinlerin gen diziliminin ekspresyonunu indükler. Bu genler redoks dengesizliğini önlemeye çalışır ve ROS'u ortadan kaldırır (Suzuki ve Yamamoto 2015). Bu genlere örnek olarak;

- Heme-oksijenaz (HO-1),
- Glutatyon S-transferaz (GSTs),
- Glutamat sistein ligaz (GCL),
- Glutatyon redüktaz (GR) (Liu ve ark. 2018)

- NAD(P)H kinin oksidoredüktaz (NQO1),
- Glutasyon S-transferaz (GST) (Halliwell ve Gutteridge 1986) örnek verilebilir.

Nrf2, genel olarak faz II detoksifiye edici enzim kodlarını upregüle eder ve gen indüksiyonlarını regüle eder (Şekil 4). Nrf2 knock-out farelerde yapılan çalışmada faz II enzim ekspresyonlarının down-regüle olduğu gösterilmiştir (Itoh ve ark. 1999; Itoh ve ark. 1997). Faz II enzimleri, faz I reaksiyonları tarafından üretilen ara metabolitleri, toksik ksenobiyotikleri detoksifiye ederek hızlı bir şekilde atılımını sağlar (Brigelius-Flohe ve Flohe 2011).

Benzo[a]piren, faz I metabolizmasından sonra yüksek derecede reaktif bir ara ürüne dönüşen, faz II reaksiyonları ile detoksifiye edilen bir karsinojendir. Yapılan çalışmalara göre Nrf2 knock-out olan fareler, benzo [a] pirene bağlı tümör oluşumuna daha duyarlıdır, bu nedenle Nrf2'nin faz II metabolizması için gerekli olduğunu düşünülmektedir (Ramos-Gomez ve ark. 2003; Kwak ve ark. 2001). Diğer çalışmalar Nrf2 sisteminin faz I ile ilişkili genleri ve aynı zamanda faz III ksenobiyotik taşıyıcıları (Hayashi ve ark. 2003; Vollrath ve ark. 2006) kontrol ettiğini, dolayısıyla Nrf2'nin tüm ksenobiyotik metabolizma sürecinden sorumlu olduğunu göstermektedir (Bellezza ve ark. 2018). Ayrıca, heme oksijenaz 1 (HO-1) gibi antioksidan genler, upstream ARE sekansları içerdiğinden, Nrf2, oksidatif stres cevabının ana düzenleyicisi olarak kabul edilebilir (Bellezza ve ark. 2012; Minelli ve ark. 2009). Çeşitli toksik kimyasal stres faktörleri ROS üretir, bu nedenle Nrf2, kimyasal olarak türetilmiş streslere karşı savunmada merkezi bir rol oynar.

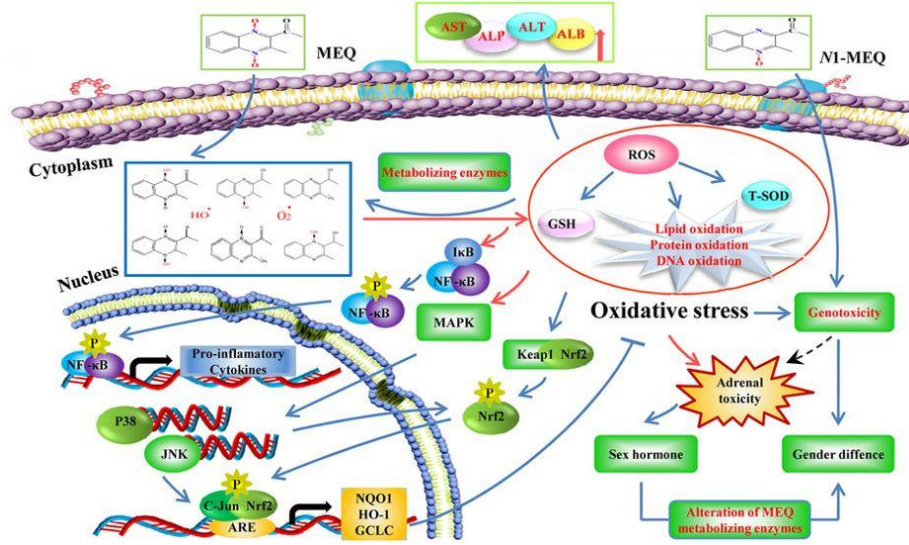
ROS, balon anjiyoplasti sonrası arteriyel yaralanmaya yanıtın da dahil olduğu bir çok kardiyovasküler patolojide rol oynar. Esas olarak vasküler düz kas hücrelerinden (VSMC) türer ve advers etki olarak iyileşme için hücrelerin proliferasyon ve göçüne sebep olur (Griendling ve FitzGerald 2003; Jacobson ve ark. 2003). Özellikle NQO1'lerin VSMC'lerde hiperplaziye yol açan ROS kaynağı olarak rolü gösterilmiştir. Ayrıca hücre dışı süperoksit dismutaz (EC-SOD) down-regülesyonunun ROS üretim-yıkımı ile remodeling arasındaki dengede rolü olduğu gösterilmiştir (Leite ve ark. 2003). Ayrıca HO-1, ya da EC-SOD artışı gibi antioksidan savunmayı arttıracak gen tedavisi terapotik yaklaşımları, hayvan modellerinde yaralanmaya bağlı oluşan neointima oluşumunu inhibe eder (Tulis ve ark. 2001). HO-1 indüksiyonunun endojen antioksidan savunmayı arttırması gibi bir potansiyeli gösterilmiştir. Ayrıca HO-1

regülasyonunun Nrf2 tarafından yapıldığı belirtilmiştir (Motohashi ve Yamamoto 2004).

Süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve peroksit gibi ROS'lar oksidatif strese neden olur ve kanser, katarakt gibi hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli dejeneratif hastalıkların oluşumu ile bağlantılıdır. Kanser hücrelerinde, JNK'nin ROS ile indüklenmiş hiperfosforilasyonu onkogenik sinyalleri çevirebilir, böylece ERK'in aracılık ettiği proliferasyon sinyallerine ek olarak AP-1'in aktivasyonu ile hücrel proliferasyonu destekleyebilir (Benhar, Engelberg, ve Levitzki 2002). Bu nedenle, ROS tümör ilerlemesinde önemli bir rol oynayabilmektedir. Hücrel savunma sistemi, oksidatif strese karşı NADH, SOD ve HO-1 gibi aktif savunma sistemlerini içerir. HO-1, yüksek oranda dalak ve karaciğerde eksprese edilir ve ekspresyonu birçok etken ile indüklenebilir (Farombi ve Surh 2006). Koruyucu bir mekanizma olarak indüklendiğinden, bu enzimin uyarılması oksidatif doku hasarına karşı koruma için önemli bir etken olarak kabul edilir. HO-1'in uyarılmasının düzenlenmesi için bir dizi hücre için sinyal molekülü tanımlanmıştır. Ana transkripsiyon faktörü, Nrf2'dir (Chen ve ark. 2005). Ksenobiyotik mekanizmasına karşı etkin bir antioksidan savunma için Nrf2 temel faktörlerden biri olarak düşünülebilir.

Nrf2'yi aktive eden çeşitli yollar vardır, hücre içerisindeki ERK, JNK ve p38 yolları bunlardan bazılarıdır. ROS ile fosforilize olan bu yollar Nrf2'yi aktive ederler. MAPK ile Nrf2 aktivasyonu bu yollardan geçerek gerçekleşir (Chen, Yu, ve ark. 2000; Shen ve ark. 2004). Nrf2 Keap1'den ayrılarak nükleusa geçer ve antioksidan gen ekspresyonları gerçekleşir (Hu ve ark. 2017; Jeong ve ark. 2017; Levonen ve ark. 2007).

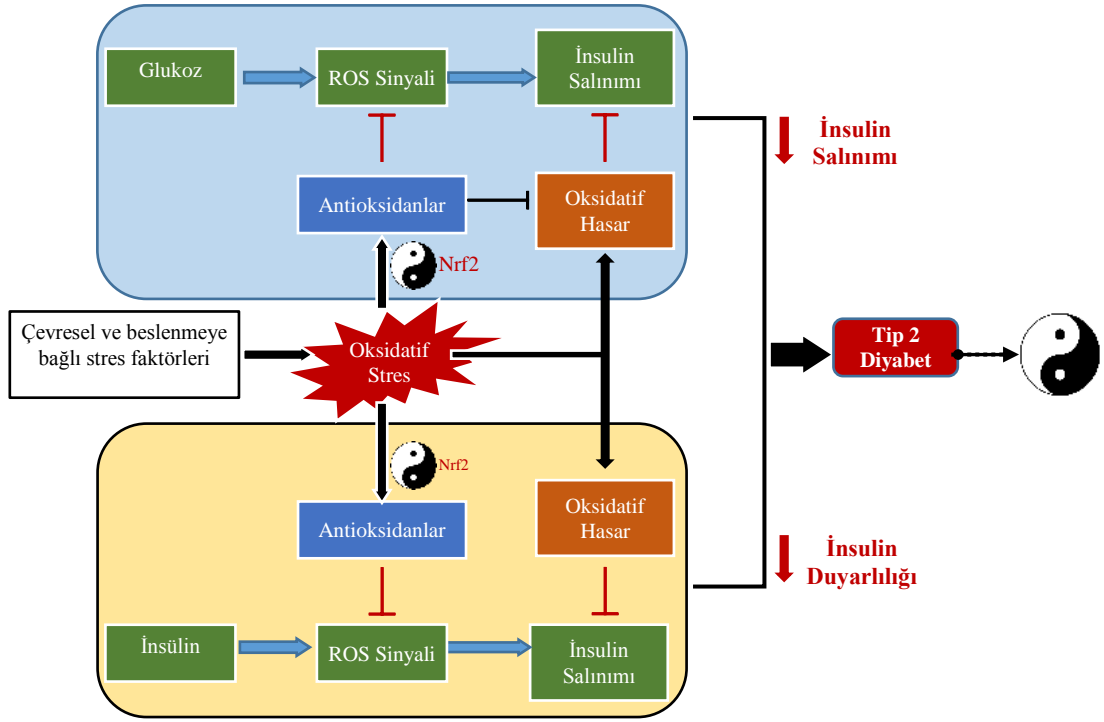
P38 ve JNK, MAPK kaskadının üyeleridir ve hücre içi redoks durumunu ayarlamak için oksidatif stres ile aktive olurlar (Gong, Ivanov, ve Hei 2016; Kim ve ark. 2015; Liu ve ark. 2017). Oksidatif strese cevap olarak Nrf2, Keap1'den ayrılıp nükleusa geçer ve ARE'lere bağlanır (Kobayashi ve Yamamoto 2005). Nrf2/Keap1/ARE yolağı, faz II detoksifiye edici ve antioksidan enzimlere aracılık ederek oksidatif strese karşı hücrel bir savunma mekanizmasıdır (Pedruzzi ve ark. 2012). ROS oluşumu ile birlikte p38 ve JNK fosforilasyonunun arttığı da çalışmalarda gösterilmiştir (Zhao ve ark. 2013; Zhao ve ark. 2015) (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: Oksidatif stres mekanizması (Liu ve ark. 2017)

2.7. Nrf2 Diyabet İlişkisi

Tip 2 diyabet (T2D); genetik, yaşam tarzı ve çevresel faktörlerin kombinasyonu şeklinde ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır. Oksidatif stres, T2D'in insülin direnci ve pankreas β -hücreleri disfonksiyonu gibi ortaya çıkan iki ana patogenezinde kritik rol oynamaktadır. ROS, sitotoksik olmasına rağmen glukoz algılanmasında rol oynayan önemli hücre için sinyali olarak da işlev görmektedir. Çok fazla antioksidan ya da endojen antioksidanların sürekli uyarılması da insülin sekresyonunu ve aksiyonunu kontrol eden sinyal transdüksiyonunun etkisinin azalmasına sebep olabilir. Oksidatif stres altında, hücreSEL ROS-temizleme kapasitesi, çoğunlukla Nrf2 aktivasyonu ve antioksidan enzimlerin transkripsiyonel indüksiyonu yoluyla düzenlenebilir. Nrf2 aracılı antioksidatif savunma, glukoz homeostazını düzenlemede denge rolünü oynuyor gibi görünmektedir (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: ROS, antioksidan ve Nrf2'nin Denge Rollerini

ROS nötrleyici ajanlar veya Nrf2 indükleyicileri ile antioksidan tedaviler, çeşitli komplikasyonların tedavisinde faydalı etkiler göstermektedir. Nrf2, ROS ve antioksidanlar arasındaki çapraz düzenlemeler, uygulanabilecek ROS modülasyon ve stratejileri ile T2D ve komplikasyonları ile mücadele edilebileceği düşünülmektedir (Fu ve ark. 2016). Aşağıdaki tabloda Nrf2-ARE aktivatörlerinin diyabetik komplikasyonlardaki etkilerine örnekler verilmiştir (Tablo 2-3).

Tablo 2-3: Nrf2-ARE aktivatörlerinin diyabetik komplikasyonlardaki etkileri

Kimyasal İsmi	Tanım	Test Modeli	Etkisi	Referans
Aralia Taibaiensis	Antidiyabetik ilaç	HG, H9c2 hücreleri	Kardiyomiyopati(+)	(Duan ve ark. 2015)
Siyanidin 3-glikozit	Roselle bitkisinden, sebze ve meyvelerdeki flavonoid	PA, HUVEC hücrelerinde	Vasküler hastalıkta (+)	(Fratantonio ve ark. 2015)

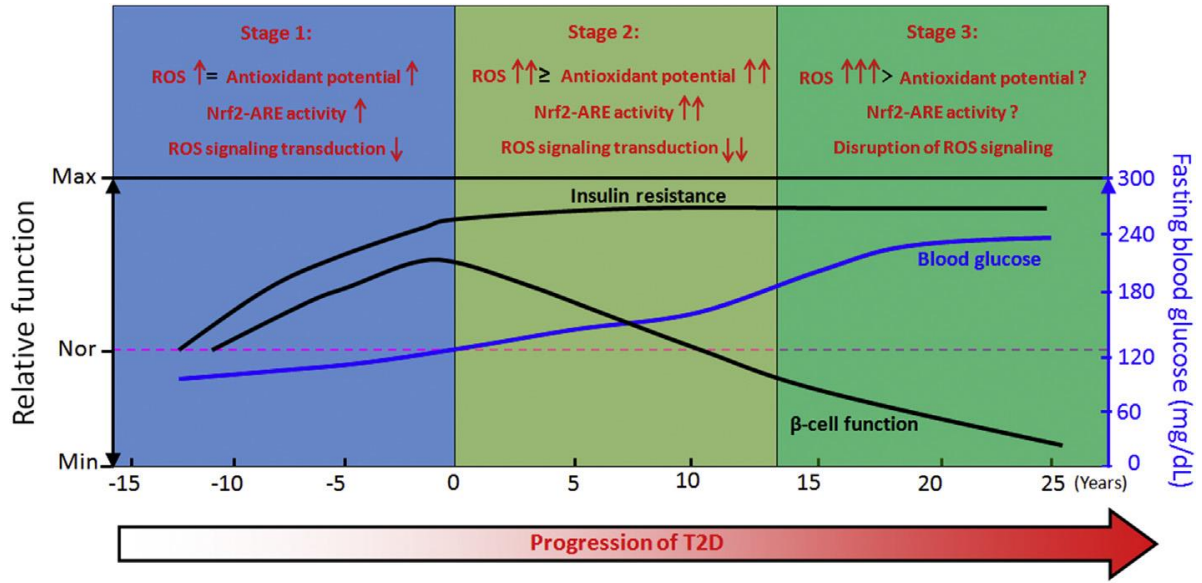
Dimetil fumarat	Multiple siklerozis (MS) için FDA onaylı ilaç	HG, ARPE-19 hücreleri VSMCs, D vitamini indüklü vasküler kalsifikasyon	Korneada yara iyileşmesi (+), vasküler hastalık (+)	(Foresti ve ark. 2015)
Ferulik asit	Fenolik asit	HG, kardiyomiyosit,	Kardiyotik oksidatif stres (+)	(Song ve ark. 2016)
Resveratrol	Bitkilerden üretilen doğal fenol	Endotel hücreleri, HFD, Nrf2 knock-out farelerde	Kardiyomiyopati(+)	(Ungvari ve ark. 2010; Bonnefont-Rousselot 2016)
Pentaeritil tetranitrat	Organik nitrat	STZ'li sıçanlarda	Vasküler sistem (+)	(Schuhmacher ve ark. 2011)
MG132	Proteozom inhibitörü	Ove26 farelerde	Vasküler hastalık (+), Kardiyomiyopati(+)	(Cui ve ark. 2013; Miao, Cui, ve ark. 2013)
Çiğ sarımsak homojenatı	Sarımsak homojenatı	Yüksek fruktoz, sıçanlarda	Kardiyomiyopati(+)	(Padiya ve ark. 2014)
Sülforapan	Turp biyoaktif komponenti	Db/Db fare	Vasküler hastalık (+)	(Velmurugan ve ark. 2013)
Çinko	Eser element	OVE26 Fare	Vasküler hastalık (+)	(Miao, Wang, ve ark. 2013)

Kaynak:(Fu ve ark. 2016).

Azalan Nrf2/ARE aktivitesi damar yapısında oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun artışına katkıda bulunur. Bu durum da endotel disfonksiyonuna, insülin direncine ve diyabette gözlenen anormal anjiyogeneze yol açar (Cheng, Siow, ve Mann 2011). Nrf2 ekspresyonunun kardiyak hücrelerdeki oksidatif hasar ve yüksek glukoz seviyelerinin neden olduğu ölümlerden korumadaki kritik rolü de çalışmalarda gösterilmiştir (He ve ark. 2009; Tan ve ark. 2011). İn vitroda kardiyak miyositlerde, oksidatif stresin ERK aktivitesindeki artış ile insülin direncini indüklediği belirtilmiştir. STZ indüklü tip I diyabetik fare kalplerinde diyabetin geç evrelerinde Nrf2'nin kardiyak ekspresyonu baskılanmıştır. Antioksidatif savunma sisteminin ana transkripsiyonel faktörü olan Nrf2'nin kardiyomiyositlerde ve kalpte oksidatif stres kaynaklı insülin direncinin negatif regülatörü olabileceği tartışılmaktadır (Li ve ark. 2009).

Birçok farklı organda etkileri görülen T2D'nin farklı evrelerinde redoks homestazı, ROS sinyali ve Nrf2-ARE üzerine etkileri gösterilmiştir (Şekil 2-7). Bu

şekilde bir sınıflandırma, T2D ile başa çıkmak için çeşitli antioksidan tedavilerin uygulanabilirliği hakkında genel bir bilgi sağlayabilir. Her ne kadar T2D'in patogenez ve komplikasyonları çeşitli diyabetik koşullar altında değişse de oksidatif stres her aşamada tutarlı olarak artmaktadır. Bu nedenle belirli bir ROS tipini hedef almak hastalık tedavisinde faydalı olabilir diye düşünülmektedir.



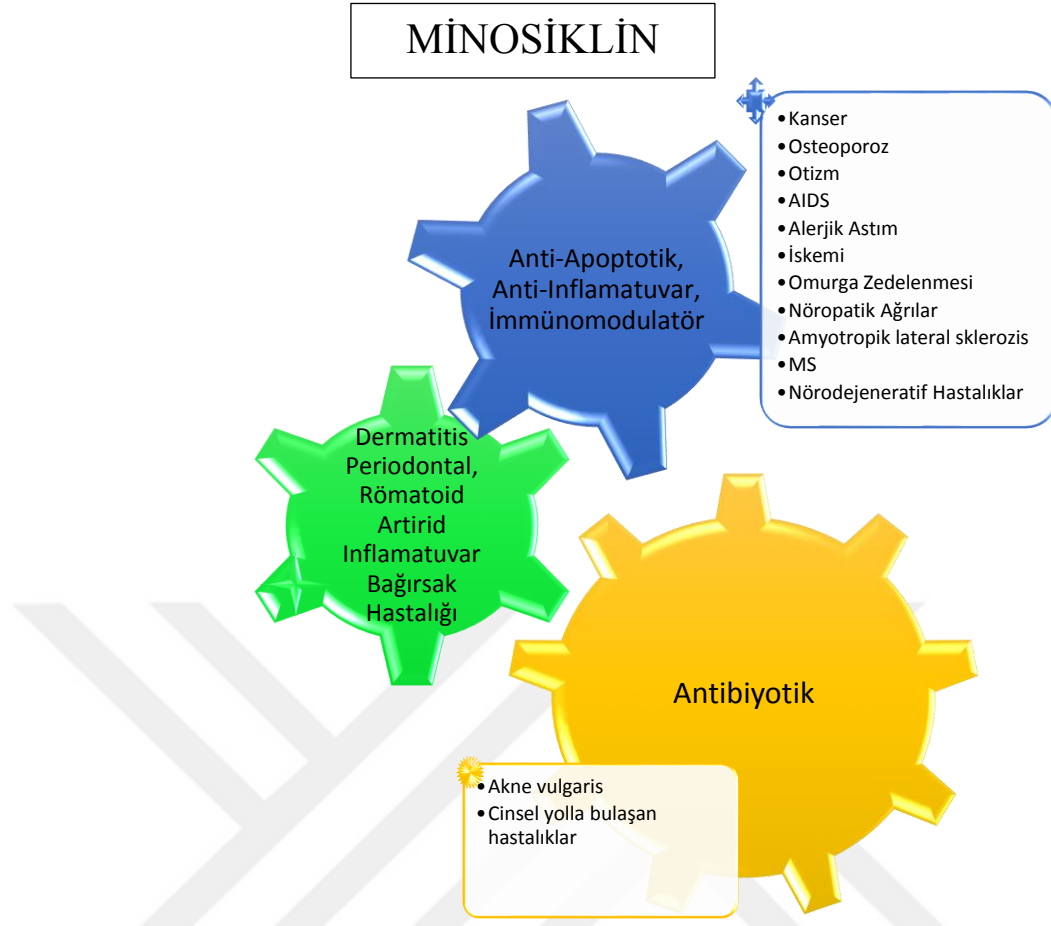
Şekil 2-7: T2D'nin farklı aşamalarında Nrf2-ARE aktivitesi, ROS sinyal iletimi, redoks durumu (Fu ve ark. 2016).

dönüşümsüz pigmentasyon riski, insan enfeksiyonlarında yaygın kullanımını sınırlamıştır, şu anda sadece akne vulgarisin tedavisi için endikedir (Klein ve Cunha 1995).

Tetrasiklinlerin antibiyotik özellikleri başlangıçta 1940'ların sonlarında tarif edilmiştir; fakat daha yakın zamanlarda, sayısız çalışma, antibiyotik olmayan özelliklerine odaklanmıştır. Aslında, tetrasiklinlerin antiinflamatuvar ve anti-apoptotik aktiviteler de dahil olmak üzere anti-mikrobiyal aktivitelerinden bağımsız ve proteoliz, anjiyogenez ve tümör metastazı üzerindeki inhibitör etkiler gibi çeşitli biyolojik eylemler gerçekleştirebildiği bildirilmiştir. Rosacea, dermatozlar, nötrofilik hastalıklar, aort anevrizmaları, kanser metastazı ve romatoid artrit gibi otoimmün bozukluklar da dahil olmak üzere, inflamatuvar temeli olan hastalıklar için etkileri olduğu düşünüldüğü için minosiklin için de birçok çalışma yapılmıştır.

Bu bulgular minosiklinin antimikrobiyal özelliklerinin yanı sıra inflamatuvar temelli hastalıklarda (dermatit, romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak sendromu gibi hastalıklar) deneysel modeller üzerinde birçok biyolojik etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Minosiklin nörolojik koruma sağlamada en etkili tetrasiklin türevi olarak da belirtilmiştir. Bu etki deneysel iskemi, travmatik beyin hasarı ve nöropatik ağrı modellerinde ve Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz, Alzheimer hastalığı, multipl skleroz ve omurilik zedelenmesi gibi birçok nörodejeneratif hastalıkla yapılan çalışmalarda doğrulanmıştır. Ayrıca, diğer pre-klinik çalışmalar, malign hücre büyümesini inhibe etme ve kemik erimesini önleme yeteneğini göstermiştir (Garrido-Mesa, Zarzuelo, ve Galvez 2013).

Deneysel iskemi modellerinde, travmatik beyin yaralanmalarında, nöropatik ağrılarda ve çeşitli nörodejeneratif durumlarda etkili olduğu gösterilmiştir. Alzheimer, multiple sclerosis (MS), Parkinson gibi hastalıklarda etkinlikleri çeşitli pre-klinik ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (Mei ve ark. 2011; Lampl ve ark. 2007; Choi ve ark. 2007). Nöroprotektif etkilerinin yanında farklı diğer deneysel modellerde gösterdiği terapötik etkisi de son dönemde araştırmalarda artan ilgiye sebep olmuştur. İritabl bağırsak hastalığı (IBS) (Garrido-Mesa ve ark. 2011), diyabet (Cai ve ark. 2011), kardiyak iskemi (Lampl ve ark. 2007), insan immün yetmezlik virüs enfeksiyonu (HIV) (Campbell ve ark. 2011) gibi birçok hastalık üzerinde etkisi olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Şekil 2-9).



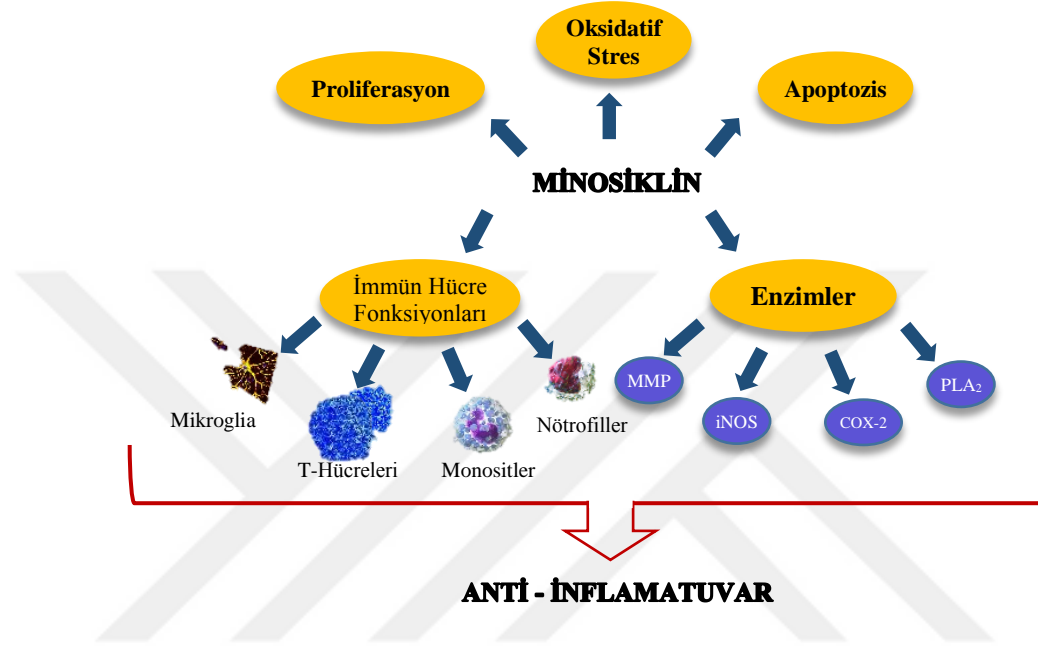
Şekil 2-9: Minosiklin'in antibiyotik ve antimikrobiyal etkisi ile ilişkili olmayan klinik potansiyeli (Garrido-Mesa, Zarzuelo, ve Galvez 2013)

Çalışmalarda minosiklinin antiinflamatuvar, immünomodülör, ve nöroprotektif etkilerinin olası mekanizmaları gösterilmiştir;

- İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) (Amin ve ark. 1997), fosfolipaz A2 (PLA2) (Pruzanski ve ark. 1992), matriks metaloproteinaz (MMPs) gibi anahtar enzimlerin aktivitelerinde inhibe edici etkisinin olması (Golub ve ark. 1983),
- Protein tirozin nitrasyonunun azalması (Whiteman ve Halliwell 1997),
- Kaspaz-1 ve kaspaz-3 aktivasyonunun inhibe olması (Chen, Ona, ve ark. 2000),
- Bcl-2 (apoptoz inhibitörü) türevli etkilerin artması, böylece hücrelerin apoptoza karşı korunması (Jordan ve ark. 2007),
- P38, MAPK fosforilasyonunun azalması (Lin ve ark. 2001; Zhu ve ark. 2002),
- PARP-1 (poli ADP riboz polimeraz 1) aktivitesinin azalması (Alano ve ark. 2006),

Tüm bu etkilerin yanında tetrasiklinlerin Ca^{2+} ve Mg^{2+} 'ya iyi bağlandıkları bilinmektedir. Yukarıda yazılmış olan biyolojik etkilerini bu katyonları şelatlaması ve

hücre içi kompartmanlara geçişi ile gerçekleştirdiği de düşünülmektedir (White ve Pearce 1982) (Şekil 2-10).



Şekil 2-10: Minosiklin'in antiinflamatuar etkisine dahil olan mekanizmalar, antioksidan özellikler

Özetle, minosiklin akne vulgaris, perioral hastalık ve kutanöz sarkoidoz için uzun zamandır antibiyotik olarak kullanılmaktadır. Ayrıca günümüzde romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, minosiklin artık antiinflamatuar, immünomodülatör ve nöroprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Hayvan modellerinde ve bazı klinik çalışmalarda yapılan çeşitli çalışmalar, tek başına veya diğer ilaçlarla kombine edilmiş olan minosiklinin, inflamatuvar bir arka plana sahip hastalıklar için umut verici bir tedavi edici olarak yararlı etkilerini ve güvenliğini göstermektedir. Çoklu hedefleri etkileyen bir ilaç olarak öne çıkan minosiklin için çoklu mekanizmalar önerilmiştir. Onun antioksidan özellikleri, kalsiyum şelasyonu ve iNOS veya MMP'ler gibi proinflamatuvar enzimleri inhibe etme kabiliyeti, bahsedilen hastalıkların çoğunda yararlı etkileriyle önemli rol oynayabilir. Ancak, diğer tetrasiklinlerin, özellikle de doksisisiklinin, bu özelliklerin bazılarını paylaştığı bildirilse de aynı modellerde benzer bir etki göstermemiştir. Bu

nedenle, minosiklinin tetrasiklinler arasında çok daha etkili ve özellikli bir ilaç haline getiren çoklu hedefleri olduğu görülmektedir.

Ek olarak, minosiklinin dikkat çeken avantajlarına bakıldığında;

- Bilinen bir yan etki profili ile insanlarda genellikle güvenli bir ilaç olarak kabul edilir.
- Pahalı bir ilaç değildir, böylece hastalıklarda uzun süreli kullanım için uygundur.
- Minosiklin oral kullanımında emilimi iyi olan (% 95-100) ve MSS de dahil olmak üzere vücudun birçok bölümüne ulaşan bir ilaçtır.

Her ne kadar terapötik olarak kullanımın alanlarının gelişmesi için faaliyet mekanizmalarının in vivo ve in vitro çalışmalar ile anlaşılması gerekse de elde edilen sonuçlara bakıldığında birçok hastalık için potansiyelinin olduğu görülmektedir.

2.9. Minosiklin ve Nrf2 İlişkisi

Minosiklin, kan-beyin bariyerinden kolayca geçebilmekte ve hayvan modellerinde nöronal hücre ölümünü hafiflettiği, nörodejeneratif bozuklukların semptomlarını iyileştirdiği gösterilmiştir. Son çalışmalarda, minosiklin, beyindeki oksidatif stres ve inflamasyonu baskılayarak ve oksidatif stresle mücadele ederek nöroprotektif etki gösterdiği şeklinde sonuçlar elde edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, minosiklinin yaşlı sıçanlarda sevofloranla indüklenmiş olan kognitif bozukluğu azalttığını ve bu durumun minosiklinin anestezi kaynaklı nörotoksisiteyi önlemek için kullanılabilecek bir ajan olabileceğini düşündürmektedir (Tian ve ark. 2017).

Sevofloranla indüklenmiş olan kognitif bozukluğu ile aktive olan NF- κ B sinyalizasyonunun aşırı artışının minosiklin ile tedavi edildiği belirtilmektedir. Yine de tam mekanizma ortaya konulamamıştır (Tian ve ark. 2015).

Oksidatif stres ve inflamasyon durumunda NF- κ B ve Nrf2 yolları arasında bağlantı bulunmaktadır (Lyu ve ark. 2012).

Sevofloranla olan çalışmada, ilaç tarafından indüklenen hücre hasarında minosiklin uygulanıp Nrf2'nin rolü gösterilmiştir. Ayrıca, bu işlem sırasında Nrf2 ve

NF- κ B yolları arasındaki bağlantı da belirtilmiştir. Minosiklin apoptozu, ROS ve NF- κ B'yı inhibe etmekte ve Nrf2 antioksidan yolağını stimüle etmektedir.

Hücre apoptozu kaspaz ailesi proteinleri, Bcl-2 ve NF- κ B sinyali dahil olmak üzere birçok faktör tarafından düzenlenir. Bu faktörler arasında, Bcl-2'nin hücrelerde antiapoptotik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Wang ve ark. 2004). Önceki çalışmalar, minosiklin kaspaz yolunun aktivasyonunu inhibe ettiğini ve apoptotik baskılayıcı Bcl-2'yi up-regüle ederek ve pro-apoptotik kaspaz-1 ve kaspaz-3'ü down-regüle ederek bir antiapoptotik etki gösterdiğini göstermiştir (Chen, Ona, ve ark. 2000). Bu sonuçlar, minosiklin, apoptotik düzenleyici proteinlerdeki değişiklikleri baskılayarak, hasarlı hücrelerde antiapoptotik bir etki gösterdiğini ifade etmektedir.

ROS, normal fizyolojik metabolik prosesin bir parçasıdır. Hücre yaşamı ve apoptozunda önemli rol oynamaktadır (Jacobson 1996; Simon, Haj-Yehia, ve Levi-Schaffer 2000). Minosiklinin ROS'un üretimini azalttığı, yükselmesini baskıladığı belirtilmiştir (Jiang ve ark. 2014; Schmitz ve ark. 2012; Tian ve ark. 2017). Nrf2 de oksidatif strese cevap olarak aktive olmaktadır. İlginç bir şekilde, tek başına minosiklin Nrf2 aktivasyonu veya ROS oluşumu üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır, ancak örneğin sevofluran ile birlikte kullanıldığında Nrf2 aktivasyonunu arttırmış ve ROS üretiminin sevofluranla indüklenmiş yükselmesini bastırmıştır. Ayrıca, Nrf2 ekspresyonu siRNA ile down-regüle edildiğinde, minosiklin antioksidan etkileri belirgin bir şekilde zayıflatılmıştır. Bu sonuçlar, minosiklinin antioksidan mekanizmalarını Nrf2 ile aktive ederek antioksidan etki gösterdiğini düşündürmektedir.

İn vivo ve in vitroda ts-1 (ts-1 mutant lösemi virüsü) indüklü astrosit ölümü gösterilmiş fakat azalmış H₂O₂ seviyeleri, sistein alımının artışı ve hücre içi yüksek GSH seviyeleri ile C1 astrositlerinin hayatta kaldığı gösterilmiştir (Jiang ve ark. 2006; Qiang ve ark. 2004). Bu çalışmalar da yüksek antioksidan seviyelerinde astrositlerin ts-1 enfekte olsa da yaşadığını belirtmektedir. Aynı sonuç, minosiklinin oksidatif stres seviyelerini azaltması ve Nrf2 antioksidan savunma mekanizmasını upregüle etmesi ile elde edilmiştir.

Ts-1 olan C1 hücrelerinin olduğu ortama minosiklin eklendiğinde hücrelerin hayatta kalımları artmış ve nöron içi ROS seviyeleri azalmıştır. Ayrıca nöronlardaki Nrf2 seviyeleri minosiklin tarafından upregüle etmesi ile ROS seviyesi azalışı ve hücrelerin korunması arasında ilişki bulunmuştur (Kuang ve ark. 2009).

2016 yılında Nature dergisinde minosiklin endojen Nrf2'nin stabilizasyonunu sağlayarak diyabetik nefropatiye karşı koruma sağladığını bildiren bir makale yayınlanmıştır (Shahzad ve ark. 2016).

Bu çalışmada, mitokondriyal ROS'un inflamazomu aktive edebileceği ve minosiklinin de mitokondriyi hedef aldığı gösterilmektedir. Minosiklin mitokondriyal ROS'u azaltarak diyabet bağlantılı inflamazom artışını inhibe eder. Minosiklin, glukoz stresli podositler ve diyabetik böbreklerde antioksidan etki taşır. Minosiklinin inflamazom aktivasyonunu kesmesi, ROS'u azaltmasının mekanizması tam bilinmemektedir.

Glukoz indüklü inflamazom aktivasyonunda Nrf2'nin bağlantısını göstermek için ise knock-down podositler kullanılmıştır. Endojen Nrf2 aktivasyon kaybı ile inflamazom artışı önemli ölçüde artmıştır.

Minosiklinin Nrf2 stabilizasyonundaki bağlantısı ise; yüksek glukoz maruziyetinde minosiklin tarafından Nrf2 aktivasyonunun indüklendiği gösterilmiştir (Shahzad ve ark. 2015). Bu verilere bakıldığında minosiklinin endojen Nrf2 ekspresyonunu arttırdığı söylenebilmektedir (Shahzad ve ark. 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Deneyde 80 adet 220-320 gram ağırlıkları arasında erkek Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar İstanbul Üniversitesi DETAE'den alınarak düzenli olarak temizliği yapılan kafeslere 4'erli gruplar şeklinde yerleştirildi. Havalandırmaya sahip, 21-23°C sabit sıcaklıktaki, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünün sağlandığı ortamda bakılarak; serbest yem yeme, su içme rejiminde (*ad libitum*) barındırılmıştır. Sunulan tez çalışmasında kullanılan deney protokolleri İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Etik Kurulu'na 07/03/2017 tarihli toplantıda 20/04/2017-151477 no'lu kararla onaylanmıştır.

Sıçanların genel bakımları DETAE Deney Hayvanları Birimi'nde yapılıyor olup, deney yapılacağı günde planlanmış miktarlarda hayvan temin edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Araç Gereçler

- Commat izole organ banyosu düzeneği
- Bilgisayar
- İstatistik programı
- Deneyde kullanılan kimyasallar
- Saf su cihazı
- Sarf malzemeler (eppendorf tüp, pipet ucu, gazlı bez)
- Cerrahi aletler (makas, pens, bistüri..)
- -80 °C dondurucu dolap
- Hassas terazi

3.3. Kimyasal Ajanlar

3.3.1. Krebs Çözeltisi

Tablo 3-1: Krebs Çözeltisi Kimyasalları

Kullanılan Ajan	Miktarı
NaCl	13,9 gr
KCl	0,7 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6 gr
KH ₂ PO ₄	0,6 gr
Glukoz	4 gr
CaCl ₂	0,56 gr

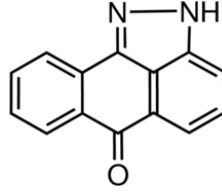
Krebs, izole organ banyosunda çalışılacak aortun canlılığını koruması için gereken, fizyolojik ihtiyaçlarını karşılayan çözeltilerin yer aldığı solüsyondur (Tablo3-1). Damar canlı kalabildiği sürece kasılma ve gevşeme yanıtlarını vereceğinden solüsyonun varlığı, içeriğinin doğru hazırlanmış olması ya da bozulmamış olması büyük önem taşımaktadır.

Krebs solüsyonu, tabloda yer alan ajanlarla, 2 lt çözelti için verilen miktarlar tartılarak günlük olarak hazırlandı. Solüsyonu hazırlarken dikkat edilmesi gereken konu ise, CaCl₂'nin en son çözelti karıştırılırken konulmasıdır. Çözeltinin bulanık olmaması açısından önem taşımaktadır.

Yüksek glukozlu hazırlanan Krebs çözeltileri ise; aynı oranda malzemeye 4 kat glukoz eklenmesi ile elde edilmiştir.

Mannitol grubunda, Krebs normal glukoz ile hazırlanır, eklenecek 4 kat glukoz yerine mannitol tartılıp konulmuştur. Çözeltiye eklenme oranı molekül ağırlığı hesaba katılarak belirlenmiştir.

3.3.2. SP600125 ((Sigma Aldrich, ABD)

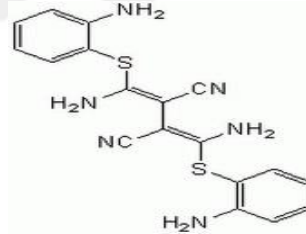


Şekil 3-1: SP600125 Kimyasal Yapısı

Spesifik olarak JNK sinyal yolağının inhibitörü olan sentetik bir ajandır (Şekil 3-1) (Suzuki ve ark. 2015). Yapılan çalışmalarda deneysel olarak JNK yolağını inhibe etmek ve mekanizmasal veriler elde etmek için kullanılmış bir moleküldür.

SP600125 inhibitörü Sigma'dan 10mg katı formda alınıp 10^{-4} M derişiminde stok çözeltisi olarak hazırlanmıştır.

3.3.3. U0126 (Sigma Aldrich, ABD)

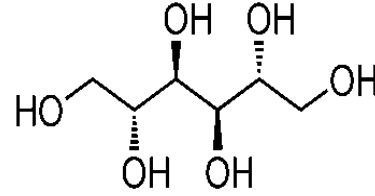


Şekil 3-2: U0126 Kimyasal Yapısı

Protein hedefi MAP kinaz olan selektif inhibitör bir ajandır (Şekil 3-2). MEK-1 ve MEK-2'yi dolayısıyla ERK aktivasyonunu inhibe eder (Rhee ve ark. 2004). Deneysel olarak ERK'in rolünü incelemek için kullanılmıştır.

U0126 inhibitörü Sigma'dan 10mg katı formda alınıp 10^{-4} M derişiminde stok çözelti olarak hazırlanmıştır.

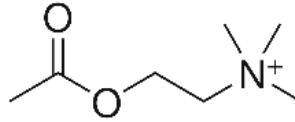
3.3.4. Mannitol (Sigma Aldrich, ABD)



Şekil 3-3: Mannitol Kimyasal Yapısı

Mannitol (Sigma Aldrich, ABD), yüksek glukozun yaratması beklenen olası hasarı osmotik basınç sebebi ile değil, glukoz etkisi ile yaptığını göstermek amaçlı kullanılmıştır (Şekil 3-3). Deneyde eklenen mannitol grubu, pozitif kontrol gibi bir amaç taşımaktadır. Mannitol, metabolik olarak aktive olmaz, sadece osmotik basıncın artması, hiper osmolarite sağlanması amacı ile ortamda bulundurulur. Yüksek glukozun etkisinin gözlenip gözlenmeyeceği kontrol edilmiştir (Madonna ve ark. 2016).

3.3.5. Asetilkolin (Sigma Aldrich, ABD)



Şekil 3-4: Asetilkolin Kimyasal Yapısı

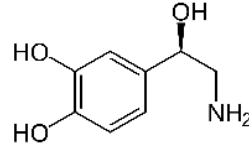
Kimyasal Formülü: C₇NH₁₂O₂

Asetilkolin (Ach) (Sigma Aldrich, ABD), damar gevşeme yanıtlarının gözlenmesi için kullanılan vücutta bulunan endojen bir maddedir (Şekil 3-4). Nörotransmitter olarak görev yapmaktadır. Parasempatik sistem ile aktive olduğundan stres durumunun tersi durumlarda etki göstermektedir.

Asetilkolin, muskarinik reseptörlere bağlanır. Bağlandıktan sonra eNOS tarafından NO sentezlenerek düz kaslara geçişi gerçekleşir. Kas hücrelerinde guanilat siklazın aktive olmasını sağlayarak cGMP'yi artırır ve gevşeme yanıtı gerçekleşir. Vazodilatasyon gerçekleşir.

Deneyde damar gevşeme yanıtlarını gözlemlemek için kullanılmıştır.

3.3.6. Noradrenalin



Şekil 3-5: Noradrenalin Kimyasal Yapısı

Kimyasal Formülü: C₈H₁₁NO₃

Noradrenalin (NA), (norepinefrin, Sigma Aldrich, ABD) damar kasılma yanıtlarının gözlenmesi için kullanılan aynı zamanda endojen bir maddedir (Şekil 3-5). Noradrenalin, nörotransmitter olarak görev yapan bir katekolamindir.

Noradrenalin, sempatik sinir sisteminde birçok adrenerjik aktiviteden sorumludur. ‘savaş ya da kaç’ mesajının verildiği, stres durumlarında devrededir. Vazokonstriksiyon yaparak kan akışı ve basıncını artırır.

Organ banyosu deneylerinde de vazokonstriktör etkisinden faydalanılarak damarın yanıtları incelenir.

3.4. Organ Banyosu

Organ banyosu deneyleri, uzun sürelerdir sık kullanılan farmakolojik yöntemlerden bir tanesidir. Belirli bir doku üzerinde çalışmalar yürütüleceği gibi organın tamamının da alınarak in vitro ortamda, gerekli koşullar sağlanarak canlı tutulup çalışması prensibine dayanır.

Deney sırasında yapılan uygulamalara canlı dokunun gösterdiği tepki kolayca ölçülebilmektedir (Langendorff düzeneğinde kalbin kasılmasının izlenmesi, aortun organ banyosunda kasılma gevşeme yanıtlarının anlık olarak gözlenmesi gibi örnekler verilebilir).

Sıçan aortu da organ banyosunda en sık çalışılan preparatlardan bir tanesidir. Noradrenalin uygulanarak kasılma yanıtlarının elde edilmesi, asetilkolin ile endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının gözlenmesi organ banyosu deneyleri ile mümkün olmaktadır.

Örneğin insülin direnci olan sıçan aortalarına etomidat uygulanması endotel bağımlı gevşemeyi arttırmakta olduğu organ banyosu deneyleri ile gösterilmiştir (Xue ve ark. 2018).

Başka bir çalışmada yüksek glukozlu ortamda sıçan aortası inkübasyonu ile asetilkolin gevşeme yanıtlarında azalma meydana geldiği gösterilmiştir ve bunun üzerine resveratrolün etkisi değerlendirilmiştir (Pektas ve ark. 2018).

Bu çalışmalar yürütülerek mekanizmasal araştırmaların ilerlemesi mümkün olmaktadır.

3.4.1. Organ Banyosu Yüksek Glukoz Metodu

Sıçan aortu ile yürütülen organ deneylerinde çeşitli deneysel modeller oluşturulmuştur ve bu duruma göre bir protokol izlenmektedir.

Yüksek glukozlu ortamda aort ringlerinin inkübe edilmesi gibi bir deneysel diyabet modeli bulunmaktadır. Sağlıklı hayvandan alınan aortun belirli bir prosedürü izleyerek normalden çok daha yüksek dozda glukoz içeren Krebs solüsyonunda inkübe edilmesi esasına dayanır. Inkübasyon sonrasında organ banyosu deneylerinin klasik prosedürleri izlenmektedir.

Yüksek glukozlu deney düzeneği için birçok farklı protokol bulunmaktadır. Inkübasyon sürelerinin 0,5, 1, 2, 3, 4 saat ve hatta 3 gün gibi uzun olarak tasarlandığı protokoller mevcuttur. (Qian ve ark. 2006; Fang ve ark. 2009; Ng, Leo, ve Parry 2016) Kasılma gevşeme yanıtları aynı sürelerde standart deney prosedürlerinde inkübe edilen kontrol grupları ve yüksek glukozlu grupların kıyaslanması ile gösterilmektedir. Bu şekilde yürütülen çalışmalarda organ banyosunda değerlendirmesi yapılan kasılma ve gevşeme yanıtlarının diyabetik hayvan modellerinde olduğu gibi normal kontrole göre anlamlı şekilde değiştiği görülmektedir (Qian ve ark. 2006).

Oluşturulan bu protokollerle yürütülen deneylerin diyabetik hayvan modeli oluşturmaya göre çok daha pratik ve mekanizmasal çalışmalara uygun olduğu söylenebilir.

Hayvanda oluşturulan diyabet modellerinde sterilizasyon ve hayvanın bakım şartları çok daha zor olmakta ve hayvan kayıpları kaçınılmaz bir sorun haline

gelmektedir. Deney prosedüründen farklı değişkenler bu şekilde deney sürecini etkilemektedir.

Oysa yüksek glukozlu ortamda inkübasyon ile hayvan kayıplarının önüne geçilmekte ve deney anında oluşturulan bir model olduğundan diyabetik model oluşturma süreci için harcanan zamanın da ortadan kalkması mümkün olmaktadır.

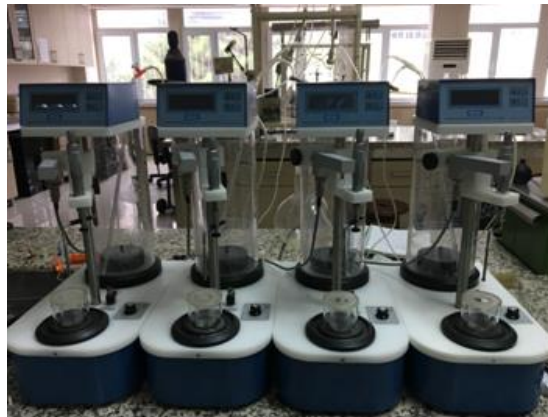
3.5. Deney Protokolü

3.5.1. Organ Banyosu Deneyleri

İzole Organ Banyosu

Çalışmamızda sıçan torasik aortasının kasılma-gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Kullandığımız ve mekanizması üzerinde çalıştığımız ajanlarımızla, yolaklarda etkili inhibitörler denenerek gözlemler yapılmıştır.

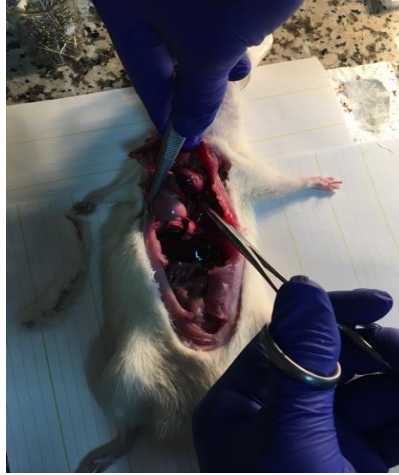
Sistemin hazırlanması: Sistemimizde 4 adet izole organ banyosu bulunmaktadır (Şekil 3-6). Her deney öncesi ve sonrasında temizlenen sistemin ısısı sirküle eden sıcak su ile sağlanmaktadır. Böylece hem sistem hem de deneylerde kullanılan fizyolojik sıvı olan Krebs solüsyonu 37°C’de tutulmaktadır. Hem sistemin stok haznesindeki hem de izole organ banyolarındaki Krebs solüsyonları sürekli olarak % 95 O₂ + % 5 CO₂ ile gazlandırılmaktadır. Her deney öncesi sistem 0 gerim ve 2gr’lık gerim için kalibre edilir ve deneye hazır hale getirilir.



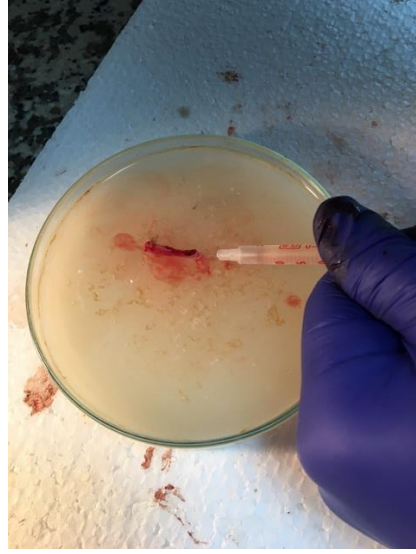
Şekil 3-6: İzole Organ Banyosu Deney Düzeneği

Preparatın hazırlanması: Sıçanlar tartılarak kullanılacak anestezi ajanlarının miktarı belirlendi. Ketamine HCl 40 mg/kg (Ketalar® 50mg/ml flakon, Pfizer İlaçları Ltd. Şti. İstanbul, Türkiye) + Ksilazin Hidrokorür 5 mg/kg (Rompun® 23.32mg/ml, 50 ml flakon, Bayer Türk Kimya San. Tic. Ltd. Şti, İstanbul, Türkiye) periton içerisine (i.p.) uygulanarak uygun dozda anestezi sağlandı.

Cerrahi girişim için sıçanlar beyaz bir plaka üzerine sabitlendi (Şekil 3-7). Masa ışığı altında orta hattın açılarak aortanın yeri tespit edildikten sonra üst tarafından klemlenerek damar sabit bir şekilde tutulmuş oldu. Etrafındaki dokuları almadan kesmeye çalışılarak hızlıca aorta çıkarıldı. Damar, önceden hazırlanmış ve oksijenlenmiş Krebs solüsyonu bulunan petri kabına alındı (Şekil 3-8). Damar içerisinden enjektör yardımıyla yavaşça Krebs solüsyonu geçirildi ve böylece damar içerisindeki kan boşaltılarak pıhtı oluşumu ve dolayısıyla damar endotelinin hasarlanması engellendi. Tüm yağ ve diğer dokulardan temizlenen damardan yaklaşık 3mm kesitler alınarak karbojen ile gazlandırılan ve kontrol grupları için 11 mM, yüksek glukoz grupları için 44 mM glukoz içeren beherlerde 2 saat bekletildi. Damar halkalarından stripler hazırlandı ve özel kliplere tutturularak sisteme asıldı. Damara uygulanan gerim 2gr olarak ayarlandı ve stabilizasyon için 45 dakika beklendi. Bu süre içerisinde fizyolojik sıvı 15 dakikada bir değiştirildi.



Şekil 3-7: Ratın aorta çıkarılmadan önce sabitlenmesi



Şekil 3-8: Torasik aortanın kan ve pıhtılardan temizlenme aşaması

Deney prosedürü: Deney aşaması alınan aort kesitlerinin düzeneğe asılıp 2 gr gerim verilmesi ile başlar. 45 dakikalık stabilizasyon süresinde yüksek glukozlu grupların banyolarına dışarıdan yüksek glukozlu solusyon, diğer banyolara ise sistemden Krebs solüsyonu verilir. Süre bitiminde ajanlar her grup için normal glukozlu standart Krebs solüsyonunda uygulanarak deneye başlanır. Tüm deney gruplarında Noradrenalin ve Asetilkolin Doz- Yanıt deneyleri yapılacaktır:

Noradrenalin Doz-Yanıt Deneyi: Doz-yanıt deneyleri için noradrenalin (NA) (10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5}) dozlarında uygulanır. Bu uygulama sonrası kasılan damarın normale dönmesi için yaklaşık 1-1,5 saat kadar bekleme süresi gerekmektedir. Bu sürede 15'er dakika aralıklarla banyo ortamı yıkanarak yeni Krebs girişi sağlanır.

Asetilkolin Doz-Yanıt Deneyi: her preparatta NA uygulandığında çıkan deney sonuçlarına bakılarak bir subterapötik doz belirlenir. Maksimum etkinin gözlemlendiği dozun bir önceki Sub-terapötik doz NA uygulanmasından sonra Asetilkolin (Ach) (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4}) dozlarında uygulanır.

Deney sonunda organ banyosundaki damarlar alınarak ıslak ağırlıkları tartılır ve hesaplamalar için kaydedilir.

Deney Grupları:

1. Kontrol grubu (NK)
2. Yüksek Glukoz (YG) 44mM kontrol grubu (Qian ve ark., 2006)
3. Mannitol Kontrol Grubu (Qian ve ark., 2006)
4. Minosiklin 10 μ M Kontrol Grubu
5. Minosiklin 20 μ M Kontrol Grubu
6. YG 44mM + Minosiklin 10 μ M Tedavi Grubu
7. YG 44mM + Minosiklin 20 μ M Tedavi Grubu
8. YG 44mM+ Minosiklin 10 μ M + 10⁻⁴mM SP600125 (JNK Blokeri) Tedavi Grubu (Ok ve ark. 2014)
9. YG 44mM+ Minosiklin 10 μ M + 10⁻⁴ mM U0126 (ERK Blokeri) Tedavi Grubu (Ok ve ark. 2014)
10. YG 44mM+ Minosiklin 10 μ M + 10⁻⁴mM U0126 + 10⁻⁴mM SP600125 Tedavi Grubu

Kontrol grupları (1,3,4,5) 2 saat Krebs çözeltilisi (11 mM glukoz) içerisinde; Yüksek Glukoz grupları (2,6-10) 2 saat yüksek glukozlu (44 mM glukoz) Krebs çözeltilisi içerisinde iki saat % 95 O₂ + % 5 CO₂ ile gazlandırılarak bekletilecektir. Tedavi edici ajanın uygulandığı gruplar (6-10) yüksek glukoz öncesi 30 dakika gruba ait inhibitör ajana maruz bırakılacak ve daha sonra yüksek glukoz bekleme süresinde de bu ajana maruziyet devam edecektir. Bloker uygulanan gruplarda blokerler Minosiklin ile birlikte verilerek inkübasyon sağlanacaktır.

Deney Grupları	2 saat Normal İnkübasyon	2 Saat YG İnkübasyon	2 Saat Mannitol İnkübasyon	SP600125 İnkübasyon	U0126 İnkübasyon
Kontrol	x				
Yüksek Glukoz (YG) 44mM Kontrol Grubu		x			
Mannitol Kontrol Grubu	x				
Minosiklin 10μM Kontrol Grubu	x		x		

Minosiklin 20µM	x				
Kontrol Grubu					
YG 44mM+10µM		x			
Tedavi Grubu					
YG 44mM+20µM		x			
Tedavi Grubu					
YG+Mino10µM+10-4		x		x	
SP600125 (JNK					
Blokeri)					
YG+Mino10µM+10-4		x			x
U0126 (ERK Blokeri)					
YG+Mino10µM+10-4		x		x	x
SP600125+ 10-4 U0126					

3.5.2. Biyokimyasal Ölçümler

3.5.2.1. Homojenizasyon İşlemleri

Organ banyosunda damar yanıtları değerlendirildikten sonra alınan damar kesitleri homojenize edilmiştir.

Homojenizasyon için paslanmaz çelik bilyeler ve homojenizatör kullanılmıştır. İşlemler Next Advance markalı Bullet Blender isimli homojenizatör ile gerçekleştirildi. Bu homojenizatör ile kullanılacak sıçan aorta dokusuna uygun 0,9-2,0mm boyutunda paslanmaz çelik homojenizasyon bilyeleri seçildi (Next advandec sitesinde belirlenen boyutlarda).

Organ banyosunda kullanılan damar kesitleri alınarak tartıldı. Eppendorf tüpün içerisine konularak yaklaşık olarak aynı ağırlıkta bilyeler de eppendorf tüplere eklendi. Miktarı göre 5XPBS (Fosfat Tampon Çözeltisi) (Sigma aldrich, ABD) da tüplere konularak kapatıldı. Kapakların açılma ihtimaline karşı her biri tek tek parafinlenerek homojenizatöre yerleştirildi. Dokuların ısıdan zarar görmesini engellemek adına 8 hızında 4 dakika çalıştırıldı, 1 dakika buzda bekletilip tekrar 4 dakika daha çalıştırıldı.

Homojenizasyonda, dokuların tamamen parçalandığından emin olduktan sonra 1400rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni bir eppendorfa

aktarıldı ve homojenizasyon işlemi tamamlanmış oldu. Hazır haldeki homojenatlar ELISA deneylerinin yapılacağı güne kadar -80°C 'de saklandı. Deneylerin bir gün öncesinde -20°C ye alınıp son gün $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanarak deneyler gerçekleştirildi.

Homojenizatlarda oksidatif stresin derecesini ölçmek ve antioksidan kapasiteyi değerlendirmek için Total antioksidan kapasitesi (TAS), Total oksidan kapasite (TOS) ölçümleri yapılmıştır. Nrf2 yolağının aktive olmasıyla sentezinde değişiklik olması beklenen Heme-oksijenaz1 (HO-1) enziminin düzeyleri ölçülerek Nrf2 aktivasyonu değerlendirilmesi yapılmış olup, Nitrik oksit sentaz (NOS) ölçümleriyle damar gevşeme yanıtlarında bir diğer parametre olan nitrik oksit etkisi gözlemlenmiştir. Tüm ölçümler hem tedavi gruplarında hem de kontrol gruplarında yapılmıştır. ICAM-1 ve VCAM-1 ölçümleri yapılarak hücrelerde ve damar özelindeki hasar değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır.

Ölçümler enzim immünassay (ELISA) prosedürlerine göre yapılmış olup, ticari kitin bu ölçümler için ticari kitler kullanılmıştır.

3.5.2.2. ELISA Deneyleri

Çalışmanın biyokimyasal ölçümleri ELISA metodu kullanılarak ticari kitler ile yapılmıştır. ELISA yönteminin ana prensibi antijen-antikor ilişkisi dikkate alınarak oluşturulmuştur. Ölçüm yapılacak madde için işaretleyici olarak enzim kullanılır. Alınan kitlerde örneklerin konulacağı kuyularda ölçülecek parametreye ait antikor veya antijen bulunur. Substratla bir araya geldiğinde spektrofotometrik olarak ölçülebilecek renk değişikliği meydana gelir ve miktar tayini önceden belirli standartlar ile çizilen grafiğe göre belirlenir.

Yöntemde ölçüm yapılacak madde kitin prosedürüne göre kuyulara eklenir ve inkübasyon sonrasında belirli aşamalarda yıkama işlemleri yapılarak tutulmayan farklı maddelerin uzaklaşması sağlanır ki, ölçümde etkileri olmasın. İnkübasyon ve yıkamalar sonrasında kuyuya kromojen madde eklenerek işlem sonlandırılır ve ölçüm yapılır.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Kasılma ve gevşeme yanıtları: Organ banyosu deneylerinde kasılma ve gevşeme yanıtları ‘mg gerim / mg ıslak ağırlık’ değerleri ile hesaplanmış olup buradan çıkan veriler ile Schild eğrisi çizilmiştir. Gruplara ait Schild eğrileri two way ANOVA ile karşılaştırılmış olup post-test olarak Bonferroni’s ve Tukey testi kullanılmıştır.

pD₂ ve E_{max} hesaplanması: Schild eğrilerinden grupların pD₂ ve E_{max} değerleri hesaplanmıştır. Hesaplama için gruplara ait “ortalama ± standart hata” değerleri ve n sayıları girilerek one way ANOVA ve post-test olarak Tukey kullanılıp kolon analizi yapılmıştır.

ELISA verileri karşılaştırması: Deney gruplarının ELISA verilerinin ikili karşılaştırmalarının analizinde *student t* testi kullanılmıştır.

Tüm istatistiksel hesaplamalarda ‘p’ değeri 0,05’ten küçük olan karşılaştırmalar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Damar Kasılma ve Gevşeme Yanıtları

Damar yanıtları karşılaştırırken izleyebilme kolaylığı açısından toplam 10 olan grup sayısı gruplar halinde ayrı ayrı gösterilmiştir (Tablo 4-1). Gevşeme ve kasılma yanıtları için de her gruba ait % gevşeme, mg/mg kasılma, pD₂ ve E_{max} karşılaştırmaları aşağıda gösterilmiştir.

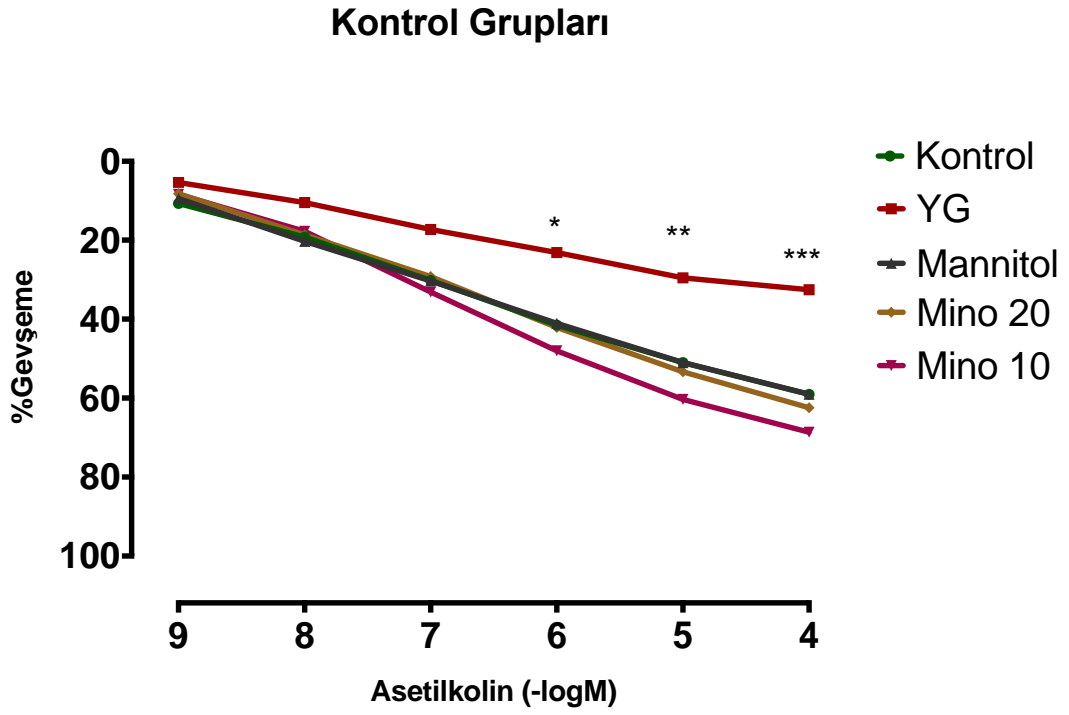
Tablo 4-1: Deney Grupları isimleri

GRUPLAR		
KONTROL	TEDAVİ	İNHİBİTÖR
Kontrol	Kontrol	Kontrol
YG	YG	YG
Mannitol	Mino 10 + YG	Mino 10 + YG
Mino 10	Mino 20 + YG	Mino 10 + YG + SP
Mino 20		Mino 10 + YG + UO
		Mino 10 + YG + MIX

4.1.1. Damar Gevşeme Yanıtları (Ach)

4.1.1.1. Kontrol Grupları Gevşeme Yanıtları Karşılaştırılması

Kontrol grupları arasındaki gevşeme %'leri karşılaştırıldığında Şekil 4-1'de görüldüğü gibi son 3 dozda (10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4}) kontrole göre YG grubunda anlamlı bir şekilde azalma görülmüştür. Diğer gruplar (Mannitol, Mino 10, Mino 20) ile Kontrol arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.



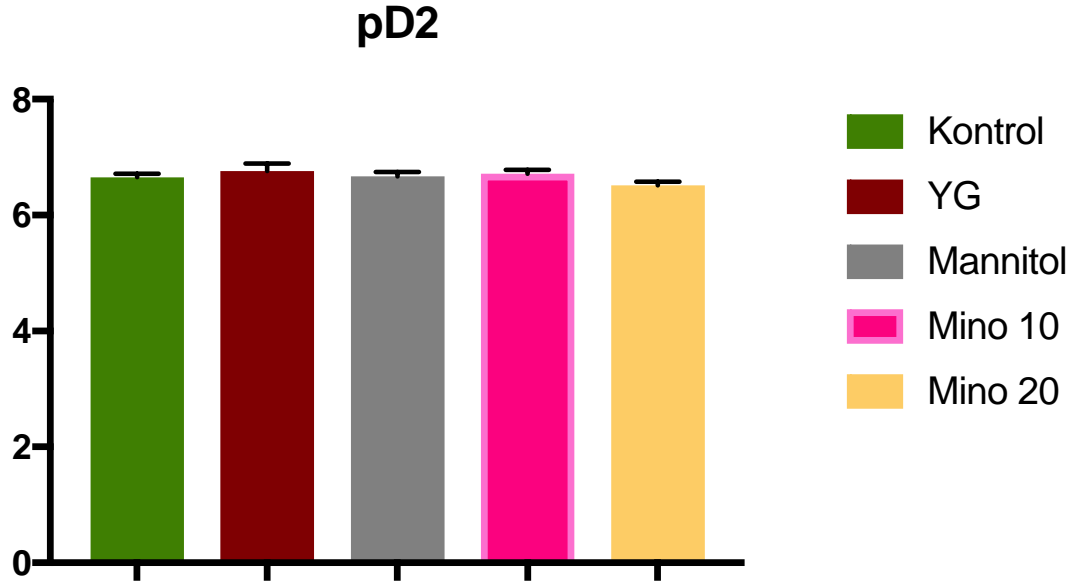
Şekil 4-1: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 20 Gruplarının %Gevşeme Doz-Yanıt Grafiği

*; kontrole göre $p < 0,05$

**; kontrole göre $p < 0,01$

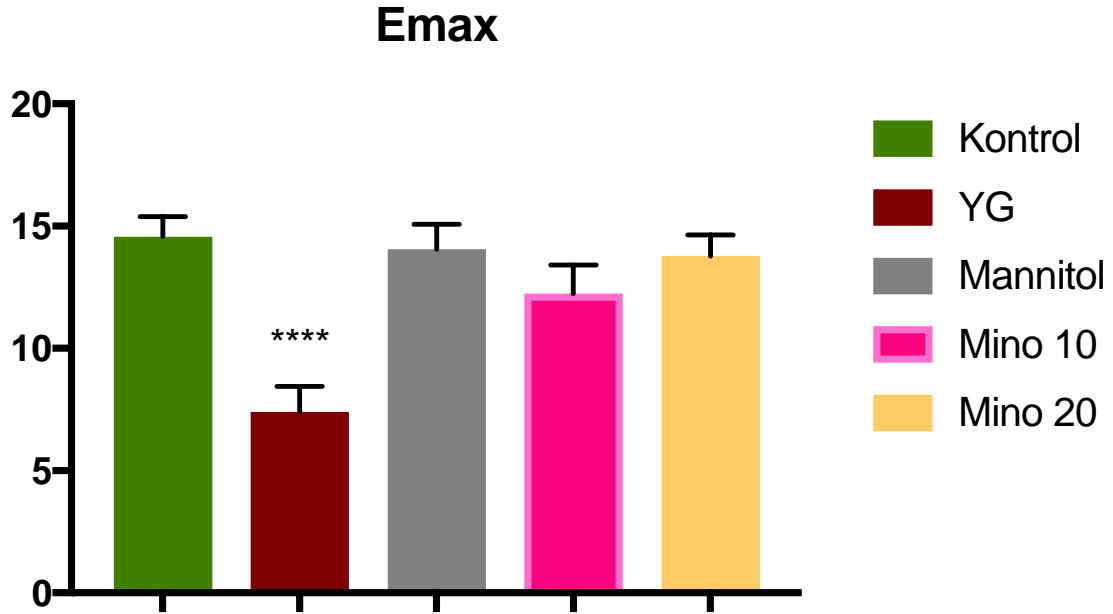
***; kontrole göre $p < 0,001$

Kontrol grupları arasında pD2 karşılaştırılması yapıldığında; gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 20 Gruplarının pD2 Grafiği

Emax değerlerindeki farklılığa baktığımızda; YG grubunda Emax değeri kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p < 0,0001$) (Şekil 4-3). Diğer gruplar ile Kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4-3: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 20 Gruplarının Emax Grafiği

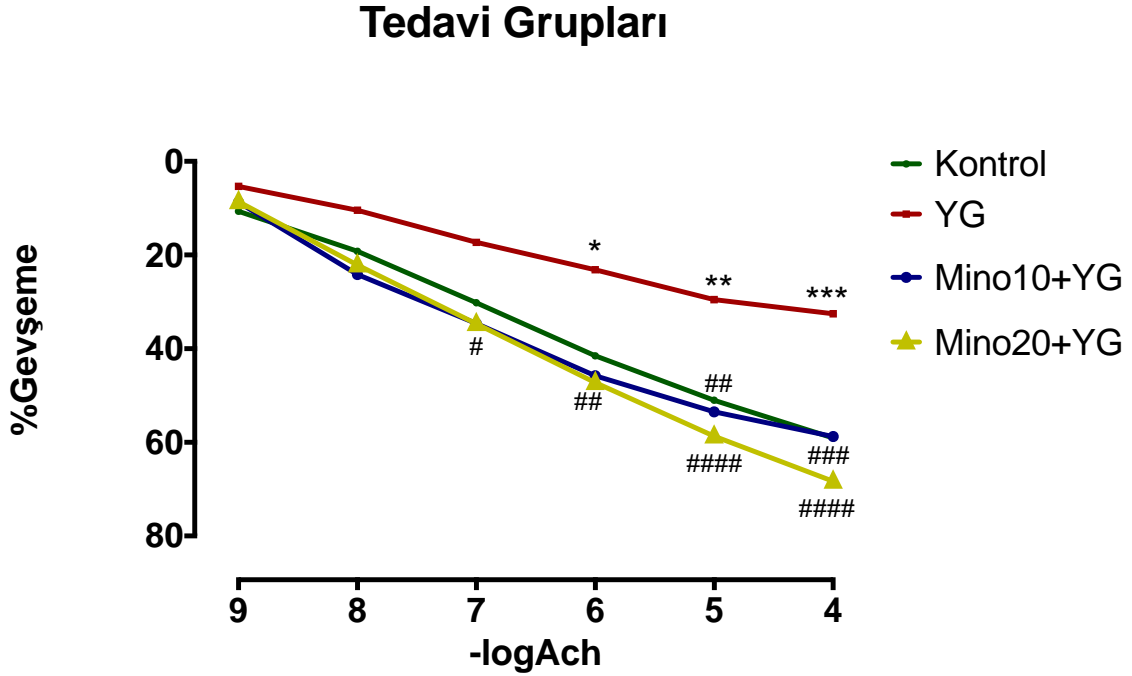
*; kontrole göre $p < 0,05$

****; kontrole göre $p < 0,0001$

4.1.1.2. Tedavi Grupları Gevşeme Yanıtları Karşılaştırması

Tedavi grupları arasındaki artan dozlara karşı gevşeme yanıt %'leri karşılaştırıldığında Kontrol grubunun gevşemesi YG grubuna göre anlamlı olarak daha fazladır. Şekil 4-4'de görüldüğü gibi 4 dozda (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4}) Mino 20+ YG grubu YG grubundan daha fazla gevşeme göstermiştir.

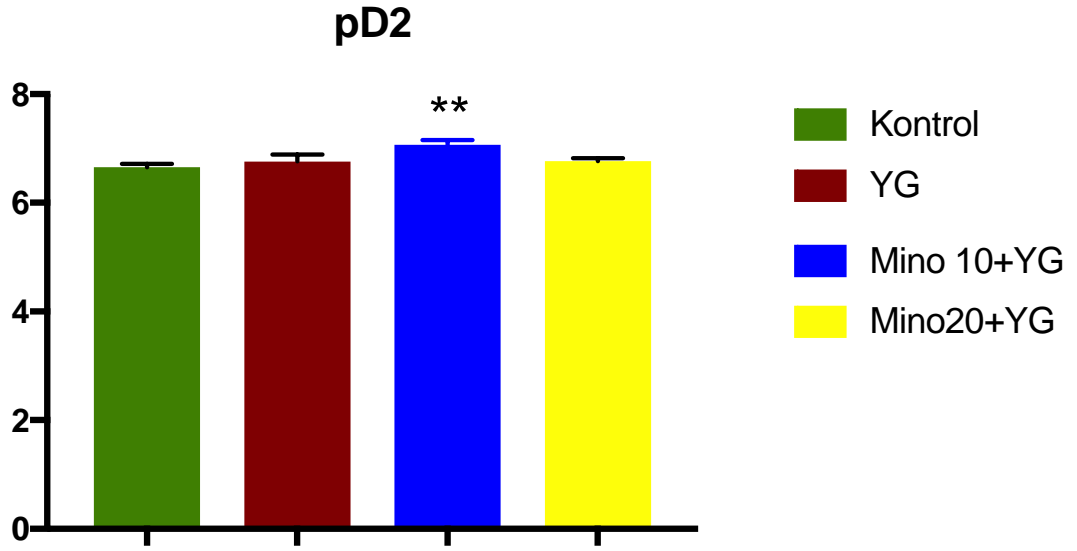
Mino 10 + YG grubunun YG'ye göre son 2 dozda (10^{-5} ve 10^{-4}) % gevşemesi anlamlı olarak daha fazladır (Şekil 22).



Şekil 4-4: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino20+YG Grupları % Gevşeme Doz-Yanıt Grafiği

- *; kontrole göre $p < 0,05$
- **; kontrole göre $p < 0,01$
- ***; kontrole göre $p < 0,001$
- #; YG'a göre $p < 0,05$
- ##; YG'a göre $p < 0,001$
- ###; YG'a göre $p < 0,0001$

Tedavi grupları arasında pD2 değerlerinin karşılaştırılması yapıldığında; Kontrole göre Mino 10 + YG grubunun pD2 değeri anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0,01$) (Şekil4-5).

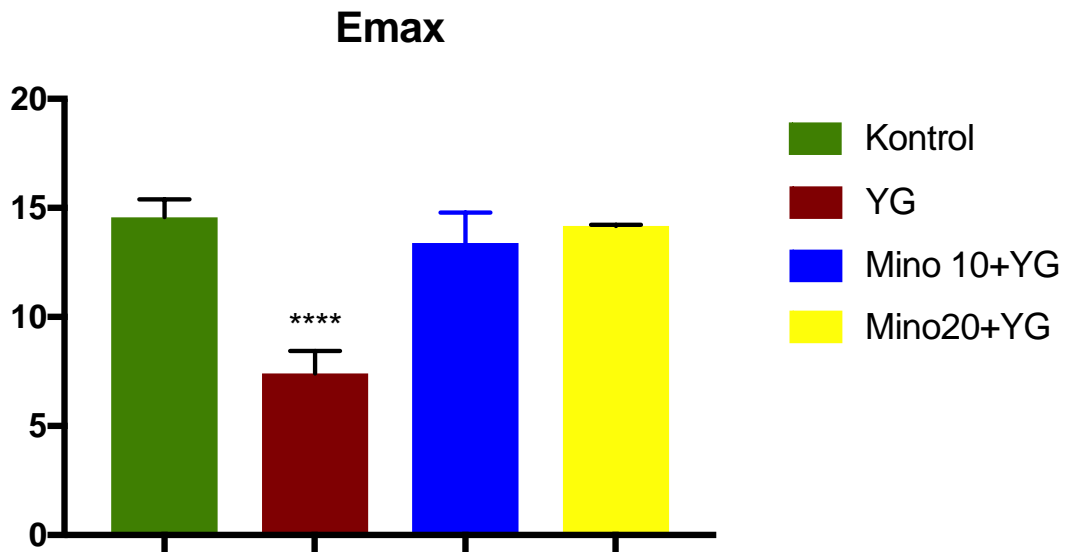


Şekil 4-5: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino20+YG Grupları pD2 Grafiği

*; kontrole göre $p < 0,05$

**; kontrole göre $p < 0,01$

Kontrol grupları arasında Emax değerlerindeki farklılığa baktığımızda; YG grubunda Emax değeri kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. Diğer gruplar ile Kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino20+YG Grupları Emax Grafiği

*; kontrole göre $p < 0,05$

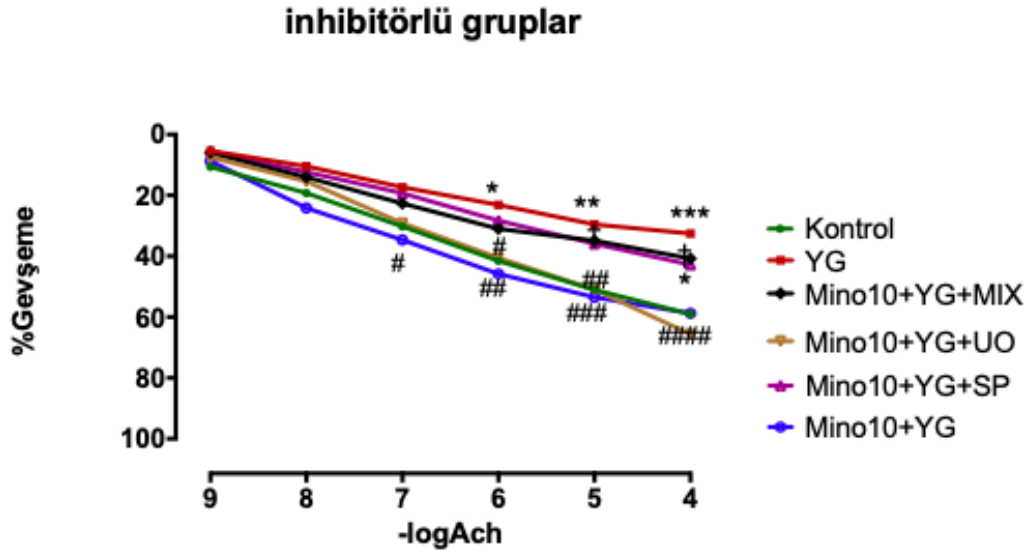
****; kontrole göre $p < 0,0001$

4.1.1.3. İnhibitör Grupları Gevşeme Yanıtları Karşılaştırması

İnhibitörlü gruplar, kontrol, yüksek glukoz ve tedavi grubu arasındaki artan dozlara karşı gevşeme yanıt %'leri Şekil 4-7'de görülmektedir. YG grubunun son 4 dozda (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4}) % gevşemesi Mino 10+ YG grubuna göre yüksekken; Kontrol ve Mino 10+ YG +UO gruplarından ise son 3 dozda (10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4}) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

YG ve Mino 10 + YG grupları arasında da son 2 dozda (10^{-5} ve 10^{-4}) anlamlı bir fark görülmüştür. Mino 10 + YG grubunun % gevşemesi daha fazladır.

Mino 10+YG+SP grubunun ise; 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} dozlarında Mino 10+YG grubuna göre % gevşemesi anlamlı olarak düşüktür.



Şekil 4-7: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+SP ve Mino10+YG+MIX gruplarının %Gevşeme Doz-Yanıt Grafiği

*; Kontrole göre $p < 0,05$

**; Kontrole göre $p < 0,001$

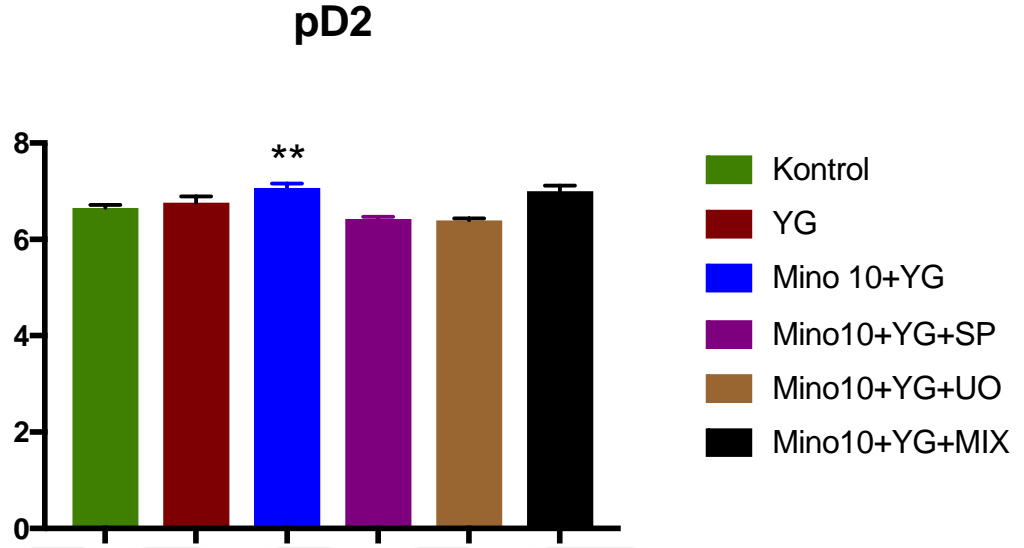
***; Kontrole göre $p < 0,0001$

#; YG'a göre $p < 0,05$

##; YG'a göre $p < 0,01$

###; YG'a göre $p < 0,001$

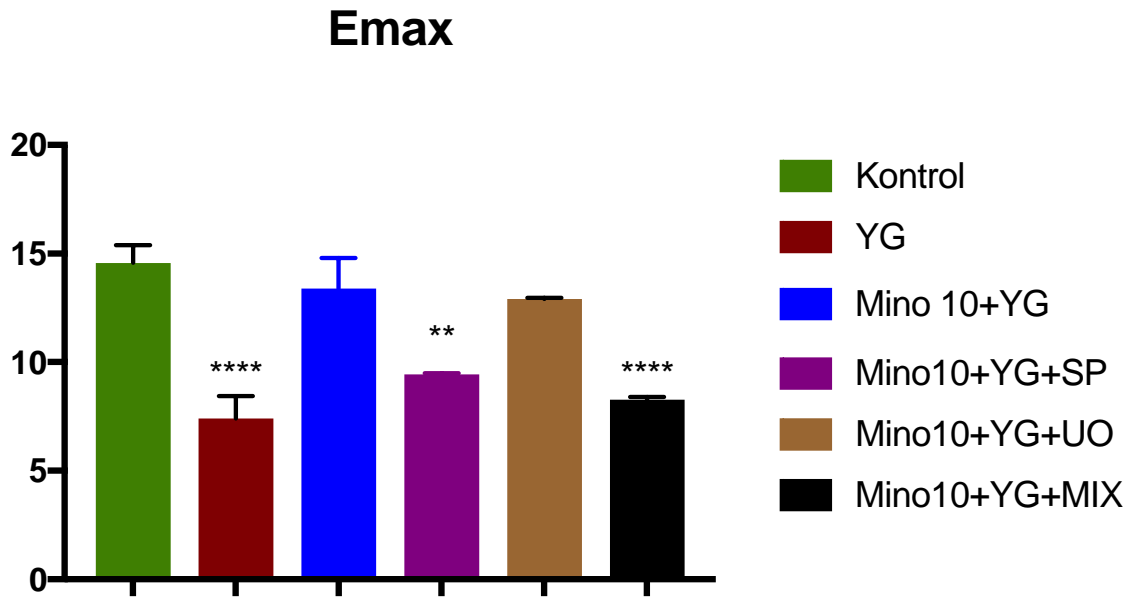
İnhibitörlü gruplar arasında pD2 değerlerinin karşılaştırılması yapıldığında; sadece kontrole göre Mino 10 + YG grubunun pD2 değeri anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+SP ve Mino10+YG+MIX gruplarının Gevşeme pD2 Grafiği

*; kontrole göre $p < 0,05$

Emax değerlerindeki farklılığa baktığımızda; YG grubunda Emax değeri kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. Diğer gruplar ile Kontrol grubu karşılaştırmasında ise; Mino10+YG+SP grubunun da Emax değeri kontrole göre anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Mino10+YG+MIX grubunun Emax değeri de kontrole göre anlamlı olarak düşüktür ($p<0,0001$) (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+SP ve Mino10+YG+MIX Gruplarının Gevşeme Emax Grafiği

*; kontrole göre $p < 0,05$

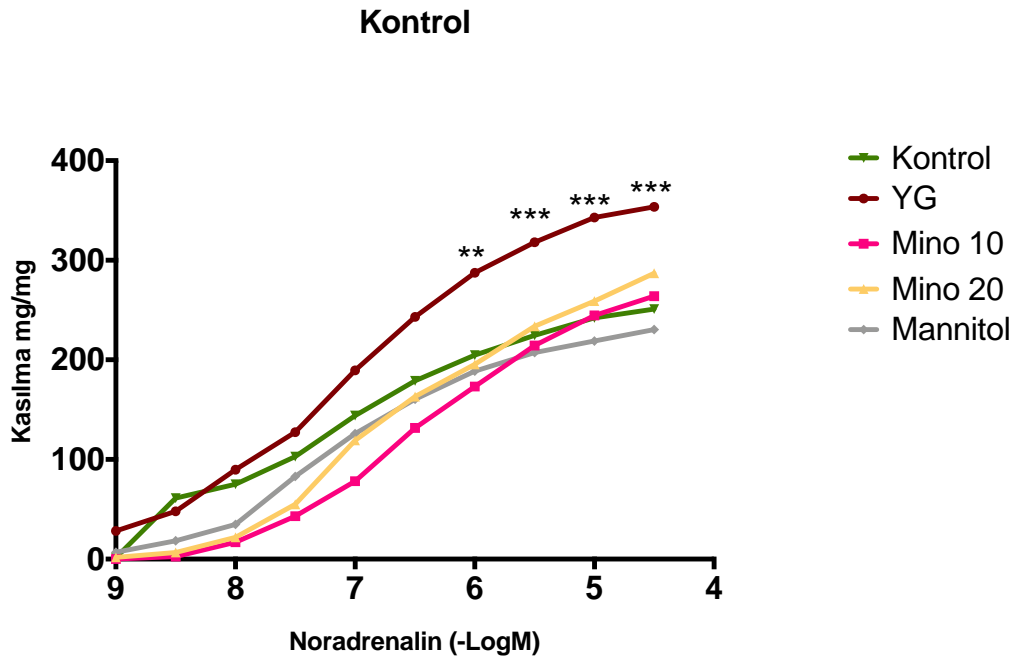
**; Kontrole göre $p < 0,001$

***; Kontrole göre $p < 0,0001$

4.1.2. Damar Kasılma Yanıtları

4.1.2.1. Kontrol Gruplarının Kasılma Yanıtları Karşılaştırılması

Noradrenalinin artan dozlarında kasılma yanıtları karşılaştırıldığında YG grubunun kasılma verileri kontrolden 5 dozda (10^{-6} , 3×10^{-6} , 3×10^{-5} , 10^{-5} ve 10^{-4}) anlamlı olarak yüksekken diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4-10).



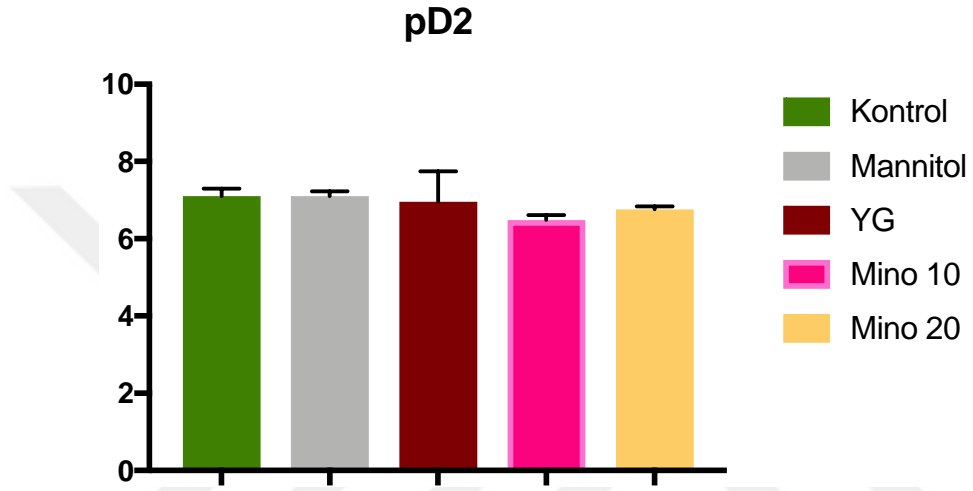
Şekil 4-10: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 20 Gruplarının Kasılma Doz-Yanıt Grafiği

*; kontrole göre $p < 0,05$

**; Kontrole göre $p < 0,001$

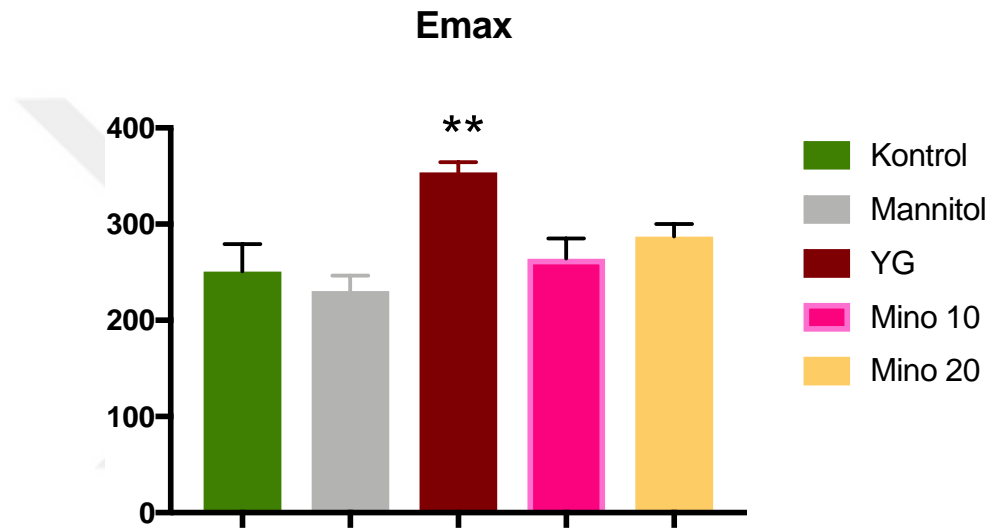
***; Kontrole göre $p < 0,0001$

Kontrol gruplarının kasılmadaki pD2 değerleri karşılaştırıldığında gruplar arası anlamlı bir fark görülmemiştir (şekil4-11).



şekil 4-11: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 20 Gruplarının Kasılma pD2 Grafiği

Kontrol grupları arasında kasılma Emax değerleri karşılaştırıldığında YG grubunun Emax değeri kontrole göre anlamlı olarak yüksekken ($p<0,001$); diğer gruplar ile kontrol arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-12).



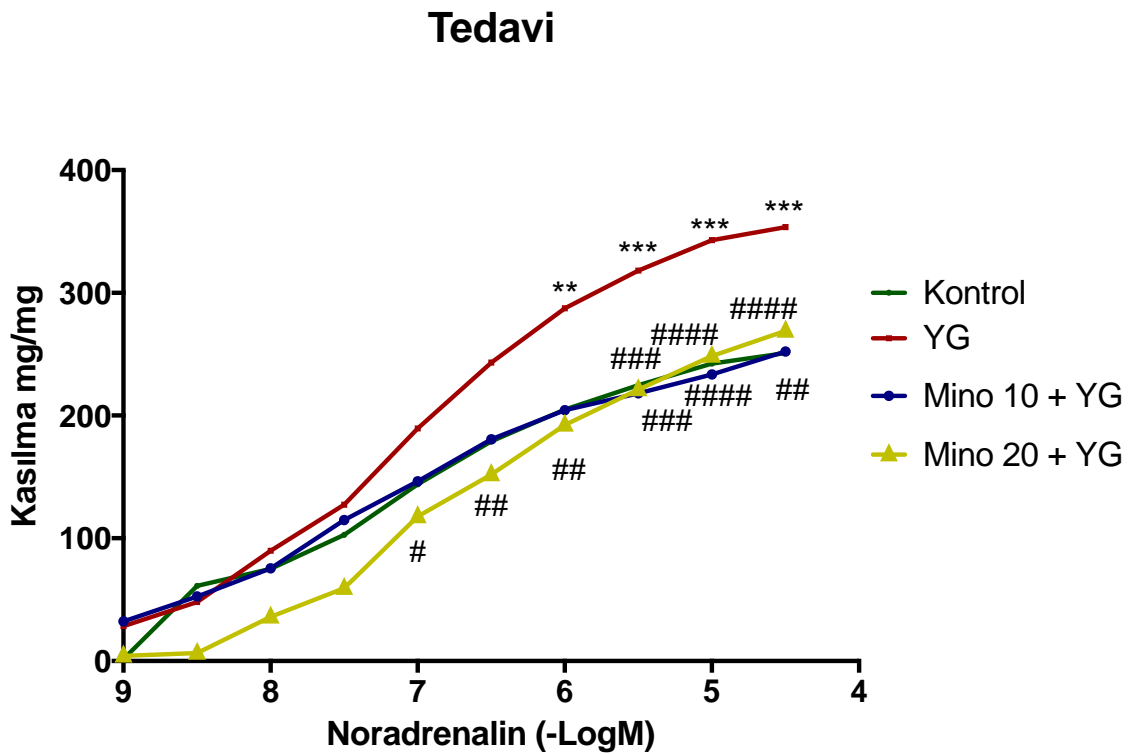
Şekil 4-12: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 20 Gruplarının Kasılma Emax Grafiği

**; Kontrole göre $p<0,001$

4.1.2.2. Tedavi Grupları Kasılma Yanıtları Karşılaştırması

Tedavi grupları kontrol ile karşılaştırıldığında iki doz için de (Mino10+YG ve Mino20+YG) anlamlı bir fark bulunamamıştır.

YG grubu ile tedavi grupları karşılaştırıldığında ise iki grup için de özellikle son dozlar için (3×10^{-6} , 3×10^{-5} , 10^{-5} ve 10^{-4}) YG grubuna göre kasılma yanıtlarında anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p < 0,0001$) (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino20+YG Grupları Kasılma Doz-Yanıt Grafiği

*; kontrole göre $p < 0,05$

**; Kontrole göre $p < 0,001$

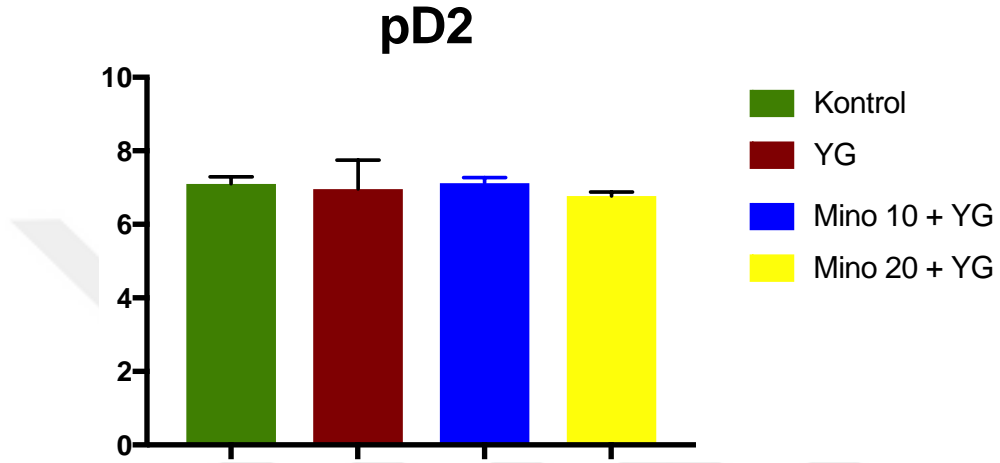
***; Kontrole göre $p < 0,0001$

#; YG'a göre $p < 0,05$

##; YG'a göre $p < 0,01$

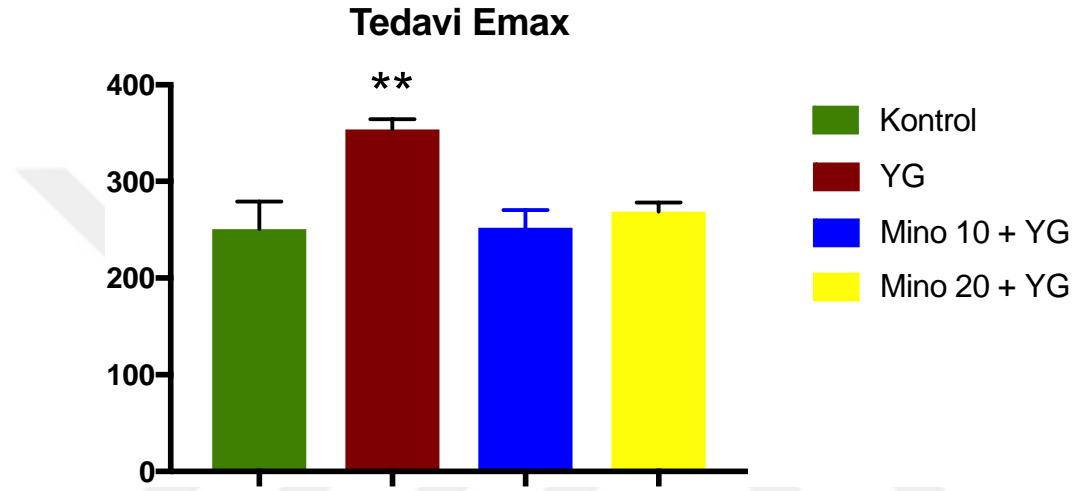
###; YG'a göre $p < 0,001$

Tedavi grupları ve kontrol grubunun pD2 değerleri karşılaştırıldığında gruplar arası anlamlı bir fark görülmemiştir (şekil 4-14).



şekil 4-14: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino20+YG Grupları Kasılma pD2 Grafiği

Kontrol grubu ile tedavi gruplarının (Mino10+YG, Mino20+YG) Emax değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmezken, YG grubunun maksimum kasılma değeri kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,01$) (şekil 4-15).



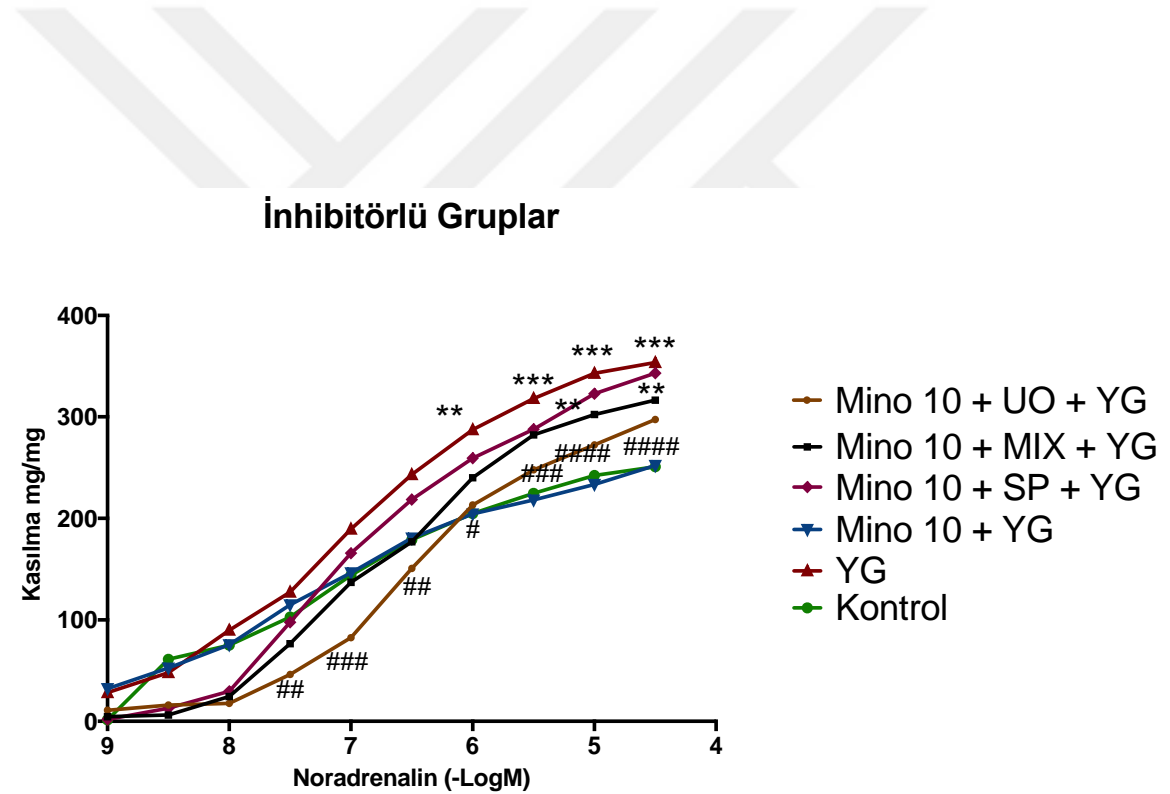
şekil 4-15: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino20+YG Grupları Kasılma Emax Grafiği

******; Kontrole göre $p<0,001$

4.1.2.3. İnhibitör Grupları Kasılma Yanıtları Karşılaştırması

İnhibitörlü gruplar kontrol ile karşılaştırıldığında, 3×10^{-5} ve 10^{-4} dozlarında Mino10+YG+SP grubunun kasılma değeri kontrole göre anlamlı olarak yüksektir ($p < 0,001$). Diğer inhibitörlü gruplar (Mino10+YG+UO ve Mino10+YG+MIX) ile kontrol arasında anlamlı bir fark gösterilmemiştir.

YG grubu ile inhibitörlü gruplar karşılaştırıldığında ise; Mino10+YG+UO grubunun kasılma değerleri anlamlı olarak daha düşükken diğer gruplar ile YG arasında anlamlı bir fark gösterilmemiştir (Şekil 4-16).



Şekil 4-16: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+SP ve Mino10+YG+MIX Gruplarının Kasılma Doz-Yanıt Grafiği

*; kontrole göre $p < 0,05$

**; Kontrole göre $p < 0,001$

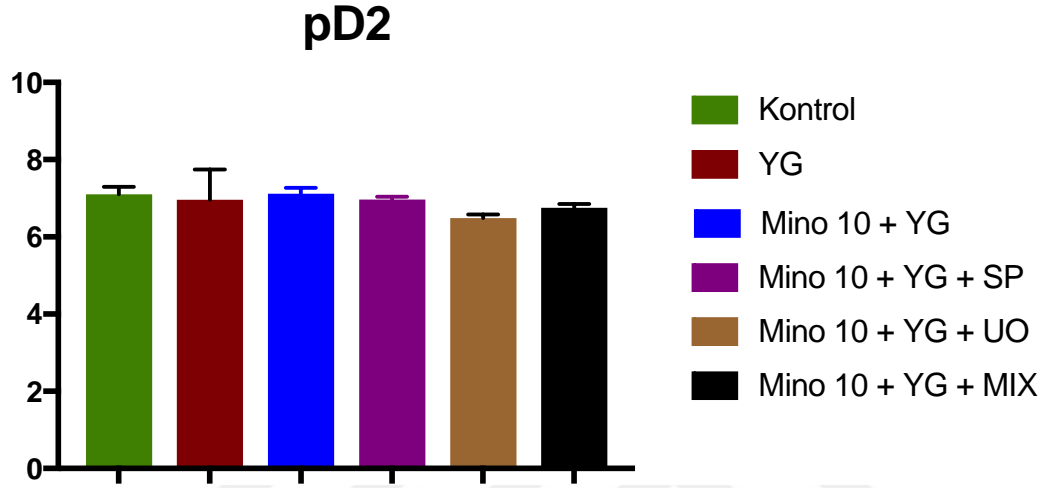
***; Kontrole göre $p < 0,0001$

#; YG'a göre $p < 0,05$

##; YG'a göre $p < 0,01$

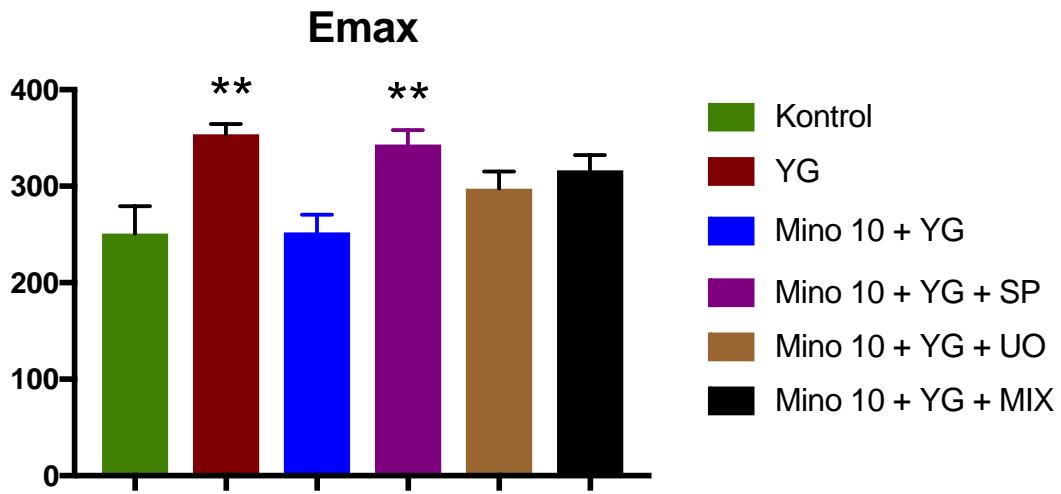
###; YG'a göre $p < 0,001$

Kontrol ve inhibitörlü grupların pD2 değerleri karşılaştırıldığında gruplar arası anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+SP ve Mino10+YG+MIX Gruplarının Kasılma pD2 Grafiği

İnhibitörlü grupların Emax değerleri karşılaştırıldığında, YG ve Mino10+YG+SP verileri kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-18).



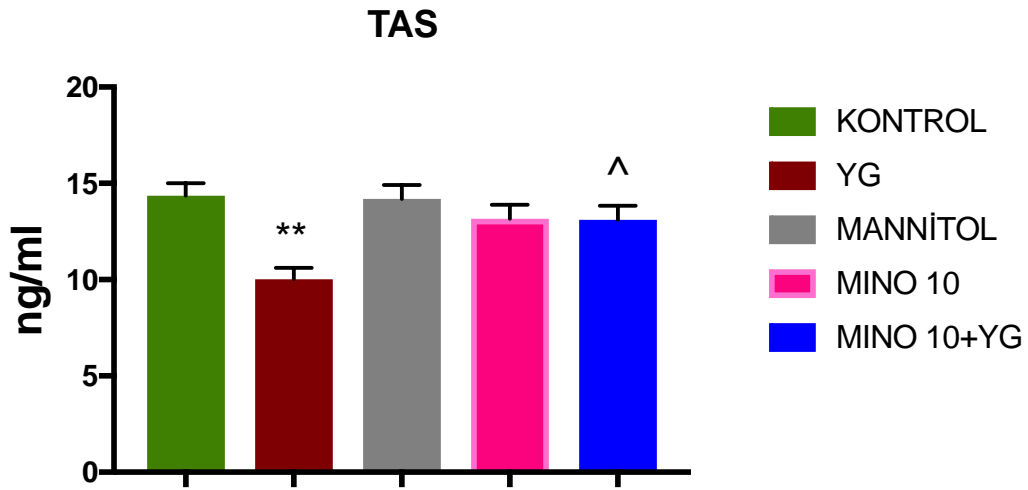
Şekil 4-18: Kontrol, YG, Mino10+YG, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+SP ve Mino10+YG+MIX Gruplarının Kasılma Emax Grafiği

****;** Kontrole göre $p<0,001$

4.2. Biyokimyasal Parametre Ölçümleri (ELISA Deneyleri Sonuçları)

4.2.1. TAS ELISA Ölçüm Sonuçları

Gruplar arası TAS (Total Antioksidan Kapasite) verileri değerlendirilmiştir. YG grubu kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Diğer gruplar ile kontrol arasında anlamlı bir fark görülmezken Mino 10+YG grubu verileri ise YG grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olup ($p<0,05$) kontrol ile anlamlı bir farkı görülmemiştir (Şekil 4-19).



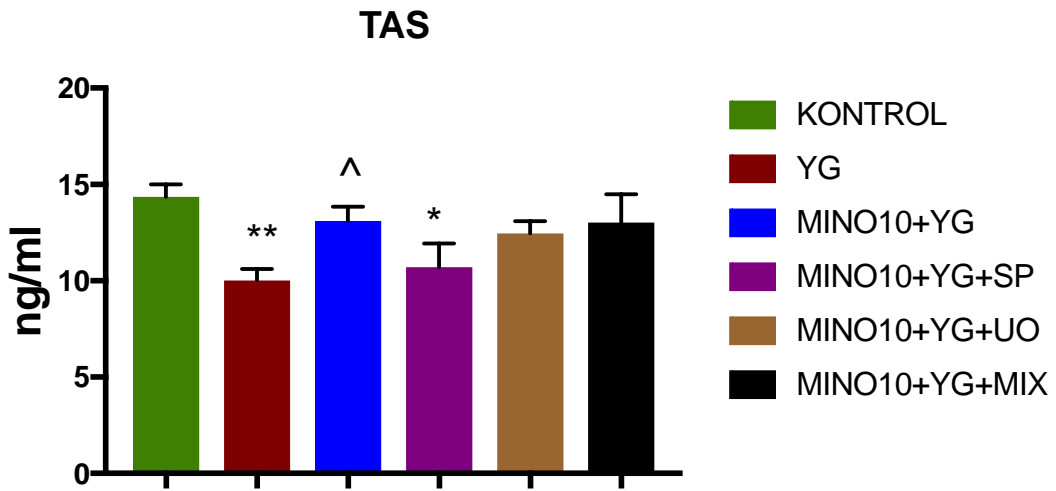
Şekil 4-19: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 10+YG grupları arası TAS değerleri karşılaştırılması

**; Kontrole göre $p<0,001$

^; YG göre $p<0,05$

İnhibitörlü gruplar ile kontrol ve YG grupları karşılaştırıldığında; YG ve Mino10+YG+SP grubu kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$). SP6125 (JNK inhibitörü) Mino10+YG grubundaki artışı tersine çevirmiştir. Kontrol ve diğer inhibitörlü gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Mino 10+YG grubu verileri YG'ya göre anlamlı olarak daha yüksekken ($p<0,05$). UO ve MIX inhibitörlü gruplar ile YG arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-20).



Şekil 4-20: Kontrol, YG, Mino 10+YG, Mino10+YG+SP, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+MIX grupları arası TAS değerleri karşılaştırılması

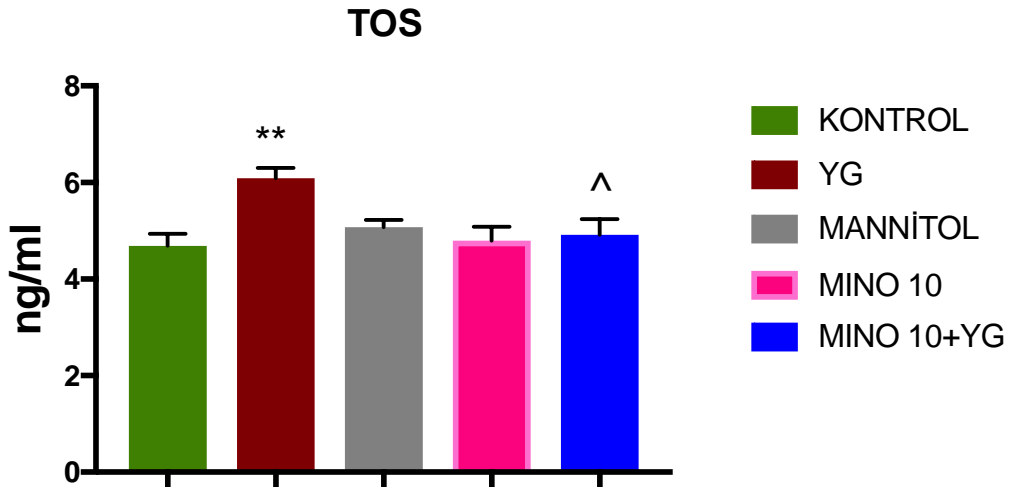
*; Kontrole göre $p<0,05$

**; Kontrole göre $p<0,001$

^; YG göre $p<0,05$

4.2.2. TOS ELISA Ölçüm Sonuçları

Gruplar arası TOS (Total Oksidan Kapasite) verileri değerlendirilmiştir. YG grubu kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Diğer gruplar ile kontrol arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Mino 10+YG grubu verileri ise YG grubuna göre anlamlı olarak düşük olup ($p<0,05$) kontrol ile arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-21).



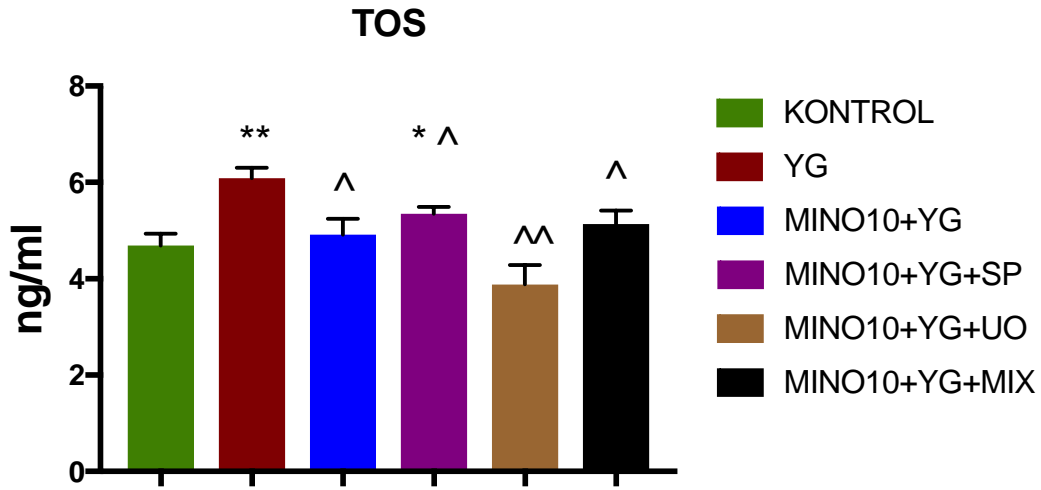
Şekil 4-21: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 10+YG grupları arası TOS değerleri karşılaştırılması

**; Kontrole göre $p<0,001$

^; YG göre $p<0,05$

İnhibitörlü gruplar ile kontrol ve YG grupları karşılaştırıldığında; Mino10+YG+SP grubu kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Aynı zamanda YG grubundan da anlamlı olarak düşüktür ($P<0,05$). Oksidan seviyeleri kontrole göre yükselse de YG grubu kadar yüksek bulunmamıştır.

Mino 10+YG tedavi grubu ($p<0,05$), Mino10+YG+SP ($p<0,05$), Mino10+YG+UO ($p<0,01$) ve Mino10+YG+MIX ($p<0,05$) grupları YG grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Şekil 4-22).



Şekil 4-22: Kontrol, YG, Mino 10+YG, Mino10+YG+SP, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+MIX grupları arası TOS değerleri karşılaştırılması

*; Kontrole göre $p<0,05$

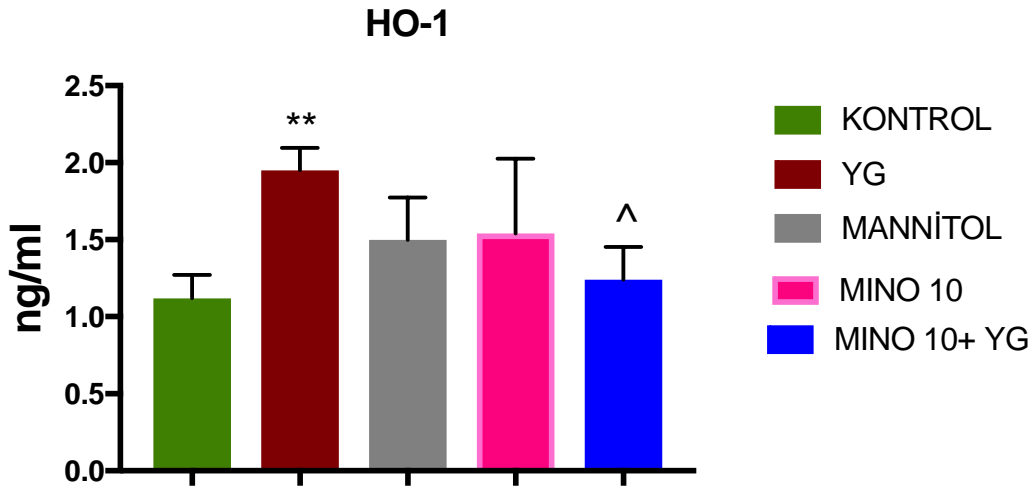
**; Kontrole göre $p<0,001$

^; YG göre $p<0,05$

^^; YG göre $p<0,01$

4.2.3. HO-1 ELISA Ölçüm Sonuçları

Gruplar arası HO-1 (Heme-oksijenaz-1) verileri değerlendirilmiştir. HO-1 oksidatif stres yolaklarının son ürünüdür. YG grubu kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Diğer gruplar ile kontrol arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Mino 10+YG grubu verileri ise YG grubuna göre anlamlı olarak düşük olup ($p<0,05$) kontrol ile arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-23).



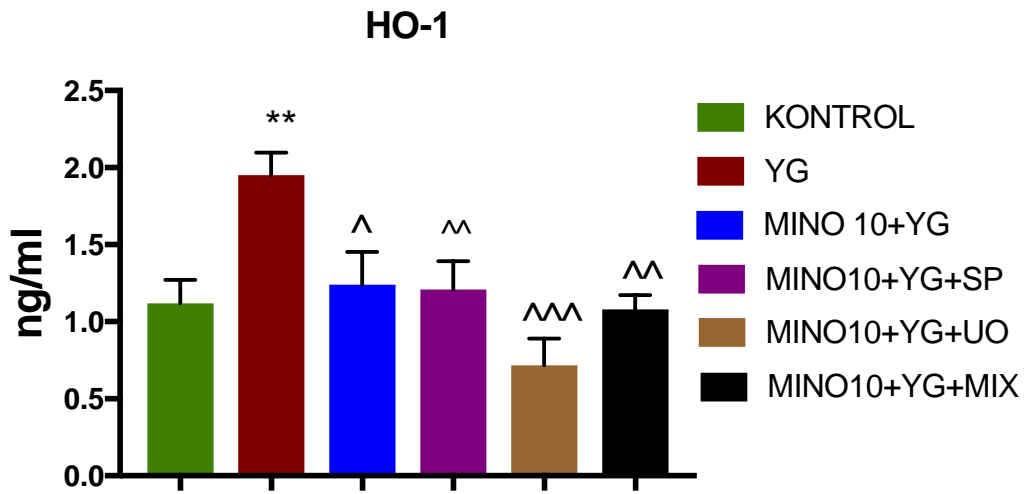
Şekil 4-23: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 10+YG grupları arası HO-1 değerleri karşılaştırılması

**; Kontrole göre $p<0,001$

^; YG göre $p<0,05$

İnhibitörlü gruplar ile kontrol ve YG grupları karşılaştırıldığında; YG grubu verileri kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Kontrol ve inhibitörlü gruplar ile kontrol arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Mino10+YG grubu verileri YG grubuna göre anlamlı olarak düşüktür ($p<0,05$). Ayrıca tüm inhibitörlü grup verileri; Mino10+YG+UO ($p<0,001$), Mino10+YG+MIX, Mino10+YG+SP ($p<0,001$) yüksek glukoza göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Şekil 4-24).



Şekil 4-24: Kontrol, YG, Mino 10+YG, Mino10+YG+SP, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+MIX grupları arası TOS değerleri karşılaştırılması

*; Kontrole göre $p<0,05$

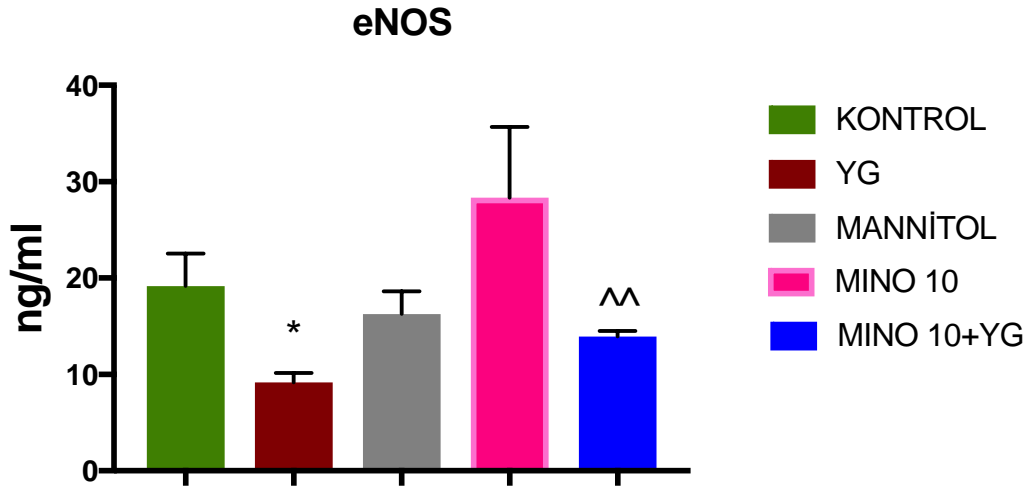
**; Kontrole göre $p<0,001$

^; YG göre $p<0,05$

4.2.4. eNOS ELISA Ölçüm Sonuçları

Gruplar arası eNOS verileri değerlendirilmiştir. YG grubu verileri kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer gruplar ile kontrol arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Mino 10+YG grubu verileri ise YG grubuna göre anlamlı olarak yüksek olup ($p<0,001$) kontrol ile arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-25).

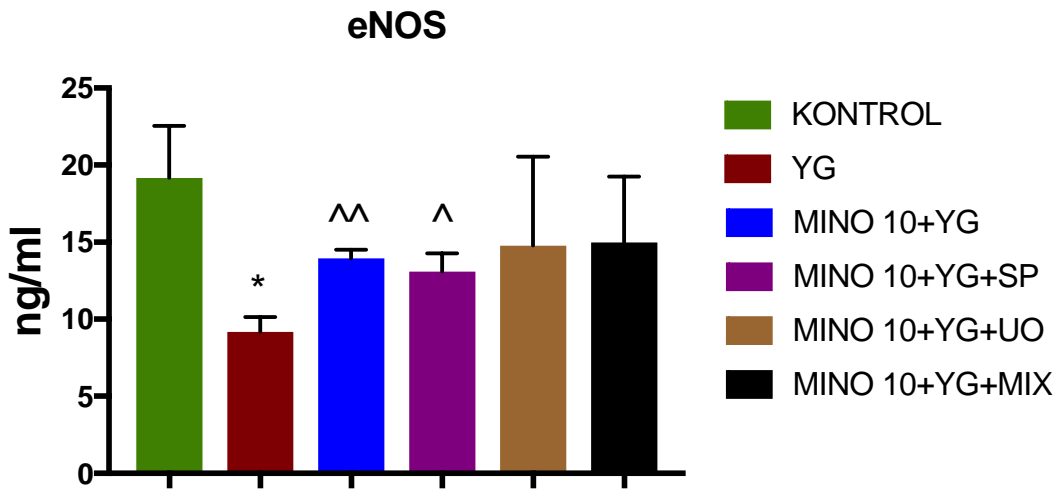


Şekil 4-25: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 10+YG grupları arası eNOS değerleri karşılaştırılması

*; Kontrole göre $p<0,005$

^^; YG göre $p<0,01$

İnhibitörlü gruplar ile kontrol ve YG grupları karşılaştırıldığında; YG kontrole göre anlamlı olarak düşüktür ($p<0,05$). Mino10+YG+SP grubu kontrole göre düşüş gösterse de anlamlı bir fark görülmezken YG grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer inhibitörlü gruplar ve kontrol ya da YG grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-26).



Şekil 4-26: Kontrol, YG, Mino 10+YG, Mino10+YG+SP, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+MIX grupları arası eNOS değerleri karşılaştırılması

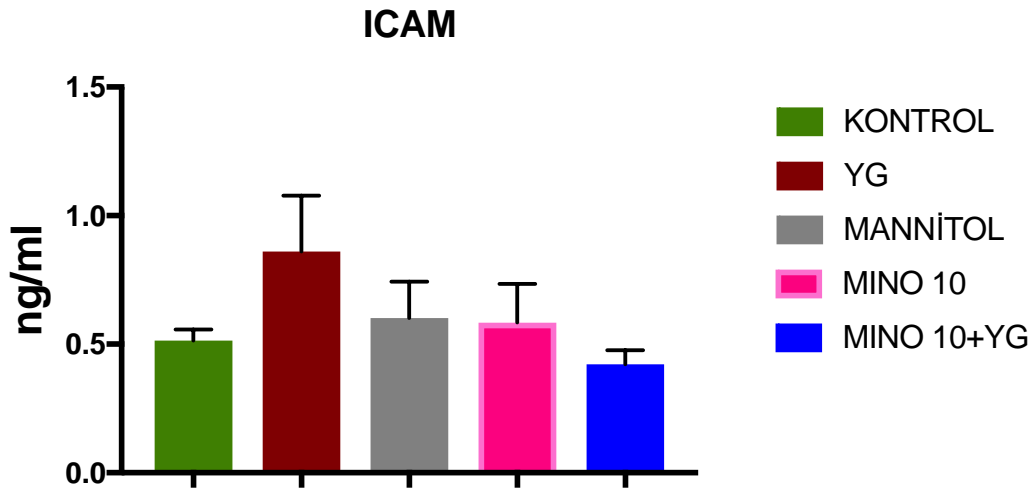
*; Kontrole göre $p<0,05$

^; YG göre $p<0,05$

^^; YG göre $p<0,01$

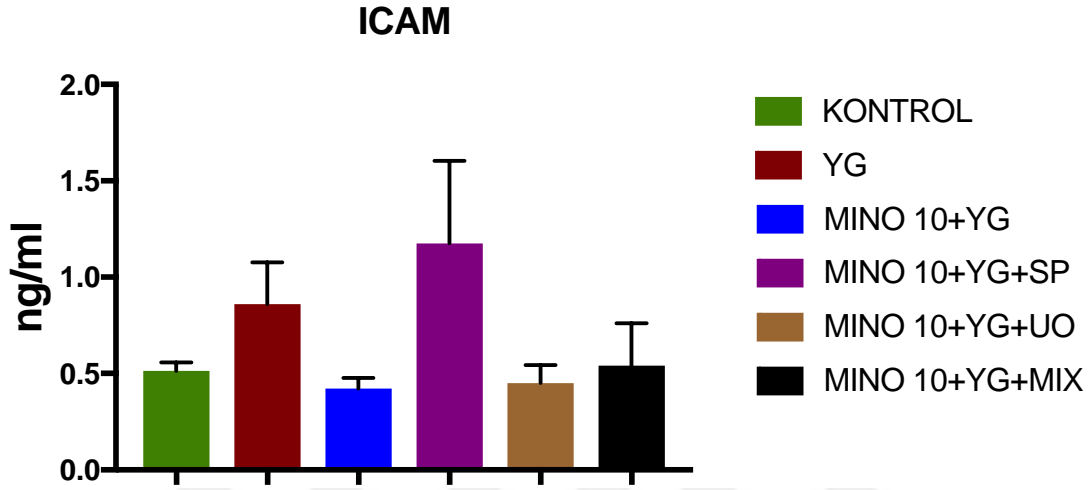
4.2.5. ICAM ELISA Ölçüm Sonuçları

Gruplar arası ICAM verileri değerlendirilmiştir. YG grubu verileri kontrole göre yüksek olsa da anlamlı bir fark görülmemiştir. Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-27).



Şekil 4-27: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 10+YG grupları arası ICAM değerleri karşılaştırılması

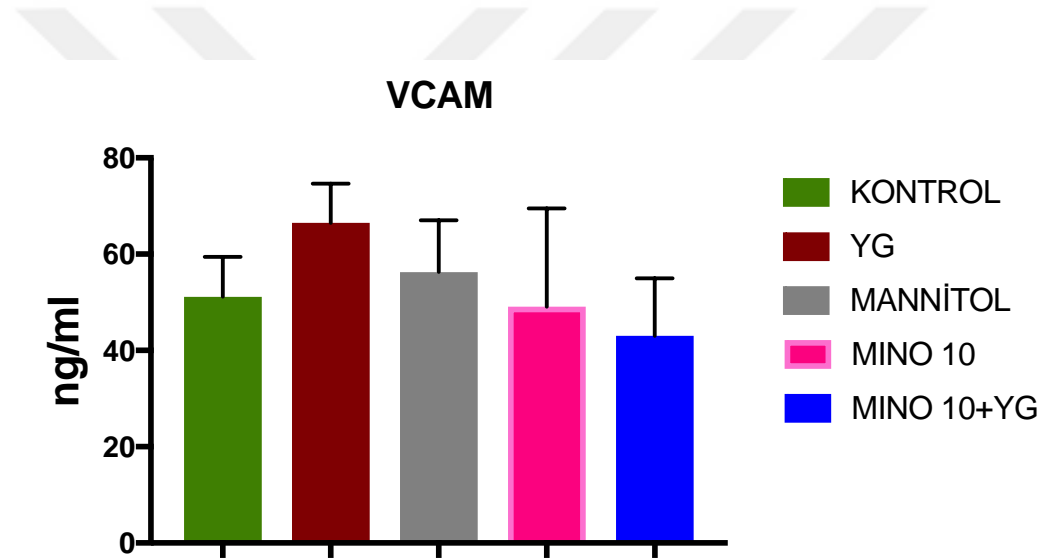
Kontrol ve inhibitörlü gruplar arasında da ICAM verileri değerlendirildiğinde SP inhibitörlü grubun YG gibi ICAM seviyeleri artmış olsa da anlamlı bir fark görülmemiştir. Diğer gruplar arasında da anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 4-28).



Şekil 4-28: Kontrol, YG, Mino 10+YG, Mino10+YG+SP, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+MIX grupları arası ICAM değerleri karşılaştırılması

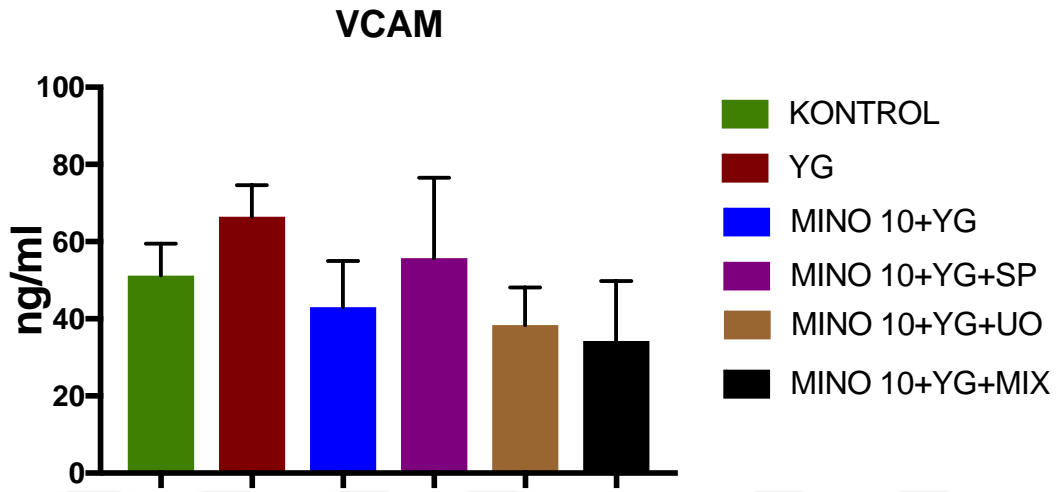
4.2.6. VCAM ELISA Ölçüm Sonuçları

Gruplar arası VCAM verileri değerlendirilmiştir. YG grubu verileri kontrole göre yüksek olsa da anlamlı bir fark görülmemiştir. Aynı şekilde Mino 10+YG grubunda da YG grubuna göre düşüş olsa bile anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-29).



Şekil 4-29: Kontrol, YG, Mannitol, Mino 10 ve Mino 10+YG grupları arası VCAM değerleri karşılaştırılması

Kontrol ve inhibitörlü gruplar arasında da VCAM verileri değerlendirildiğinde SP inhibitörlü grubun YG gibi VCAM seviyeleri artmış olsa da kontrole göre anlamlı bir fark görülmemiştir. Diğer gruplar arasında da anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 4-30).



Şekil 4-30: Kontrol, YG, Mino 10+YG, Mino10+YG+SP, Mino10+YG+UO, Mino10+YG+MIX grupları arası VCAM değerleri karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Diyabetin oksidatif strese bağlı göz, böbrek ve kardiyovasküler sistem gibi vücudun birçok organı üzerinde hasar oluşturucu etkileri oldukça fazladır (Davignon ve Ganz 2004). Gözlenen oksidatif stres sonucu endotel hasarı ortaya çıkmaktadır (Kaur, Kaur, ve Singh 2018). Hiperglisemide NO sentezi azalır, endotelde ROS birikir (Son ve ark. 2004; Reyes-Toso ve ark. 2002), DNA, enzim ve endotel hücre membranı hasarı görülür. Bütün bu etkiler de endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır (Sies ve Cadenas 1985). Oksidatif stresin neden olduğu ROS artışı MAPK mekanizmasını indükleyerek PKC, ERK ve JNK yolaklarını aktive eder. Bu yolaklar da Nrf2'yi bağlı olduğu Keap-1 proteininden ayırarak aktive eder. Nrf2'nin aktivasyonu; NQO-1, HO-1 gibi antioksidan enzimlerin sentezini artırır (Huang ve ark. 2015; Zhu ve Fahl 2001; Nguyen, Huang, ve Pickett 2000) ve vücudun savunma mekanizması devreye girer.

Diyabetin ve komplikasyonlarının tedavisinde birçok farklı mekanizmaya bağlı yeni yöntemler denenmektedir. Yeni tedavi yöntemlerinden biri de hipergliseminin indüklediği oksidatif stresin Nrf2 yolağı aracılığıyla azaltılmaya çalışılmasıdır (Lu ve ark. 2016). Bu yöntemin önemi özellikle Nrf2 eksikliğinde Tip 2 diyabetin daha hızlı ilerlediğinin gösterilmesinden sonra (Kim ve ark. 2009) daha da artmıştır.

Tez çalışmamızda, yüksek glukozlu ortamda inkübe edilerek endotel disfonksiyonu oluşturulmuş sıçan ortalarında minosiklinin etkisi vazoreaktivite ve biyokimyasal parametreler üzerinde araştırılmıştır. Ayrıca ERK ve JNK yolaklarının inhibitörleri olan U0126 ve SP600125 kullanılarak minosiklinin gösterdiği etkilerde Nrf2 yolağının rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Çeşitli hayvan modellerinde ve insan çalışmalarında uzun süreli, geçici ve akut hiperglisemiye bağlı endotel disfonksiyonunun damar yanıtlarında bozulmalara neden olduğu gösterilmiştir (Grassi ve ark. 2012; Kaur, Kaur, ve Singh 2018). Çalışmamızın doz yanıt verilerine bakıldığında da izole sıçan aortalarının yüksek glukoz ile inkübasyonunda gevşeme yanıtlarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı, kasılma yanıtlarının ise anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Doz-yanıt verilerinin yanı sıra yüksek glukozlu grubun gevşeme yanıtlarının Emax değerlerinde anlamlı olarak azalma ($p<0,001$), kasılma yanıtlarının Emax değerlerinde ise anlamlı artış olduğu ($p<0,001$) bulunmuştur. Gevşeme yanıtlarındaki azalmaların yüksek glukozun

asetilkolin reseptörleri duyarlılığını azaltarak ve/veya postreseptör olaylarını bozarak meydana getirdiğini düşündürmektedir (Qian ve ark. 2005). Gevşeme yanıtlarındaki azalma önceki birçok çalışmada gösterilmiş olup endotel disfonksiyonun oluştuğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir (Taddei ve ark. 2003; Cade 2008; Hirose ve ark. 2010). Majithia ve Balaraman kronik diyabetik sıçanlarda yaptıkları damar çalışmalarında kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre azaldığını (Majithiya ve Balaraman 2005), Ahmad ve arkadaşları ise yaptıkları deneyde bizim çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde diyabetik damarların kasılma yanıtlarında artış olduğunu bildirmişlerdir (Ahmad ve ark. 2005). Kullandığımız yöntem ile aynı şekilde akut yüksek glukoz maruziyeti ile yapılan başka bir çalışmada da yine kasılma yanıtlarında artış gösterilmektedir (Donmez ve ark. 2014). Damar yanıtlarında meydana gelen bu değişmelerin endotel disfonksiyonu ile meydana geldiği ve bu durumun oksidatif stresin artması ile oksijen radikallerinin birikmesiyle oluştuğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Kuroki ve ark. 1996; Vincent ve ark. 2004) (Shi ve ark. 2007; Shi ve Vanhoutte 2009). Bunun yanı sıra ROS'un eNOS aktivitesini azalttığı ve dolayısıyla azalan NO seviyelerinin de endotele bağlı kasılma- gevşeme yanıtlarında bozulmalara neden olduğu bilinmektedir (Endemann ve Schiffrin 2004; Koppenol ve ark. 1992; Gao ve ark. 2008; Alp ve ark. 2003). Çalışmamızda da kasılma – gevşeme yanıtlarına NO'un etkisini açıklayabilmek için eNOS değerleri ölçülmüş ve ölçülen eNOS değerleri YG grubunda kontrole göre anlamlı olarak düşük olduğu ($p<0,05$), Minosiklin tedavi gruplarında ise bu değerlerin kontrol seviyelerine döndüğü görülmektedir.

NO, antiinflamatuvar, antiagregan ve vazodilatör aktivite göstermektedir. ROS artışı ile NO sentezi azaldığında koruyucu etki ortadan kalkar. Damarlardan koruyucu etki kalktığında adezyon molekülleri olan ICAM ve VCAM'in ekspresyonu artmaya başlar, damar çeperine lökositlerin tutunması kolaylaşır (Vanhoutte 2009; Vanhoutte ve ark. 2016). YG ile maruziyette de proinflamatuvar sürecin göstergesi olan oksidatif stres, ICAM ve VCAM artışı görülmektedir. Çalışmamızda hem ICAM hem de VCAM verileri için anlamlılık olmasa da YG grubunda kontrole göre verilerde yükselme görülmektedir. Bu yükselişin hipergliseminin yarattığı oksidatif stres ile endotel fonksiyonda bozulma ve NO sentezinde azalmalar ile olduğu düşünülmektedir.

Endotel hasardaki bozulmada oksidatif stresin etkisini ortaya koymak için ayrıca TAS ve TOS ölçümleri yapılmıştır. Yüksek glukoz maruziyetinin ROS ve TOS

seviyelerini arttırdığı, vasküler hasara sebep olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Pitocco ve ark. 2013; Stocker ve Keaney 2004; Finkel 2000). Bizim çalışmamızda da YG gruplarında TOS seviyelerinde anlamlı azalmalar görülmektedir. Bunun yanında TAS, vücudun ROS'a karşı savunma mekanizması olarak üretilmektedir. Oluşan antioksidan yanıt, maruz kalınan oksidan seviyelerine göre kompanse edebilmekte ya da artışa engel olamaz duruma gelmektedir (Shen ve ark. 2003; Huang ve ark. 2015). Yüksek glukoz maruziyetinde ya da diyabetli hastalarda ölçülen TAS değerlerinde farklılıklar gözlenmektedir. Bazı çalışmalarda TAS seviyeleri diyabetli hastalarda yüksek bulunmuş ve bu durum devreye giren kompensasyon mekanizmasının refleks adaptasyonu olarak artmasıyla yorumlanmıştır (Kharroubi ve ark. 2015; Srivatsan ve ark. 2009; Kimura ve ark. 2003). Bunun yanı sıra diğer birçok çalışmada ise bizim bulduğumuz sonuçlar ile paralel olarak YG maruziyeti olan deneysel gruplarda ya da diyabetli hastalarda TAS seviyeleri kontrol gruplarına göre düşük bulunmuştur (Rani ve Mythili 2014; Vericel ve ark. 2004; Picchi ve ark. 2010). Yüksek oksidatif stres düzeylerinin plazma antioksidan kapasitesinde düşüğe sebep olduğu, ekspresyon dengesini bozduğu düşünülmektedir. Oksidatif stresin artmasının yanında bozulan glukoz homeostazi da bu durum üzerinde etkili olmaktadır (Bashan ve ark. 2009). Özellikle erken teşhis edilmiş tip 2 diyabetli hastalarda TAS seviyelerinde azalma gözlenmiş olup, benzer şekilde henüz komplikasyonlar gözlenmemiş Tip 1 diyabet hastalarında da TAS seviyelerinde azalma gözlenmiştir (Marra ve ark. 2002; Pitocco ve ark. 2013). Bizim çalışmamızda da YG grubunda görülen azalmış TAS seviyeleri ($p < 0,001$), bozulan hücresel oksidan homeostazın sebebiyle antioksidan enzim sentezinin bozulması ve ROS sebebiyle oluşan endotelial disfonksiyon ile açıklanabilir.

Çalışmamızda Nrf2 yolağının rolünü açıklayabilmek amacıyla HO-1 ölçümleri yapılmıştır. YG gruplarında HO-1 seviyelerinin kontrole göre anlamlı olarak yükseldiği gözlenmiştir ($p < 0,001$). Nrf2 aktivasyonu ile HO-1'de artış görüldüğü bilinmektedir (Lu ve ark. 2016). Literatürde, HO-1 yükselmesinin diyabetin ilerlemesini ve komplikasyonlarının ortaya çıkmasını geciktirdiği dolayısıyla tedaviye destek olabileceği ileri sürülmektedir (Aleksunes ve ark. 2010; Bitar ve Al-Mulla 2011). Diyabetik sıçanlarda artan HO-1 ekspresyonunun bozulmuş damar endotelinde düzelmeye yapabileceği ve damar gevşeme yanıtlarını arttırabileceği gösterilmiştir (Ahmad ve ark. 2005). Antikanser bir ilaç olan Paklitakselin JNK yolağı üzerinden Nrf2'yi indüklemesi

ile HO-1 sentezini arttırdığı (Choi ve ark. 2004), diğer bir çalışmada ise alfa- lipoik asid ile JNK ve p38 yolağının indüklenmesi ile HO-1 ekspresyonunun arttığı ve Nrf2 inhibitörü kullanıldığında da HO-1 düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (Ogborne, Rushworth, ve O'Connell 2005). Yine başka bir çalışmada ERK yolağı aktivasyonunda HO-1 ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir (Park ve ark. 2013). Bu yolların her ikisinin birlikte inhibisyonunda ise HO-1 ekspresyonunda azalma görülmüştür, bu durum da MAPK yolağının koşullara uygun şekilde HO-1 ekspresyonunu düzenlediğini göstermektedir (Pae, Kim, ve Chung 2008). Astrositlerde yapılan başka bir araştırmada da yüksek glukoz aracılı ROS artışının HO-1 artışını indüklediği ortaya konulmuştur (Yang, Lin, ve Hsieh 2017). Bizim çalışmamızda da yüksek glukoz ile ROS artışı sonrası HO-1 düzeylerinde artış görülürken Nrf2 yollarının inhibitörü kullanıldığında HO-1 düzeylerinde azalma gözlenmiştir. YG durumunda artan HO-1 vücudun savunma mekanizması olarak değerlendirilmiştir.

Minosiklin'in hücrede apoptozu önlediği, inflamasyonu inhibe ettiği (Wang ve ark. 2004) ayrıca yüksek glukoz maruziyetinde de endojen Nrf2 ekspresyonunu artırarak antioksidan etkiyle oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (Shahzad ve ark. 2016). Minosiklin antioksidan etkisi ile hücrede ROS'u azaltmakta ve dolayısıyla ROS'un Nrf2 yolağı üzerindeki indükleyici etkisi ortadan kalkmaktadır (Jiang ve ark. 2014; Schmitz ve ark. 2012; Tian ve ark. 2017). Bu çalışmada minosiklin tedavisi, yüksek glukoz inkübasyonu ile meydana gelen kasılma-gevşeme yanıtlarındaki bozulmaları anlamlı düzeyde düzeltmiştir. YG gruplarında görülen kasılma yanıtlarındaki artış, minosiklin tedavi gruplarında YG gruplarına göre anlamlı olarak azalmış, kontrol seviyelerine düşmüştür. Aynı şekilde gevşeme yanıtlarında azalma şeklinde görülen bozulmalar tedavi gruplarında belirgin bir yanıt artışı ile normal seviyelere gelmiştir. Yukarıda da belirtildiği gibi diyabet ya da yüksek glukozun neden olduğu endotel hasarı, ROS artışı ve antioksidan sistemde meydana gelen değişimler, minosiklin tedavisi ile ortadan kalkmış görünmektedir. Bu etkinin oluşma mekanizmasını da açıklayabilmek için tedavi gruplarında da biyokimyasal parametreler ölçülerek mekanizma ortaya konmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızda, TAS ve TOS değerleri tedavi grupları için de değerlendirilmiş olup; minosiklin tedavi grubunda TAS değeri YG grubuna göre artarken, TOS değerleri ise YG grubuna göre azalma göstermiştir. Minosiklin, bir çalışmada benzer şekilde

sıçanlarda deneysel omurilik zedelenmesinde TAS seviyelerini yükseltirken, TOS seviyelerini düşürmüştür (Aras ve ark. 2015). Literatürde çalışmamıza paralel olarak minosiklin'in antioksidan özelliği gösterilmiş olup normal şartlarda ROS türlerini azaltmadığı ya da Nrf2 etkisini değiştirmedeği, ancak sevofluran gibi ROS yapımını arttıran bir ajan varlığında bu etkileri gösterdiği belirtilmiştir (Tian ve ark. 2015). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde Minosiklin kontrol gruplarında TAS ya da TOS değerlerinde normal kontrol grubundan farklı bir durum gözlenmemiş olup literatür ile örtüşmektedir. Aslında tedavi gruplarında Nrf2 aktivasyonu ile HO-1 artışı beklenirken yüksek glukoz grubuna göre düşmüştür. Ancak bilindiği gibi vücutta HO-1 dışında çok sayıda antioksidan enzim/mekanizma bulunmaktadır. Biz çalışmamızda sadece TAS/TOS ve HO-1 ölçümü ile antioksidan etkileri inceleyebildik. Bu yüzden Minosiklin'in tedavi edici etkisini HO-1 dışındaki diğer antioksidan yollar ile gösterdiği düşünülmektedir. Diyabetin ilerleyişine göre tedavilerin seyri de değişmektedir. İlk aşamalarda artan ROS'a uygulanan antioksidan tedavinin etkisi ya da Nrf2 aktivitesi görülürken bu durumun kronik ve ilerlemiş faz için (bkz.Şekil 2-7) aynı etkiyi yaratacağı soru işaretidir (Fu ve ark. 2016).

Yükselen ROS seviyeleri ile eNOS düzeylerinin azaldığı bilinmektedir (Endemann ve Schiffrin 2004). eNOS seviyelerindeki düşüş, yüksek glukoz maruziyeti ile endotel disfonksiyon oluşmasında görülmektedir (Qian ve ark. 2006; Han ve ark. 2014; Kassin ve ark. 2014). Minosiklinin, oksidatif stres altında vasküler demansta (Cai ve ark. 2008) eNOS ekspresyonunu arttırarak NO düzeylerini yükselttiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da minosiklin tedavisi ile YG grubunda düşen eNOS seviyelerinde yükselme görülmüştür. Minosiklinin özellikle bozulmuş gevşeme yanıtları üzerine olan tedavi edici etkisinde eNOS seviyelerindeki bu yükselmenin katkısı olduğunu düşünmekteyiz.

Artmış adezyon molekülü seviyeleri, yüksek glukoz konsantrasyonu durumunda görülmektedir (Altannavch ve ark. 2004). Aralıklı olarak yüksek glukoz maruziyetinin de ICAM ve VCAM seviyelerinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Quagliaro ve ark. 2005). Minosiklin'in deneysel diyabetik retinopati çalışmasında proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu, kaspaz-3 aktivasyonunu ve ICAM seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir (Kradly ve ark. 2005). Bizim çalışmamızda da istatistiksel anlamlılık olmasa da yüksek glukoz grubunda ICAM ve VCAM seviyelerinde artış görülürken minosiklin ile tedavi

gruplarında azalma gözlenmiştir. ICAM, VCAM gibi adhezyon moleküllerinin sentezleri ERK, JNK yolakları üzerinden olmaktadır (Min ve ark. 2005; Zhou, Connell, ve MacEwan 2007). ERK1/2, p38 ve JNK inhibitörleri kullanılan diğer bir çalışmada yüksek glukozun sebep olduğu ICAM ekspresyonundaki artışın azaldığının gösterilmesi bu yolakların adhezyon moleküllerinin sentezlerinde görevli olduğunu ortaya koymaktadır (Watanabe ve ark. 2011). Ayrıca bu yolakların Nrf2 aktivasyonunda da rol aldığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Nguyen, Nioi, ve Pickett 2009; Purves ve ark. 2001). Aynı şekilde Nrf2'nin oksidatif stresle aktivasyonu da bu yolaklar aracılığıyla gerçekleşmektedir (Pae, Kim, ve Chung 2008). Bu sebeple biz de tedavi gruplarımızda meydana gelen iyileşmelerin mekanizmalarını açıklayabilmek için bu yolaklar üzerine yoğunlaşarak ERK ve JNK yolaklarının inhibitörlerini kullandık.

Çalışmamızda Minosiklin ve yüksek glukoz ile beraber JNK inhibitörü SP600125, ERK inhibitörü UU0126 ve MIX grubunda da iki inhibitör birlikte uygulanmıştır. Yüksek glukoz inkübasyonu ile bozulan kasılma ve gevşeme Emax değerleri Minosiklin tedavisi ile kontrol değerlerine geri dönmüştür. Bu gruba ERK inhibitörü uygulandığında herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Bu durum, minosiklinin kasılma ve gevşeme yanıtlarına gösterdiği tedavi edici etkisini ERK yolu üzerinden yapmadığını düşündürmektedir. JNK inhibitörü ile iki inhibitörün birlikte kullanıldığı MIX gruplarında ise, minosiklinin tedavi edici etkisinin ortadan kalktığı; kasılma yanıtlarında artış ve gevşeme yanıtlarında düşüş olduğu görülmüştür. Bu durum, minosiklinin gösterdiği tedavi edici etkisinde JNK yolağının rolü olduğunu düşündürmektedir. TAS değerleri de yine JNK inhibitörlü grupta YG gibi düşük, TOS değerlerinin ise yüksek bulunması bu durumu desteklemektedir. HO-1 verilerine bakıldığında, inhibitörlü grupların tamamında YG grubuna göre anlamlı bir düşüş görülmektedir. MAPK yolağının HO-1 sentezinde rol aldığı, JNK ve ERK yolaklarının her ikisi de inhibe edildiğinde HO-1 ekspresyonunda azalma görüldüğü diğer çalışmalarla da desteklenmektedir (Pae, Kim, ve Chung 2008; Kim ve Jang 2014). eNOS değerlerinde de inhibitörlü grupların tamamında YG grubuna göre yükseliş gözlenmiştir. İnhibitör varlığında minosiklinin tedavi edici etkisinin devam etmesi, eNOS üzerinde farklı bir mekanizma ile etki gösterdiğini düşündürmektedir. JNK inhibitörlü grupta ICAM ve VCAM değerlerinde anlamlılık olmasa da düşüş görülmektedir. ICAM sentezinde aktif olarak rol alan JNK ve ERK yolaklarının inhibisyonu ile bu durum açıklanabilir.

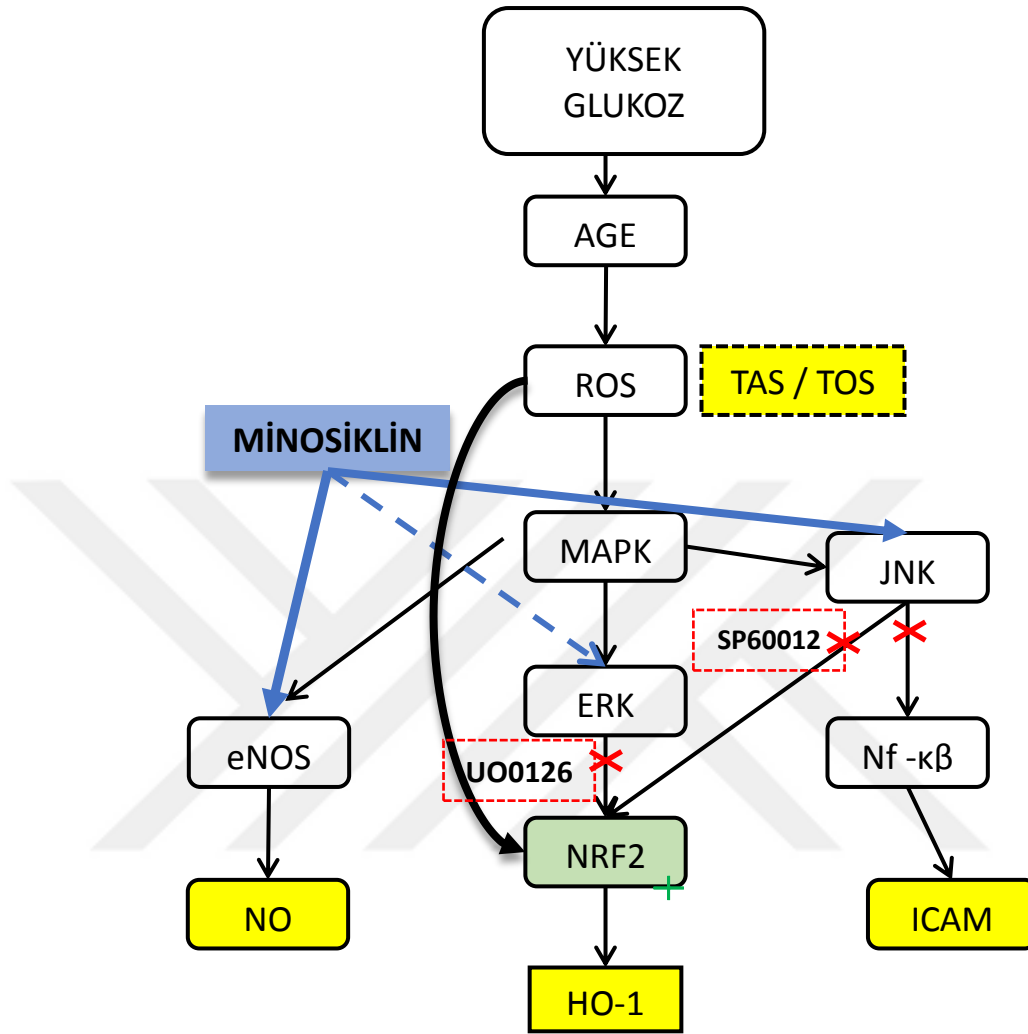
Sonuç olarak; Tez çalışmamızda akut yüksek glukoz maruziyetine bağlı vazoreaktivite değişimleri sıçan aortalarında meydana gelen kasılma-gevşeme yanıtlarındaki bozulmalar ile gösterilmiştir. eNOS ölçümleri ile yüksek glukoz ile NO sentezinde meydana gelen düşüş de bu durumu göstermektedir. Oluşan endotel disfonksiyonun oksidatif stres ile meydana geldiği, ölçülen biyokimyasal parametreler ile desteklenmiştir. YG grubunda TAS azalması, TOS artışı, ICAM, VCAM adhezyon moleküllerindeki artış bu durumu göstermektedir. Yine HO-1 ölçülerek oksidan yolağın son ürünü incelenmiş ve YG gruplarda artış ile oksidatif stresin etkisi ortaya konmuştur. Ayrıca endotel disfonksiyon üzerinde minosiklinin tedavi edici etkisi de hem kasılma-gevşeme yanıtları hem de biyokimyasal parametrelerdeki kontrol grubu ile uyumlu sonuçların elde edilmesi ile ortaya konmuştur. Oksidatif streste Nrf2'nin aktivasyonunun önemi bilindiğinden minosiklinin etkisinde Nrf2 aktivasyonu ile ilişkili JNK ve ERK yollarının inhibitörleri kullanılarak etki mekanizması incelenmiştir. JNK inhibitörünün kullanıldığı gruplarda minosiklinin etkisinin bu yolak üzerinden meydana gelebileceğini hem kasılma-gevşeme yanıtlarındaki değişimler hem de biyokimyasal parametrelerdeki değişimler ile gösterilmiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre minosiklinin tedavi edici etkisinde özellikle JNK yolağı ile eNOS/NO yolağının önemli rol oynadığı düşünülmektedir. minosiklinin olası mekanizmaları Şekil 5-1'de Kegg Pathway Database sitesinden oluşturulmuş yollar üzerinde gösterilmiştir.

Tez Çalışmasının Kısıtlılıkları:

Çalışmanın hipotez aşamasındayken Nrf2 aktivasyonunda rolü olan p38 yolağı da ölçülmek istenmişti. Ancak bütçedeki kısıtlılık sebebi ile etkili olduğu düşünülen bu p38'in yolağının araştırılması mümkün olmamıştır.

ELISA denemelerinde parametrelerin çokluğu ve etik kurul kararı gereği alınan hayvan sayısındaki kısıtlılık sebebi ile sınırlı ve standart sayıda aorta örneği ile çalışılmış olup, bu durum istatistiksel değerlendirmedeki standart hata oranının yüksek olmasını etkilemiştir. Örnek sayısının artırılması anlamlı olarak değerlendirilmesi açısından daha kesin sonuçlara ulaşmamızı sağlayabilirdi.



Şekil 5-1: Minosiklin'in olası etki mekanizmaları

KAYNAKLAR

- . Erişim 18 Mart, <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.
- Ahmad, M., S. Turkseven, C. J. Mingone, S. A. Gupte, M. S. Wolin, ve N. G. Abraham. (2005). Heme oxygenase-1 gene expression increases vascular relaxation and decreases inducible nitric oxide synthase in diabetic rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **51**, 371-6.
- Alano, C. C., T. M. Kauppinen, A. V. Valls, ve R. A. Swanson. (2006). Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9685-90.
- Aleksunes, L. M., S. A. Reisman, R. L. Yeager, M. J. Goedken, ve C. D. Klaassen. (2010). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 deletion impairs glucose tolerance and exacerbates hyperglycemia in type 1 diabetic mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **333**, 140-51.
- Alp, N. J., S. Mussa, J. Khoo, S. Cai, T. Guzik, A. Jefferson, N. Goh, K. A. Rockett, ve K. M. Channon. (2003). Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression. *J Clin Invest*, **112**, 725-35.
- Altanavch, T. S., K. Roubalova, P. Kucera, ve M. Andel. (2004). Effect of high glucose concentrations on expression of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1 in HUVEC with and without cytokine activation. *Physiol Res*, **53**, 77-82.
- Altinok, A., Z. M. Coskun, K. Karaoglu, S. Bolkent, A. G. Akkan, ve S. Ozyazgan. (2015). Delta9-tetrahydrocannabinol treatment improved endothelium-dependent relaxation on streptozotocin/nicotinamide-induced diabetic rat aorta. *Acta Physiol Hung*, **102**, 51-9.
- American Diabetes, Association. (2018). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*, **41**, S13-S27.
- Amin, A. R., R. N. Patel, G. D. Thakker, C. J. Lowenstein, M. G. Attur, ve S. B. Abramson. (1997). Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in murine macrophages by doxycycline And chemically modified tetracyclines. *FEBS Lett*, **410**, 259-64.

- Anderson, T. J. (1999). Assessment And treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol*, **34**, 631-8.
- Aras, M., M. Altas, S. Motor, R. Dokuyucu, A. Yilmaz, E. Ozgiray, Y. Seraslan, ve N. Yilmaz. (2015). Protective effects of minocycline on experimental spinal cord injury in rats. *Injury*, **46**, 1471-4.
- Baird, L., ve A. T. Dinkova-Kostova. (2011). The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol*, **85**, 241-72.
- Bashan, N., J. Kovsan, I. Kachko, H. Ovadia, ve A. Rudich. (2009). Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev*, **89**, 27-71.
- Bellezza, I., I. Giambanco, A. Minelli, ve R. Donato. (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, **1865**, 721-33.
- Bellezza, I., A. Tucci, F. Galli, S. Grottelli, A. L. Mierla, F. Pilolli, ve A. Minelli. (2012). Inhibition of NF-kappaB nuclear translocation via HO-1 activation underlies alpha-tocopheryl succinate toxicity. *J Nutr Biochem*, **23**, 1583-91.
- Ben-Haroush, A., Y. Yogev, ve M. Hod. (2004). Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabet Med*, **21**, 103-13.
- Benhar, M., D. Engelberg, ve A. Levitzki. (2002). ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep*, **3**, 420-5.
- Bitar, M. S., ve F. Al-Mulla. (2011). A defect in Nrf2 signaling constitutes a mechanism for cellular stress hypersensitivity in a genetic rat model of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **301**, E1119-29.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2016). Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients*, **8**.
- Bourne, R. R., G. A. Stevens, R. A. White, J. L. Smith, S. R. Flaxman, H. Price, J. B. Jonas, J. Keeffe, J. Leasher, K. Naidoo, K. Pesudovs, S. Resnikoff, H. R. Taylor, ve Group Vision Loss Expert. (2013). Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. *Lancet Glob Health*, **1**, e339-49.
- Brigelius-Flohe, R., ve L. Flohe. (2011). Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal*, **15**, 2335-81.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **414**, 813-20.

- . (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, **54**, 1615-25.
- Bucala, R., K. J. Tracey, ve A. Cerami. (1991). Advanced glycosylation products quench nitric oxide And mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest*, **87**, 432-8.
- Cade, W. T. (2008). Diabetes-related microvascular And macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther*, **88**, 1322-35.
- Cai, Z. Y., Y. Yan, S. Q. Sun, J. Zhang, L. G. Huang, N. Yan, F. Wu, ve J. Y. Li. (2008). Minocycline attenuates cognitive impairment and restrains oxidative stress in the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Neurosci Bull*, **24**, 305-13.
- Cai, Z., Y. Zhao, S. Yao, ve B. Bin Zhao. (2011). Increases in beta-amyloid protein in the hippocampus caused by diabetic metabolic disorder are blocked by minocycline through inhibition of NF-kappaB pathway activation. *Pharmacol Rep*, **63**, 381-91.
- Campbell, J. H., T. H. Burdo, P. Autissier, J. P. Bombardier, S. V. Westmoreland, C. Soulas, R. G. Gonzalez, E. M. Ratai, ve K. C. Williams. (2011). Minocycline inhibition of monocyte activation correlates with neuronal protection in SIV neuroAIDS. *PLoS One*, **6**, e18688.
- Casanova, F., D. D. Adingupu, F. Adams, K. M. Gooding, H. C. Looker, K. Aizawa, F. Dove, S. Elyas, J. J. F. Belch, P. E. Gates, R. C. Littleford, M. Gilchrist, H. M. Colhoun, A. C. Shore, F. Khan, ve W. D. Strain. (2017). The impact of cardiovascular co-morbidities and duration of diabetes on the association between microvascular function and glycaemic control. *Cardiovasc Diabetol*, **16**, 114.
- Catalano, P. M., ve H. M. Ehrenberg. (2006). The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *BJOG*, **113**, 1126-33.
- Chavakis, T., A. Bierhaus, ve P. P. Nawroth. (2004). RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect*, **6**, 1219-25.
- Chen, C. Y., J. H. Jang, M. H. Li, ve Y. J. Surh. (2005). Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 993-1000.

- Chen, C., R. Yu, E. D. Owuor, ve A. N. Kong. (2000). Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res*, **23**, 605-12.
- Chen, G., H. Suzuki, ve A. H. Weston. (1988). Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor And EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol*, **95**, 1165-74.
- Chen, M., V. O. Ona, M. Li, R. J. Ferrante, K. B. Fink, S. Zhu, J. Bian, L. Guo, L. A. Farrell, S. M. Hersch, W. Hobbs, J. P. Vonsattel, J. H. Cha, ve R. M. Friedlander. (2000). Minocycline inhibits caspase-1 And caspase-3 expression And delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med*, **6**, 797-801.
- Chen, X., M. N. Duong, P. J. Psaltis, C. A. Bursill, ve S. J. Nicholls. (2017). High-density lipoproteins attenuate high glucose-impaired endothelial cell signaling and functions: potential implications for improved vascular repair in diabetes. *Cardiovasc Diabetol*, **16**, 121.
- Cheng, X., R. C. Siow, ve G. E. Mann. (2011). Impaired redox signaling and antioxidant gene expression in endothelial cells in diabetes: a role for mitochondria and the nuclear factor-E2-related factor 2-Kelch-like ECH-associated protein 1 defense pathway. *Antioxid Redox Signal*, **14**, 469-87.
- Choi, B. M., Y. M. Kim, Y. R. Jeong, H. O. Pae, C. E. Song, J. E. Park, Y. K. Ahn, ve H. T. Chung. (2004). Induction of heme oxygenase-1 is involved in anti-proliferative effects of paclitaxel on rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **321**, 132-7.
- Choi, Y., H. S. Kim, K. Y. Shin, E. M. Kim, M. Kim, H. S. Kim, C. H. Park, Y. H. Jeong, J. Yoo, J. P. Lee, K. A. Chang, S. Kim, ve Y. H. Suh. (2007). Minocycline attenuates neuronal cell death And improves cognitive impairment in Alzheimer's disease models. *Neuropsychopharmacology*, **32**, 2393-404.
- Clinic, Mayo. (2019). *Diseases & Conditions*. Erişim 07 Feb, <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/type-1-diabetes/symptoms-causes/syc-20353011>.

- Conen, D., P. M. Ridker, S. Mora, J. E. Buring, ve R. J. Glynn. (2007). Blood pressure and risk of developing type 2 diabetes mellitus: the Women's Health Study. *Eur Heart J*, **28**, 2937-43.
- Creager, M. A., T. F. Luscher, F. Cosentino, ve J. A. Beckman. (2003). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*, **108**, 1527-32.
- Crump, C., J. Sundquist, M. A. Winkleby, W. Sieh, ve K. Sundquist. (2016). Physical Fitness Among Swedish Military Conscripts and Long-Term Risk for Type 2 Diabetes Mellitus: A Cohort Study. *Ann Intern Med*, **164**, 577-84.
- Cui, W., B. Li, Y. Bai, X. Miao, Q. Chen, W. Sun, Y. Tan, P. Luo, C. Zhang, S. Zheng, P. N. Epstein, L. Miao, ve L. Cai. (2013). Potential role for Nrf2 activation in the therapeutic effect of MG132 on diabetic nephropathy in OVE26 diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **304**, E87-99.
- D'Souza, A., M. Hussain, F. C. Howarth, N. M. Woods, K. Bidasee, ve J. Singh. (2009). Pathogenesis and pathophysiology of accelerated atherosclerosis in the diabetic heart. *Mol Cell Biochem*, **331**, 89-116.
- Davignon, J., ve P. Ganz. (2004). Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, **109**, III27-32.
- de Haan, J. B. (2011). Nrf2 activators as attractive therapeutics for diabetic nephropathy. *Diabetes*, **60**, 2683-4.
- Donmez, S., O. Gokalp, M. Dogan, H. Vural, ve B. Yigit. (2014). Effects of short-term hyperglycemia on the vasoconstriction of the aorta. *Turk J Med Sci*, **44**, 941-5.
- Duan, J., G. Wei, C. Guo, J. Cui, J. Yan, Y. Yin, Y. Guan, Y. Weng, Y. Zhu, X. Wu, Y. Wang, M. Xi, ve A. Wen. (2015). *Aralia taibaiensis* Protects Cardiac Myocytes against High Glucose-Induced Oxidative Stress and Apoptosis. *Am J Chin Med*, **43**, 1159-75.
- Ehrmann, D. A., R. B. Barnes, R. L. Rosenfield, M. K. Cavaghan, ve J. Imperial. (1999). Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*, **22**, 141-6.
- El-Awady, M. S., D. S. El-Agamy, G. M. Suddek, ve M. A. Nader. (2014). Propolis protects against high glucose-induced vascular endothelial dysfunction in isolated rat aorta. *J Physiol Biochem*, **70**, 247-54.

- Emerging Risk Factors, Collaboration, N. Sarwar, P. Gao, S. R. Seshasai, R. Gobin, S. Kaptoge, E. Di Angelantonio, E. Ingelsson, D. A. Lawlor, E. Selvin, M. Stampfer, C. D. Stehouwer, S. Lewington, L. Pennells, A. Thompson, N. Sattar, I. R. White, K. K. Ray, ve J. Danesh. (2010). Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*, **375**, 2215-22.
- Endemann, D. H., ve E. L. Schiffrin. (2004). Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, **15**, 1983-92.
- Fang, X. D., F. Yang, L. Zhu, Y. L. Shen, L. L. Wang, ve Y. Y. Chen. (2009). Curcumin ameliorates high glucose-induced acute vascular endothelial dysfunction in rat thoracic aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **36**, 1177-82.
- Farombi, E. O., ve Y. J. Surh. (2006). Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol*, **39**, 479-91.
- Feletou, M. 2011. *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators* (San Rafael (CA)).
- Feletou, M., ve P. M. Vanhoutte. (2006). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **291**, H985-1002.
- Finkel, T. (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett*, **476**, 52-4.
- Ford, E. S., C. Li, ve N. Sattar. (2008). Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence. *Diabetes Care*, **31**, 1898-904.
- Foresti, R., C. Bucolo, C. M. Platania, F. Drago, J. L. Dubois-Rande, ve R. Motterlini. (2015). Nrf2 activators modulate oxidative stress responses and bioenergetic profiles of human retinal epithelial cells cultured in normal or high glucose conditions. *Pharmacol Res*, **99**, 296-307.
- Fratantonio, D., A. Speciale, D. Ferrari, M. Cristani, A. Saija, ve F. Cimino. (2015). Palmitate-induced endothelial dysfunction is attenuated by cyanidin-3-O-glucoside through modulation of Nrf2/Bach1 and NF-kappaB pathways. *Toxicol Lett*, **239**, 152-60.
- Fu, Jingqi, Yongyong Hou, Peng Xue, Huihui Wang, Yuanyuan Xu, Weidong Qu, Qiang Zhang, ve Jingbo Pi. (2016). Nrf2 in Type 2 diabetes and diabetic complications: Yin and Yang. *Current Opinion in Toxicology*, **1**, 9-19.

- Furchgott, R. F., ve J. V. Zawadzki. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373-6.
- Gao, X., H. Zhang, A. M. Schmidt, ve C. Zhang. (2008). AGE/RAGE produces endothelial dysfunction in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **295**, H491-8.
- Garrido-Mesa, N., P. Utrilla, M. Comalada, P. Zorrilla, J. Garrido-Mesa, A. Zarzuelo, M. E. Rodriguez-Cabezas, ve J. Galvez. (2011). The association of minocycline And the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 results in an additive beneficial effect in a DSS model of reactivated colitis in mice. *Biochem Pharmacol*, **82**, 1891-900.
- Garrido-Mesa, N., A. Zarzuelo, ve J. Galvez. (2013). Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br J Pharmacol*, **169**, 337-52.
- Golub, L. M., H. M. Lee, G. Lehrer, A. Nemiroff, T. F. McNamara, R. Kaplan, ve N. S. Ramamurthy. (1983). Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations And a proposed new mechanism of action. *J Periodontal Res*, **18**, 516-26.
- Gong, X., V. N. Ivanov, ve T. K. Hei. (2016). 2,3,5,6-Tetramethylpyrazine (TMP) down-regulated arsenic-induced heme oxygenase-1 and ARS2 expression by inhibiting Nrf2, NF-kappaB, AP-1 and MAPK pathways in human proximal tubular cells. *Arch Toxicol*, **90**, 2187-200.
- Grassi, D., G. Desideri, S. Necozione, F. Ruggieri, J. B. Blumberg, M. Stornello, ve C. Ferri. (2012). Protective effects of flavanol-rich dark chocolate on endothelial function and wave reflection during acute hyperglycemia. *Hypertension*, **60**, 827-32.
- Griendling, K. K., ve G. A. FitzGerald. (2003). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*, **108**, 2034-40.
- Group, Hapo Study Cooperative Research. (2002). The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Int J Gynaecol Obstet*, **78**, 69-77.
- Grover-Paez, F., ve A. B. Zavalza-Gomez. (2009). Endothelial dysfunction And cardiovascular risk factors. *Diabetes Res Clin Pract*, **84**, 1-10.
- Guo, X., W. L. Liu, L. W. Chen, ve Z. G. Guo. (2000). High glucose impairs endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Acta Pharmacol Sin*, **21**, 169-73.

- Halliwell, B., ve J. M. Gutteridge. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*, **246**, 501-14.
- Han, X., R. Zhang, L. Anderson, ve R. Rahimian. (2014). Sexual dimorphism in rat aortic endothelial function of streptozotocin-induced diabetes: possible involvement of superoxide and nitric oxide production. *Eur J Pharmacol*, **723**, 442-50.
- Hayashi, A., H. Suzuki, K. Itoh, M. Yamamoto, ve Y. Sugiyama. (2003). Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **310**, 824-9.
- He, X., H. Kan, L. Cai, ve Q. Ma. (2009). Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, **46**, 47-58.
- Hirose, A., T. Tanikawa, H. Mori, Y. Okada, ve Y. Tanaka. (2010). Advanced glycation end products increase endothelial permeability through the RAGE/Rho signaling pathway. *FEBS Lett*, **584**, 61-6.
- Hu, Y. R., H. Ma, Z. Y. Zou, K. He, Y. B. Xiao, Y. Wang, M. Feng, X. L. Ye, ve X. G. Li. (2017). Activation of Akt and JNK/Nrf2/NQO1 pathway contributes to the protective effect of coptisine against AAPH-induced oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, **85**, 313-22.
- Huang, C. S., A. H. Lin, T. C. Yang, K. L. Liu, H. W. Chen, ve C. K. Lii. (2015). Shikonin inhibits oxidized LDL-induced monocyte adhesion by suppressing NFkappaB activation via up-regulation of PI3K/Akt/Nrf2-dependent antioxidation in EA.hy926 endothelial cells. *Biochem Pharmacol*, **93**, 352-61.
- IDF. *About Diabetes*. Erişim 14 Mart, International Diabetes Federation: <https://www.idf.org>.
- Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, ve G. Chaudhuri. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced And released from artery And vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 9265-9.
- Itoh, K., T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto, ve Y. Nabeshima. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes

- through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*, **236**, 313-22.
- Itoh, K., T. Ishii, N. Wakabayashi, ve M. Yamamoto. (1999). Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free Radic Res*, **31**, 319-24.
- Jacobson, G. M., H. M. Dourron, J. Liu, O. A. Carretero, D. J. Reddy, T. Andrzejewski, ve P. J. Pagano. (2003). Novel NAD(P)H oxidase inhibitor suppresses angioplasty-induced superoxide and neointimal hyperplasia of rat carotid artery. *Circ Res*, **92**, 637-43.
- Jacobson, M. D. (1996). Reactive oxygen species And programmed cell death. *Trends Biochem Sci*, **21**, 83-6.
- Jeong, C. B., H. M. Kang, M. C. Lee, D. H. Kim, J. Han, D. S. Hwang, S. Souissi, S. J. Lee, K. H. Shin, H. G. Park, ve J. S. Lee. (2017). Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclopsina nana*. *Sci Rep*, **7**, 41323.
- Jiang, B. P., L. Le, L. J. Xu, ve P. G. Xiao. (2014). Minocycline inhibits ICAD degradation And the NF-kappaB activation induced by 6-OHDA in PC12 cells. *Brain Res*, **1586**, 1-11.
- Jiang, Y., V. L. Scofield, M. Yan, W. Qiang, N. Liu, A. J. Reid, W. S. Lynn, ve P. K. Wong. (2006). Retrovirus-induced oxidative stress with neuroimmunodegeneration is suppressed by antioxidant treatment with a refined monosodium alpha-luminol (Galavit). *J Virol*, **80**, 4557-69.
- Jordan, J., F. J. Fernandez-Gomez, M. Ramos, I. Ikuta, N. Aguirre, ve M. F. Galindo. (2007). Minocycline And cytoprotection: shedding new light on a shadowy controversy. *Curr Drug Deliv*, **4**, 225-31.
- Just, A., C. L. Whitten, ve W. J. Arendshorst. (2008). Reactive oxygen species participate in acute renal vasoconstrictor responses induced by ETA And ETB receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*, **294**, F719-28.
- Kampmann, U., L. R. Madsen, G. O. Skajaa, D. S. Iversen, N. Moeller, ve P. Ovesen. (2015). Gestational diabetes: A clinical update. *World J Diabetes*, **6**, 1065-72.
- Kassan, M., S. K. Choi, M. Galan, Y. H. Lee, M. Trebak, ve K. Matrougui. (2014). Enhanced p22phox expression impairs vascular function through p38 and

- ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanisms in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **306**, H972-80.
- Kaur, R., M. Kaur, ve J. Singh. (2018). Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol*, **17**, 121.
- Kensler, T. W., N. Wakabayashi, ve S. Biswal. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **47**, 89-116.
- Kharroubi, A. T., H. M. Darwish, M. A. Akkawi, A. A. Ashareef, Z. A. Almasri, K. A. Bader, ve U. M. Khammash. (2015). Total Antioxidant Status in Type 2 Diabetic Patients in Palestine. *J Diabetes Res*, **2015**, 461271.
- Kielian, T., N. Esen, S. Liu, N. K. Phulwani, M. M. Syed, N. Phillips, K. Nishina, A. L. Cheung, J. D. Schwartzman, ve J. J. Ruhe. (2007). Minocycline modulates neuroinflammation independently of its antimicrobial activity in staphylococcus aureus-induced brain abscess. *Am J Pathol*, **171**, 1199-214.
- Kim, H. G., Y. R. Kim, J. H. Park, T. Khanal, J. H. Choi, M. T. Do, S. W. Jin, E. H. Han, Y. H. Chung, ve H. G. Jeong. (2015). Endosulfan induces COX-2 expression via NADPH oxidase and the ROS, MAPK, and Akt pathways. *Arch Toxicol*, **89**, 2039-50.
- Kim, J. K., ve H. D. Jang. (2014). Nrf2-mediated HO-1 induction coupled with the ERK signaling pathway contributes to indirect antioxidant capacity of caffeic acid phenethyl ester in HepG2 cells. *Int J Mol Sci*, **15**, 12149-65.
- Kim, J. Y., H. J. Cho, J. J. Sir, B. K. Kim, J. Hur, S. W. Youn, H. M. Yang, S. I. Jun, K. W. Park, S. J. Hwang, Y. W. Kwon, H. Y. Lee, H. J. Kang, B. H. Oh, Y. B. Park, ve H. S. Kim. (2009). Sulfasalazine induces haem oxygenase-1 via ROS-dependent Nrf2 signalling, leading to control of neointimal hyperplasia. *Cardiovasc Res*, **82**, 550-60.
- Kimura, F., G. Hasegawa, H. Obayashi, T. Adachi, H. Hara, M. Ohta, M. Fukui, Y. Kitagawa, H. Park, N. Nakamura, K. Nakano, ve T. Yoshikawa. (2003). Serum extracellular superoxide dismutase in patients with type 2 diabetes: relationship to the development of micro- and macrovascular complications. *Diabetes Care*, **26**, 1246-50.
- Klein, N. C., ve B. A. Cunha. (1995). Tetracyclines. *Med Clin North Am*, **79**, 789-801.

- Kobayashi, M., ve M. Yamamoto. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal*, **7**, 385-94.
- Koppenol, W. H., J. J. Moreno, W. A. Pryor, H. Ischiropoulos, ve J. S. Beckman. (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol*, **5**, 834-42.
- Krady, J. K., A. Basu, C. M. Allen, Y. Xu, K. F. LaNoue, T. W. Gardner, ve S. W. Levison. (2005). Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes*, **54**, 1559-65.
- Kuang, X., V. L. Scofield, M. Yan, G. Stoica, N. Liu, ve P. K. Wong. (2009). Attenuation of oxidative stress, inflammation And apoptosis by minocycline prevents retrovirus-induced neurodegeneration in mice. *Brain Res*, **1286**, 174-84.
- Kuroki, M., E. E. Voest, S. Amano, L. V. Beerepoot, S. Takashima, M. Tolentino, R. Y. Kim, R. M. Rohan, K. A. Colby, K. T. Yeo, ve A. P. Adamis. (1996). Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, **98**, 1667-75.
- Kwak, M. K., K. Itoh, M. Yamamoto, T. R. Sutter, ve T. W. Kensler. (2001). Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione. *Mol Med*, **7**, 135-45.
- Lampl, Y., M. Boaz, R. Gilad, M. Lorberboym, R. Dabby, A. Rapoport, M. Anca-Hershkowitz, ve M. Sadeh. (2007). Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. *Neurology*, **69**, 1404-10.
- Landmesser, U., S. Dikalov, S. R. Price, L. McCann, T. Fukai, S. M. Holland, W. E. Mitch, ve D. G. Harrison. (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*, **111**, 1201-9.
- Leite, P. F., A. Danilovic, P. Moriel, K. Dantas, S. Marklund, A. P. Dantas, ve F. R. Laurindo. (2003). Sustained decrease in superoxide dismutase activity underlies constrictive remodeling after balloon injury in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 2197-202.

- Levonen, A. L., M. Inkala, T. Heikura, S. Jauhiainen, H. K. Jyrkkanen, E. Kansanen, K. Maatta, E. Romppanen, P. Turunen, J. Rutanen, ve S. Yla-Herttuala. (2007). Nrf2 gene transfer induces antioxidant enzymes and suppresses smooth muscle cell growth in vitro and reduces oxidative stress in rabbit aorta in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 741-7.
- Li, J., T. Ichikawa, L. Villacorta, J. S. Janicki, G. L. Brower, M. Yamamoto, ve T. Cui. (2009). Nrf2 protects against maladaptive cardiac responses to hemodynamic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 1843-50.
- Lin, S., Y. Zhang, R. Dodel, M. R. Farlow, S. M. Paul, ve Y. Du. (2001). Minocycline blocks nitric oxide-induced neurotoxicity by inhibition p38 MAP kinase in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett*, **315**, 61-4.
- Liu, D., J. Xue, Y. Liu, H. Gu, X. Wei, W. Ma, W. Luo, L. Ma, S. Jia, N. Dong, J. Huang, Y. Wang, ve Z. Yuan. (2018). Inhibition of NRF2 signaling And increased reactive oxygen species during embryogenesis in a rat model of retinoic acid-induced neural tube defects. *Neurotoxicology*, **69**, 84-92.
- Liu, Q., Z. Lei, A. Huang, Q. Wu, S. Xie, I. Awais, M. Dai, X. Wang, ve Z. Yuan. (2017). Toxic metabolites, MAPK and Nrf2/Keap1 signaling pathways involved in oxidative toxicity in mice liver after chronic exposure to Mequindox. *Sci Rep*, **7**, 41854.
- Lu, M. C., J. A. Ji, Z. Y. Jiang, ve Q. D. You. (2016). The Keap1-Nrf2-ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Med Res Rev*, **36**, 924-63.
- Lyu, J. H., K. H. Kim, H. W. Kim, S. I. Cho, K. T. Ha, J. Y. Choi, C. W. Han, H. S. Jeong, H. K. Lee, K. S. Ahn, S. R. Oh, R. T. Sadikot, J. W. Christman, ve M. Joo. (2012). Dangkwisoo-san, an herbal medicinal formula, ameliorates acute lung inflammation via activation of Nrf2 And suppression of NF-kappaB. *J Ethnopharmacol*, **140**, 107-16.
- Madonna, R., G. Giovannelli, P. Confalone, F. V. Renna, Y. J. Geng, ve R. De Caterina. (2016). High glucose-induced hyperosmolarity contributes to COX-2 expression and angiogenesis: implications for diabetic retinopathy. *Cardiovasc Diabetol*, **15**, 18.

- Majithiya, J. B., ve R. Balaraman. (2005). Time-dependent changes in antioxidant enzymes and vascular reactivity of aorta in streptozotocin-induced diabetic rats treated with curcumin. *J Cardiovasc Pharmacol*, **46**, 697-705.
- Makita, Z., S. Radoff, E. J. Rayfield, Z. Yang, E. Skolnik, V. Delaney, E. A. Friedman, A. Cerami, ve H. Vlassara. (1991). Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med*, **325**, 836-42.
- Marra, G., P. Cotroneo, D. Pitocco, A. Manto, M. A. Di Leo, V. Ruotolo, S. Caputo, B. Giardina, G. Ghirlanda, ve S. A. Santini. (2002). Early increase of oxidative stress and reduced antioxidant defenses in patients with uncomplicated type 1 diabetes: a case for gender difference. *Diabetes Care*, **25**, 370-5.
- Martin, F., J. M. van Deursen, R. A. Shivdasani, C. W. Jackson, A. G. Troutman, ve P. A. Ney. (1998). Erythroid maturation and globin gene expression in mice with combined deficiency of NF-E2 and nrf-2. *Blood*, **91**, 3459-66.
- Martinez, L. C., D. Sherling, ve A. Holley. (2019). The Screening and Prevention of Diabetes Mellitus. *Prim Care*, **46**, 41-52.
- Matzinger, M., K. Fischhuber, ve E. H. Heiss. (2018). Activation of Nrf2 signaling by natural products-can it alleviate diabetes? *Biotechnol Adv*, **36**, 1738-67.
- Mei, X. P., H. Xu, C. Xie, J. Ren, Y. Zhou, H. Zhang, ve L. X. Xu. (2011). Post-injury administration of minocycline: an effective treatment for nerve-injury induced neuropathic pain. *Neurosci Res*, **70**, 305-12.
- Menke, A., S. Casagrande, L. Geiss, ve C. C. Cowie. (2015). Prevalence of and Trends in Diabetes Among Adults in the United States, 1988-2012. *JAMA*, **314**, 1021-9.
- Menke, A., K. F. Rust, J. Fradkin, Y. J. Cheng, ve C. C. Cowie. (2014). Associations between trends in race/ethnicity, aging, and body mass index with diabetes prevalence in the United States: a series of cross-sectional studies. *Ann Intern Med*, **161**, 328-35.
- Miao, X., W. Cui, W. Sun, Y. Xin, B. Wang, Y. Tan, L. Cai, L. Miao, Y. Fu, G. Su, ve Y. Wang. (2013). Therapeutic effect of MG132 on the aortic oxidative damage and inflammatory response in OVE26 type 1 diabetic mice. *Oxid Med Cell Longev*, **2013**, 879516.
- Miao, X., Y. Wang, J. Sun, W. Sun, Y. Tan, L. Cai, Y. Zheng, G. Su, Q. Liu, ve Y. Wang. (2013). Zinc protects against diabetes-induced pathogenic changes in the

- aorta: roles of metallothionein and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. *Cardiovasc Diabetol*, **12**, 54.
- Milstien, S., ve Z. Katusic. (1999). Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**, 681-4.
- Min, J. K., Y. M. Kim, S. W. Kim, M. C. Kwon, Y. Y. Kong, I. K. Hwang, M. H. Won, J. Rho, ve Y. G. Kwon. (2005). TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Immunol*, **175**, 531-40.
- Minelli, A., C. Conte, S. Grottelli, I. Bellezza, C. Emiliani, ve J. P. Bolanos. (2009). Cyclo(His-Pro) up-regulates heme oxygenase 1 via activation of Nrf2-ARE signalling. *J Neurochem*, **111**, 956-66.
- Moi, P., K. Chan, I. Asunis, A. Cao, ve Y. W. Kan. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9926-30.
- Moncada, S., R. Gryglewski, S. Bunting, ve J. R. Vane. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, **263**, 663-5.
- Motohashi, H., ve M. Yamamoto. (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*, **10**, 549-57.
- Mozaffarian, D., R. Marfisi, G. Levantesi, M. G. Silletta, L. Tavazzi, G. Tognoni, F. Valagussa, ve R. Marchioli. (2007). Incidence of new-onset diabetes and impaired fasting glucose in patients with recent myocardial infarction and the effect of clinical and lifestyle risk factors. *Lancet*, **370**, 667-75.
- Ng, H. H., C. H. Leo, ve L. J. Parry. (2016). Serelaxin (recombinant human relaxin-2) prevents high glucose-induced endothelial dysfunction by ameliorating prostacyclin production in the mouse aorta. *Pharmacol Res*, **107**, 220-28.
- Nguyen, T., H. C. Huang, ve C. B. Pickett. (2000). Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 And repression by MafK. *J Biol Chem*, **275**, 15466-73.

- Nguyen, T., P. Nioi, ve C. B. Pickett. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*, **284**, 13291-5.
- Niture, S. K., R. Khatri, ve A. K. Jaiswal. (2014). Regulation of Nrf2-an update. *Free Radic Biol Med*, **66**, 36-44.
- Ogborne, R. M., S. A. Rushworth, ve M. A. O'Connell. (2005). Alpha-lipoic acid-induced heme oxygenase-1 expression is mediated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase in human monocytic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 2100-5.
- Ok, S. H., S. C. Kwon, J. Yeol Han, J. Yu, I. W. Shin, H. K. Lee, Y. K. Chung, M. J. Choi, ve J. T. Sohn. (2014). Mepivacaine-induced contraction involves increased calcium sensitization mediated via Rho kinase and protein kinase C in endothelium-denuded rat aorta. *Eur J Pharmacol*, **723**, 185-93.
- Padiya, R., D. Chowdhury, R. Borkar, R. Srinivas, M. Pal Bhadra, ve S. K. Banerjee. (2014). Garlic attenuates cardiac oxidative stress via activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 pathway in fructose-fed diabetic rat. *PLoS One*, **9**, e94228.
- Pae, H. O., E. C. Kim, ve H. T. Chung. (2008). Integrative survival response evoked by heme oxygenase-1 and heme metabolites. *J Clin Biochem Nutr*, **42**, 197-203.
- Park, J. Y., K. A. Kang, K. C. Kim, J. W. Cha, E. H. Kim, ve J. W. Hyun. (2013). Morin Induces Heme Oxygenase-1 via ERK-Nrf2 Signaling Pathway. *J Cancer Prev*, **18**, 249-56.
- Pedruzzi, L. M., M. B. Stockler-Pinto, M. Leite, Jr., ve D. Mafra. (2012). Nrf2-keap1 system versus NF-kappaB: the good and the evil in chronic kidney disease? *Biochimie*, **94**, 2461-6.
- Pektas, M. B., O. Turan, G. Ozturk Bingol, E. Sumlu, G. Sadi, ve F. Akar. (2018). High glucose causes vascular dysfunction through Akt/eNOS pathway: reciprocal modulation by juglone And resveratrol. *Can J Physiol Pharmacol*, **96**, 757-64.
- Picchi, A., S. Capobianco, T. Qiu, M. Focardi, X. Zou, J. M. Cao, ve C. Zhang. (2010). Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus: A review. *World J Cardiol*, **2**, 377-90.

- Pitocco, D., M. Tesauro, R. Alessandro, G. Ghirlanda, ve C. Cardillo. (2013). Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci*, **14**, 21525-50.
- Potenza, M. A., S. Gagliardi, C. Nacci, M. R. Carratu, ve M. Montagnani. (2009). Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. *Curr Med Chem*, **16**, 94-112.
- Pruzanski, W., R. A. Greenwald, I. P. Street, F. Laliberte, E. Stefanski, ve P. Vadas. (1992). Inhibition of enzymatic activity of phospholipases A2 by minocycline And doxycycline. *Biochem Pharmacol*, **44**, 1165-70.
- Purves, T., A. Middlemas, S. Agthong, E. B. Jude, A. J. Boulton, P. Fernyhough, ve D. R. Tomlinson. (2001). A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J*, **15**, 2508-14.
- Qian, L. B., H. P. Wang, W. L. Qiu, H. Huang, I. C. Bruce, ve Q. Xia. (2006). Interleukin-2 protects against endothelial dysfunction induced by high glucose levels in rats. *Vascul Pharmacol*, **45**, 374-82.
- Qian, L., H. Wang, Q. Xia, I. Bruce, ve H. Huang. (2005). Interleukin-2 Improves Vascular Functions in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, **3**, 2283-6.
- Qiang, W., J. M. Cahill, J. Liu, X. Kuang, N. Liu, V. L. Scofield, J. R. Voorhees, A. J. Reid, M. Yan, W. S. Lynn, ve P. K. Wong. (2004). Activation of transcription factor Nrf-2 And its downstream targets in response to moloney murine leukemia virus ts1-induced thiol depletion And oxidative stress in astrocytes. *J Virol*, **78**, 11926-38.
- Quagliari, L., L. Piconi, R. Assaloni, R. Da Ros, A. Maier, G. Zuodar, ve A. Ceriello. (2005). Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. *Atherosclerosis*, **183**, 259-67.
- Ramos-Gomez, M., P. M. Dolan, K. Itoh, M. Yamamoto, ve T. W. Kensler. (2003). Interactive effects of nrf2 genotype and oltipraz on benzo[a]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice. *Carcinogenesis*, **24**, 461-7.
- Rani, A. J., ve S. V. Mythili. (2014). Study on total antioxidant status in relation to oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Diagn Res*, **8**, 108-10.

- Reyes-Toso, C. F., M. I. Roson, L. E. Albornoz, P. F. Damiano, L. M. Linares, ve D. P. Cardinali. (2002). Vascular reactivity in diabetic rats: effect of melatonin. *J Pineal Res*, **33**, 81-6.
- Rhee, S. H., A. C. Keates, M. P. Moyer, ve C. Pothoulakis. (2004). MEK is a key modulator for TLR5-induced interleukin-8 And MIP3alpha gene expression in non-transformed human colonic epithelial cells. *J Biol Chem*, **279**, 25179-88.
- Saran, R., Y. Li, B. Robinson, J. Ayanian, R. Balkrishnan, J. Bragg-Gresham, J. T. Chen, E. Cope, D. Gipson, K. He, W. Herman, M. Heung, R. A. Hirth, S. S. Jacobsen, K. Kalantar-Zadeh, C. P. Kovesdy, A. B. Leichtman, Y. Lu, M. Z. Molnar, H. Morgenstern, B. Nallamothu, A. M. O'Hare, R. Pisoni, B. Plattner, F. K. Port, P. Rao, C. M. Rhee, D. E. Schaubel, D. T. Selewski, V. Shahinian, J. J. Sim, P. Song, E. Streja, M. Kurella Tamura, F. Tentori, P. W. Eggers, L. Y. Agodoa, ve K. C. Abbott. (2015). US Renal Data System 2014 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis*, **66**, Svii, S1-305.
- Schmidt, A. M., S. D. Yan, J. L. Wautier, ve D. Stern. (1999). Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*, **84**, 489-97.
- Schmitz, T., S. Endesfelder, L. J. Chew, I. Zaak, ve C. Buhner. (2012). Minocycline protects oligodendroglial precursor cells against injury caused by oxygen-glucose deprivation. *J Neurosci Res*, **90**, 933-44.
- Schuhmacher, S., M. Oelze, F. Bollmann, H. Kleinert, C. Otto, T. Heeren, S. Steven, M. Hausding, M. Knorr, A. Pautz, K. Reifenberg, E. Schulz, T. Gori, P. Wenzel, T. Munzel, ve A. Daiber. (2011). Vascular dysfunction in experimental diabetes is improved by pentaerithryl tetranitrate but not isosorbide-5-mononitrate therapy. *Diabetes*, **60**, 2608-16.
- Sena, C. M., A. M. Pereira, ve R. Seica. (2013). Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta*, **1832**, 2216-31.
- Shahzad, K., F. Bock, M. M. Al-Dabet, I. Gadi, S. Nazir, H. Wang, S. Kohli, S. Ranjan, P. R. Mertens, P. P. Nawroth, ve B. Isermann. (2016). Stabilization of endogenous Nrf2 by minocycline protects against Nlrp3-inflammasome induced diabetic nephropathy. *Sci Rep*, **6**, 34228.

- Shahzad, K., F. Bock, W. Dong, H. Wang, S. Kopf, S. Kohli, M. M. Al-Dabet, S. Ranjan, J. Wolter, C. Wacker, R. Biemann, S. Stoyanov, K. Reymann, P. Soderkvist, O. Gross, V. Schwenger, S. Pahernik, P. P. Nawroth, H. J. Grone, T. Madhusudhan, ve B. Isermann. (2015). Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy. *Kidney Int*, **87**, 74-84.
- Shai, I., R. Jiang, J. E. Manson, M. J. Stampfer, W. C. Willett, G. A. Colditz, ve F. B. Hu. (2006). Ethnicity, obesity, and risk of type 2 diabetes in women: a 20-year follow-up study. *Diabetes Care*, **29**, 1585-90.
- Shen, B., C. L. Ye, K. H. Ye, ve J. J. Liu. (2003). Mechanism underlying enhanced endothelium-dependent vasodilatation in thoracic aorta of early stage streptozotocin-induced diabetic mice. *Acta Pharmacol Sin*, **24**, 422-8.
- Shen, G., V. Hebbbar, S. Nair, C. Xu, W. Li, W. Lin, Y. S. Keum, J. Han, M. A. Gallo, ve A. N. Kong. (2004). Regulation of Nrf2 transactivation domain activity. The differential effects of mitogen-activated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of Raf and CREB-binding protein. *J Biol Chem*, **279**, 23052-60.
- Shi, Y., K. F. So, R. Y. Man, ve P. M. Vanhoutte. (2007). Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions in femoral arteries of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Br J Pharmacol*, **152**, 1033-41.
- Shi, Y., ve P. M. Vanhoutte. (2009). Reactive oxygen-derived free radicals are key to the endothelial dysfunction of diabetes. *J Diabetes*, **1**, 151-62.
- Sies, H., ve E. Cadenas. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells And organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **311**, 617-31.
- Simon, H. U., A. Haj-Yehia, ve F. Levi-Schaffer. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, **5**, 415-8.
- Skyler, J. S., R. Bergenstal, R. O. Bonow, J. Buse, P. Deedwania, E. A. Gale, B. V. Howard, M. S. Kirkman, M. Kosiborod, P. Reaven, R. S. Sherwin, Association American Diabetes, Foundation American College of Cardiology, ve Association American Heart. (2009). Intensive glycemic control and the prevention of cardiovascular events: implications of the ACCORD, ADVANCE, and VA diabetes trials: a position statement of the American Diabetes Association and a scientific statement of the American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association. *Diabetes Care*, **32**, 187-92.

- Son, S. M., M. K. Whalin, D. G. Harrison, W. R. Taylor, ve K. K. Griendling. (2004). Oxidative stress And diabetic vascular complications. *Curr Diab Rep*, **4**, 247-52.
- Song, Y., L. Wen, J. Sun, W. Bai, R. Jiao, Y. Hu, X. Peng, Y. He, ve S. Ou. (2016). Cytoprotective mechanism of ferulic acid against high glucose-induced oxidative stress in cardiomyocytes and hepatocytes. *Food Nutr Res*, **60**, 30323.
- Srivatsan, R., S. Das, R. Gadde, K. Manoj-Kumar, S. Taduri, N. Rao, B. Ramesh, A. Baharani, K. Shah, S. C. Kamireddy, G. Priyatham, T. A. Balakumaran, S. S. Balakumaran, A. Kamath, ve A. Rao. (2009). Antioxidants and lipid peroxidation status in diabetic patients with and without complications. *Arch Iran Med*, **12**, 121-7.
- Stocker, R., ve J. F. Keaney, Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, **84**, 1381-478.
- Stumvoll, M., B. J. Goldstein, ve T. W. van Haefen. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, **365**, 1333-46.
- Suzuki, S., M. Okada, K. Shibuya, M. Seino, A. Sato, H. Takeda, S. Seino, T. Yoshioka, ve C. Kitanaka. (2015). JNK suppression of chemotherapeutic agents-induced ROS confers chemoresistance on pancreatic cancer stem cells. *Oncotarget*, **6**, 458-70.
- Suzuki, T., ve M. Yamamoto. (2015). Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med*, **88**, 93-100.
- Szabo, C., J. G. Mabley, S. M. Moeller, R. Shimanovich, P. Pacher, L. Virag, F. G. Soriano, J. H. Van Duzer, W. Williams, A. L. Salzman, ve J. T. Groves. (2002). Part I: pathogenetic role of peroxynitrite in the development of diabetes And diabetic vascular complications: studies with FP15, a novel potent peroxynitrite decomposition catalyst. *Mol Med*, **8**, 571-80.
- Taddei, S., L. Ghiadoni, A. Virdis, D. Versari, ve A. Salvetti. (2003). Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance And preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des*, **9**, 2385-402.
- Tan, Y., T. Ichikawa, J. Li, Q. Si, H. Yang, X. Chen, C. S. Goldblatt, C. J. Meyer, X. Li, L. Cai, ve T. Cui. (2011). Diabetic downregulation of Nrf2 activity via ERK contributes to oxidative stress-induced insulin resistance in cardiac cells in vitro and in vivo. *Diabetes*, **60**, 625-33.

- Tian, Y., S. Guo, X. Wu, L. Ma, ve X. Zhao. (2015). Minocycline alleviates sevoflurane-induced cognitive impairment in aged rats. *Cell Mol Neurobiol*, **35**, 585-94.
- Tian, Y., X. Wu, S. Guo, L. Ma, W. Huang, ve X. Zhao. (2017). Minocycline attenuates sevoflurane-induced cell injury via activation of Nrf2. *Int J Mol Med*, **39**, 869-78.
- Tulis, D. A., W. Durante, X. Liu, A. J. Evans, K. J. Peyton, ve A. I. Schafer. (2001). Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene delivery inhibits injury-induced vascular neointima formation. *Circulation*, **104**, 2710-5.
- Ungvari, Z., Z. Bagi, A. Feher, F. A. Recchia, W. E. Sonntag, K. Pearson, R. de Cabo, ve A. Csiszar. (2010). Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **299**, H18-24.
- Vanhoutte, P. M. (2009). How We Learned to Say NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 1156-60.
- Vanhoutte, P. M., Y. Zhao, A. Xu, ve S. W. Leung. (2016). Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ Res*, **119**, 375-96.
- Velmurugan, G. V., N. R. Sundaresan, M. P. Gupta, ve C. White. (2013). Defective Nrf2-dependent redox signalling contributes to microvascular dysfunction in type 2 diabetes. *Cardiovasc Res*, **100**, 143-50.
- Venugopal, S. K., S. Devaraj, I. Yuhanna, P. Shaul, ve I. Jialal. (2002). Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression And bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*, **106**, 1439-41.
- Vericel, E., C. Januel, M. Carreras, P. Moulin, ve M. Lagarde. (2004). Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status. *Diabetes*, **53**, 1046-51.
- Versari, D., E. Daghini, A. Viridis, L. Ghiadoni, ve S. Taddei. (2009). Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care*, **32 Suppl 2**, S314-21.
- Vincent, A. M., J. W. Russell, P. Low, ve E. L. Feldman. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*, **25**, 612-28.

- Vollrath, V., A. M. Wielandt, M. Iruretagoyena, ve J. Chianale. (2006). Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *Biochem J*, **395**, 599-609.
- Wang, J., Q. Wei, C. Y. Wang, W. D. Hill, D. C. Hess, ve Z. Dong. (2004). Minocycline up-regulates Bcl-2 And protects against cell death in mitochondria. *J Biol Chem*, **279**, 19948-54.
- Watanabe, N., K. Shikata, Y. Shikata, K. Sarai, K. Omori, R. Kodera, C. Sato, J. Wada, ve H. Makino. (2011). Involvement of MAPKs in ICAM-1 expression in glomerular endothelial cells in diabetic nephropathy. *Acta Med Okayama*, **65**, 247-57.
- Wautier, M. P., O. Chappey, S. Corda, D. M. Stern, A. M. Schmidt, ve J. L. Wautier. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **280**, E685-94.
- Wheatcroft, S. B., I. L. Williams, A. M. Shah, ve M. T. Kearney. (2003). Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med*, **20**, 255-68.
- White, J. R., ve F. L. Pearce. (1982). Characterization of chlortetracycline (aureomycin) as a calcium ionophore. *Biochemistry*, **21**, 6309-12.
- Whiteman, M., ve B. Halliwell. (1997). Prevention of peroxynitrite-dependent tyrosine nitration And inactivation of alpha1-antiproteinase by antibiotics. *Free Radic Res*, **26**, 49-56.
- WHO. (2019). *Diabetes*. Erişim 07 Feb, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
- Willi, C., P. Bodenmann, W. A. Ghali, P. D. Faris, ve J. Cornuz. (2007). Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, **298**, 2654-64.
- Williams, S. B., A. B. Goldfine, F. K. Timimi, H. H. Ting, M. A. Roddy, D. C. Simonson, ve M. A. Creager. (1998). Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*, **97**, 1695-701.
- Xue, W., Y. Li, J. Li, L. Yan, ve F. Yang. (2018). Endothelium-dependent relaxation induced by etomidate in the aortas of insulin-resistant rats. *Arch Med Sci*, **14**, 1155-62.

- Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, K. Goto, ve T. Masaki. (1988). A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium And modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl*, **6**, S188-91.
- Yang, C. M., C. C. Lin, ve H. L. Hsieh. (2017). High-Glucose-Derived Oxidative Stress-Dependent Heme Oxygenase-1 Expression from Astrocytes Contributes to the Neuronal Apoptosis. *Mol Neurobiol*, **54**, 470-83.
- Zhang, L., A. Zalewski, Y. Liu, T. Mazurek, S. Cowan, J. L. Martin, S. M. Hofmann, H. Vlassara, ve Y. Shi. (2003). Diabetes-induced oxidative stress And low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation*, **108**, 472-8.
- Zhao, D., C. Wang, S. Tang, C. Zhang, S. Zhang, Y. Zhou, ve X. Xiao. (2015). Reactive oxygen species-dependent JNK downregulated olaquinox-induced autophagy in HepG2 cells. *J Appl Toxicol*, **35**, 709-16.
- Zhao, W. X., S. S. Tang, X. Jin, C. M. Zhang, T. Zhang, C. C. Wang, Y. Sun, ve X. L. Xiao. (2013). Olaquinox-induced apoptosis is suppressed through p38 MAPK and ROS-mediated JNK pathways in HepG2 cells. *Cell Biol Toxicol*, **29**, 229-38.
- Zhou, Z., M. C. Connell, ve D. J. MacEwan. (2007). TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cell Signal*, **19**, 1238-48.
- Zhu, M., ve W. E. Fahl. (2001). Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 212-9.
- Zhu, S., I. G. Stavrovskaya, M. Drozda, B. Y. Kim, V. Ona, M. Li, S. Sarang, A. S. Liu, D. M. Hartley, D. C. Wu, S. Gullans, R. J. Ferrante, S. Przedborski, B. S. Kristal, ve R. M. Friedlander. (2002). Minocycline inhibits cytochrome c release And delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, **417**, 74-8.

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayın Prof. Dr. Ahmet Gökhan AKKAN
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Basvuru : 17.02.2017

Toplantı Tarihi : 07.03.2017

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, **Doktora Öğrencisi Çağla KARAKULAK**'a ait "Yüksek Glukozlu Ortamda Minosiklin'in Damar Yanıtlarına Olan Etkisinde JNK ve ERK Yolaklarının Rolü" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	80
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		01.04.2017/01.10.2018

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. İlhan İLKILIÇ
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Doç. Dr. Aygül EKİCİ
Üye

Doç. Dr. Uğur AKSU
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAR
Üye

Yrd. Doç. Dr. Aydın ÇEVİK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak.Yük. Müh
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

YÜKSEK GLUKOZLU ORTAMDA MİNOSİKLİN'İN DAMAR YANITLARINA OLAN ETKİSİNDE JNK VE ERK YOLAKLARININ ROLÜ

ORJİNALLİK RAPORU

%3 BENZERLİK ENDEKSİ	%3 İNTERNET KAYNAKLARI	%2 YAYINLAR	%0 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	dspace.trakya.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
2	www.acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
5	www.lfhk.cuni.cz İnternet Kaynağı	<%1
6	tkb.dergisi.org İnternet Kaynağı	<%1
7	www.dunyagida.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Çağla	Soyadı	Köse
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	07/05/1989
Uyruğu	TC	TC Kim No	43855561760
Email	cagla.k.kose@gmail.com	Tel	05554327969

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	
Yük.Lis.	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	2014
Lisans	Ege Üniversitesi	2011
Lise	Vefa Lisesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Haliç Üniversitesi	2018-
2.	Part Time	Pfizer İlaçları	6 Ay
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi		(YÖKDİL) 85

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Graphpad Prism 7	Çok iyi
End Note X8	Çok iyi
Biopac System MP150	İyi
Matlab 2018a	İyi

Yayımları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 2015

İyi Klinik Uygulamaları, 2018

Akılcı İlaç kullanımı, 2015

İleri Excel Uygulamaları, 2014

GMP, 2010

Relationship of homocysteine levels with lumbar spine and femur neck BMD in postmenopausal women, Kosova, 2015.

Esomeprazole use is independently associated with significant reduction of BMD: 1-year prospective comparative safety study of four proton pump inhibitors, Kosova, 2015.

Çağla Karakulak, , Sibel Ozmen Ozyazgan, Ahmet Gokhan Akkan Andleeb Shahzadi ve Oruc Allahverdiyev. Orfenadrinin sıçanlarda morfin bağımlılığına etkisi. 4-7 Nov-2013, 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 6. Klinik Farmakoloji Sempozyumu, 5. Klinik Toksikoloji Sempozyumu Antalya, Turkey. Seminar No: S-14, Page 115.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Seramik, yoga, klasik müzik, modern sanat