



---

**ADJUVAN ARTRİT OLUŞTURULMUŞ SIÇAN MODELİNDE MAS  
RESEPTÖR AGONİSTİ ANGIOTENSİN 1-7'NİN İZOLE TORASİK  
AORTA YANITLARINA VE RAGE (RECEPTOR FOR ADVANCED  
GLYCATION END PRODUCTS)' YE ETKİSİ**

**Öznur AÇIKALIN**

**Aralık, 2013  
DENİZLİ**

**ADJUVAN ARTRİT OLUŞTURULMUŞ SIÇAN MODELİNDE MAS  
RESEPTÖR AGONİSTİ ANĐİOTENSİN 1-7'NİN İZOLE TORASİK  
AORTA YANITLARINA VE RAGE (RECEPTOR FOR ADVANCED  
GLYCATION END PRODUCTS)' YE ETKİSİ**

**Pamukkale Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yüksek Lisans Tezi  
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**

**Öznur AÇIKALIN**

**Danışman: Doç. Dr. Funda F. BÖLÜKBAŞI HATİP**

**Aralık, 2013  
DENİZLİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU**

**Öznur AÇIKALIN** tarafından, Doç. Dr. Funda BÖLÜKBAŞI HATİP yönetiminde hazırlanan “**Adjuvan Artrit Oluşturulmuş Sıçan Modelinde, Mas Reseptör Agonisti Angiotensin (1-7) ‘nin İzole Torasik Aorta Yanıtlarına ve RAGE ( Reseptör for Advanced Glycation End products) ‘ye Etkisi**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. İzzettin HATİP  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Dursun DURSUNOĞLU  
Jüri Üyesi

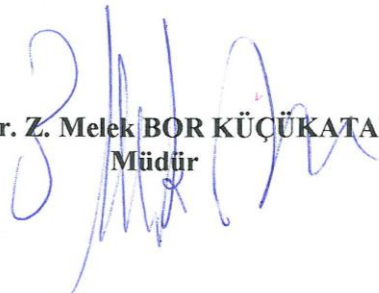


Doç. Dr. Funda BÖLÜKBAŞI HATİP  
Jüri Üyesi(Danışman)

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
ve 5/5-1 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

11.12.15. tarih

**Prof. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY**  
Müdür



Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza:

Öğrenci Adı Soyadı: Öznur Açıkalin

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ve bu tezin tüm aşamalarında, bilgi ve yardımlarını benimle paylaşan, desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İzzettin HATİP'e, danışman hocam Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Funda F. BÖLÜKBAŞI HATİP'e, ders aşamasındaki katkıları için Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Selim KORTUNAY hocama, tez çalışmalarımda destek ve yardımlarını gördüğüm Uzm. Dr. Nermin BÖLÜKBAŞI'na, Arş. Gör. Ecz. F. Rüyal TAN'a ve Ecz. S.Onur TURUNÇ'a teşekkür ederim.

Bu çalışmada kullanılan Freund's complet adjuvantı sağlayan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD'nden Prof. Dr. Mehmet MELLİ hocama teşekkür ederim.

Eğitim sürem boyunca destek, sevgi ve sabırlarını esirgemeyen, varlıklarıyla bana güç veren ailem, özellikle canım babam Nazif SARICA'ya, annelerim Cennet SARICA ve Güler AÇIKALIN'a, sevgili kardeşlerime, her zaman yanımda olduğunu hissettiren biricik eşim Orhan AÇIKALIN'a ve tabi ki içimi aydınlatan canım kızım Işık AÇIKALIN'a teşekkür ederim.

Ecz. Öznur AÇIKALIN

## ÖZET

### ADJUVAN ARTRİT OLUŞTURULMUŞ SIÇAN MODELİNDE MAS RESEPTÖR AGONİSTİ ANGIOTENSİN 1-7'NİN İZOLE TORASİK AORTA YANITLARINA VE RAGE (RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS)' YE ETKİSİ

Açıkalın, Öznur

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Farmakoloji ABD  
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Funda F. BÖLÜKBAŞI HATİP

Aralık 2013, 64 Sayfa

Romatoid Artritte (RA)'da inflamasyonla birlikte oluşan erken vasküler hasar sonrası endotelial fonksiyonlarda azalma görülmektedir. Deneysel artrit modellerinde de artritin şiddetine bağlı olarak vasküler reaktivitede değişiklikler söz konusudur. Angiotensin 1-7 (Ang 1-7) Mas Reseptör (MasR) agonistidir ve kardiyovasküler homeostazda merkezi bir role sahiptir. Vasodilatör, hipotansif, anti aritmik ve kalbi koruyucu etkilerinin yanı sıra vasküler, antiinflamatuvar etkilere de sahiptir.

Çalışmamızda, Freund's Complete Adjuvant (FCA) ile indüklenen sıçan artrit modeli kullanılarak, Ang 1-7'nin artrit bulguları, izole torasik aorta damar yanıtları, kan sRAGE, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  seviyelerini inceledik.

Bu çalışmada 30 adet erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. FCA 0.1mL sağ arka pençe plantar yüzeye intradermal verilerek artrit oluşturuldu. Artrit bulguları 1., 3., 7., 10. ve 15. günlerde değerlendirildi. Ang 1-7, FCA verildikten 7 gün sonra, 3mg/kg i.p. olarak 8 gün boyunca verildi. Pençe ödemi vernier kaliper, indirekt kan basıncı ölçümü tail-cuff yöntemi ile ölçüldü. Endotelli ve endotelsiz aort yanıtları 8 kanallı izole organ banyosunda incelendi. Kasıcı yanıtlar fenilefrin ve KCl, gevşeme yanıtları ise asetilkolin ve sodyum nitroprusid ile değerlendirildi. ELISA kitlerle serum sRAGE, TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  seviyelerine ve immünohistokimyasal olarak aorta preparatları değerlendirildi.

Artritli sıçanlarda FCA verilmesini takiben 3. günden itibaren artrit bulguları olan ağırlıkta azalma, arterial basınçta ve pençe ödeminde artış görülmüştür. FCA uygulanması, TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'yi artırırken sRAGE'yi azaltmıştır. Endotel zedelenmesinin ACh gevşemesini ve Ang1-7'nin gevşetici etkisini azalttığı görüldü. Ang 1-7'nin, artritli sıçanlarda artan pençe ödeminin, kan basıncının, aortada kasılma yanıtlarını ve TNF- $\alpha$  seviyelerini azaltırken, sRAGE'yi arttırdığı saptanmıştır.

Sonuç olarak Ang 1-7 tedavisi, artrit bulguları ve endotel fonksiyonları üzerine olumlu etkileri nedeniyle artritli hastalarda önemli bir tedavi seçeneği olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Adjuvan artrit, Aort, Endotel, Ang 1-7, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , RAGE

**ABSTRACT****EFFECT OF MAS RECEPTOR AGONIST ANGIOTENSIN 1-7 ON THORACIC AORTA RESPONSE AND RAGE (RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS) IN RAT ADJUVANT ARTHRITIS MODEL****Açıklan, Öznur****Master Thesis, Medical Pharmacology****Thesis supervisor: Associate Professor Dr. Funda F. BÖLÜKBAŞI HATİP****December 2013, 64 Pages**

A decrease in endothelial function consequent to the vascular damage associated with the inflammation is observed in the rheumatoid arthritis (RA). Changes in the vascular reactivity, related to the severity of arthritis, are also observed in experimental arthritis models. Angiotensin 1-7 (Ang 1-7) is MasR agonist and plays a central role in the cardiovascular homeostasis. It has vasodilator, hypotensive, antiarrhythmic and cardioprotective effects besides vascular antiinflammatory activities.

In our study, we used Freund's Complete Adjuvant (FCA)-induced rat arthritis model, investigated the effect of Ang 1-7 on thoracic aortic responses, and blood levels of sRAGE, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ .

In this study, 30 male Wistar rats were used. Arthritis was induced by intradermal injection of 0,1 mL FCA into the plantar surface of right hind limb. Arthritis parameters were evaluated on day 1, 3, 7, 10 and 15. Ang 1-7 (3 mg/kg i.p) was administered 7 days after FCA. Paw edema and indirect blood pressure were measured using vernier caliper and tail-cuff methods respectively. The aortic (with and without endothelium) responses were investigated using isolated organ bath. The contractile responses were induced by phenylephrine and KCl, whereas the relaxation was induced by acetylcholine and sodium nitroprussid. Serum sRAGE, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were analyzed by ELISA and aortic preparations were evaluated immunohistochemically.

Body weight was decreased, whereas paw edema and blood pressure were increased in the arthritic rats 3 days after FCA administration. Moreover, FCA increased TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , but decreased sRAGE. Damaging the endothelium reduced ACh-relaxation and the relaxing effect of Ang 1-7. Ang 1-7 decreased paw edema, blood pressure, aortic contractile responses and TNF- $\alpha$  levels, but increased sRAGE in the arthritic rats.

In conclusion: Ang1-7 could be a significant choice in the treatment of patients with arthritis due to its positive effects on arthritic complications and endothelial functions.

**Key words: Adjuvant arthritis, Aorta, Endothelium, Ang1-7, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , RAGE**

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
Tez Onay Sayfası.....	i
Bilimsel Etik Sayfası.....	ii
Teşekkür.....	iii
Özet.....	iv
Abstract.....	v
İçindekiler.....	vi
Şekiller Dizini.....	ix
Resimler Dizini.....	xi
Kısaltmalar Dizini.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1. Romatoid Artrit.....	3
2.1.1. Epidemiyolojisi.....	3
2.1.2. Etiyolojisi.....	3
2.1.3. Patogenez.....	4
2.2. İnflamasyon.....	5
2.2.1. IL-1 $\beta$ .....	6
2.2.2. TNF- $\alpha$ .....	7
2.3. Vasküler Endotel.....	8
2.3.1. Nitrik oksit (NO).....	10
2.4. Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS).....	11
2.4.1. Ang 1-7.....	13
2.5. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE).....	15
2.5.1. RAGE.....	17



2.6. Kimyasal Maddeler.....	19
2.6.1. Ang 1-7.....	19
2.6.2. Asetilkolin (ACh).....	20
2.6.3. Fenilefrin (Phe).....	21
2.6.4. Sodyum nitroprusid (NaNP).....	22
2.6.5. Potasyum klorür (KCl).....	22
2.7. Sıçan Adjuvan Artriti.....	23
3. MATERYAL VE METOT.....	24
3.1. Adjuvan Artrit İndüksiyonu.....	24
3.2. Artrit Bulgularının Değerlendirilmesi.....	24
3.3. Deney Protokolü.....	25
3.4. Organ Banyosu Çalışması .....	27
3.5. TNF- $\alpha$ ve IL-1 $\beta$ Elisa Çalışmaları .....	29
3.6. İstatiksel Analiz.....	29
3.7. İlaçlar.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Adjuvan Artritli Sıçanlarda Ağırlık, Kan Basıncı ve Pençe Ödemi Ölçümü.....	31
4.1.1. Ağırlık.....	31
4.1.2. Kan basıncı.....	32
4.1.3. Pençe ödemi ölçümü.....	32
4.2. İzole Torasik Aorta Yanıtları.....	33
4.2.1. Kasılma yanıtları.....	33
4.2.1.1. Fenilefrin.....	33
4.2.1.2. KCl.....	35
4.2.2. Gevşeme yanıtları.....	37
4.2.2.1. Asetilkolin.....	37
4.2.2.2. NaNP.....	38
4.3. Elisa Kitlerle IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ve sRAGE Sonucu.....	40
4.3.1. IL-1 $\beta$ sonucu.....	40
4.3.2. TNF- $\alpha$ sonucu.....	41
4.3.3. sRAGE sonucu.....	43
4.4. İmmünohistokimyasal RAGE analizi.....	43
5. TARTIŞMA.....	45
6. SONUÇ.....	50

KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	62

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1 IL-1 ve TNF- $\alpha$ 'nın endotel hücre içi aktivasyonu.....	6
Şekil 2.2 IL-1 ve TNF- $\alpha$ 'nın RA patogenezindeki rolü.....	8
Şekil 2.3 Hücre içi NO sentezi.....	11
Şekil 2.4 Renin anjiotensin sistemi.....	12
Şekil 2.5 RAS ürünleri ve sentezi.....	13
Şekil 2.6 Klasik RAS ile alternatif RAS karşılaştırılması.....	14
Şekil 2.7 AGE ve RAGE endotel hücre içi sinyalizasyon yolları.....	17
Şekil 2.8 AGE, RAGE etkileşimi.....	18
Şekil 2.9 RAGE aktivasyonu sonrası hücre içi sinyalizasyon yolağı.....	19
Şekil 4.1 Artritli sıçanlarda ağırlık değişikliği ve Ang 1-7'nin etkisi.....	31
Şekil 4.2 Artritli sıçanlarda kan basıncı değişikliği ve Ang 1-7'nin etkisi.....	32
Şekil 4.3 Artritli sıçanlarda pençe ödemi ve Ang 1-7'nin etkisi.....	33
Şekil 4.4 Endotelli preparatlarda fenilefrin kümülatif kasılma yanıtları.....	34
Şekil 4.5 Endotelsiz preparatlarda fenilefrin kümülatif kasılma yanıtları.....	35
Şekil 4.6 Endotelli torasik aorta preparatlarında KCl ile indüklenen kasıcı yanıtların gruplar üzerindeki etkisi.....	36
Şekil 4.7 Endotelsiz torasik aorta preparatlarında KCl ile indüklenen kasıcı yanıtların gruplar üzerindeki etkisi.....	36
Şekil 4.8 Submaksimal fenilefrin ile prekontrakte edilen endotelli aort preparatlarında ACh ile elde edilen gevşeme yanıtı.....	37
Şekil 4.9 Submaksimal fenilefrin ile prekontrakte edilen endotelsiz aort preparatlarında ACh ile elde edilen gevşeme yanıtı.....	38
Şekil 4.10 Submaksimal fenilefrin ile prekontrakte edilen endotelli aort preparatlarında NaNP'nin etkisi.....	39
Şekil 4.11 Submaksimal fenilefrin ile prekontrakte edilen endotelsiz aort preparatlarında NaNP'nin etkisi.....	39

Şekil 4.12 IL-1 $\beta$ analizi için kullanılan standart ve güvenilirlik alanı.....	40
Şekil 4.13 Artritli sıçanlarda IL-1 $\beta$ değişikliği ve Ang 1-7'nin etkisi.....	41
Şekil 4.14 TNF- $\alpha$ analizi için kullanılan standart ve güvenilirlik alanı.....	42
Şekil 4.15 Artritli sıçanlarda TNF- $\alpha$ değişikliği ve Ang 1-7'nin etkisi.....	42
Şekil 4.16 Artritli sıçanlarda sRAGE değişikliği ve Ang 1-7'nin etkisi.....	43

**RESİMLER DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
Resim 3.1 Peçe ödemi.....	25
Resim 3.2 Kan alma.....	26
Resim 3.3 Aort çıkarma.....	27
Resim 3.4 İzole aort preparatı.....	27
Resim 4.1 Kontrol (a), Artrit (b) ve Ang 1-7 - Art.(c) gruplarında RAGE immünohistokimyasal görüntüsü.....	44

## KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACh	Asetilkolin
AGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri
Ang 1-7	Angiotensin 1-7
Ang I	Angiotensin-1
Ang II	Angiotensin-2
AP-1	Aktive Protein-1
BH4	Tetrahidrobiopterin
cNOS	Konstitüf Nitrik Oksit Sentaz
DAG	Diaçilgliserol
DN-RAGE	Dominant Receptor For Advanced Glycation End Products
EDRF	Endotel Kaynaklı Relaxition Faktör
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FCA	Freund's Complet Adjuvant
FMN	Flavin Mononükleotid
GMP	Guanosin Monofosfat
GTP	Guanosin Trifosfat
ICAM-1	İntrasellüler Adezyon Molekülü-1
IFN- $\gamma$	İnterferon Gamma
IgG	İmmunoglobulin-G
IL-1	İnterlökin-1
IL-2	İnterlökin-2
IL-10	İnterlökin-10
IL-1 $\beta$	İnterlökin 1-beta
IP3	İnositol-3 Fosfat
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
COX-2	Siklooksijenaz-2
MasR	Mas Reseptörü
MLCP	Miyosin Hafif Zincir Fosfotaz
NADPH	Nikotinomid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaNP	Sodyum Nitroprusid
NF-kB	Nükleer Faktör kappa-B
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
PAF	Platet Aktive Edici Faktör
PGI	Prostasiklin
RA	Romatoid Artrit
RAS	Renin Angiotensin Sistemi

RAGE	Receptor For Advanced Glycation End Products
RF	Romatoid Faktör
sRAGE	Solubl Receptor For Advanced Glycation End Products
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor – Beta
TNF- $\alpha$	Tümör Nekrozis Faktör - alfa
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1

## 1. GİRİŞ

Romatoid Artrit (RA), periferik eklemlerde simetrik dağılım gösteren, kalıcı sinovit ile karakterize, sistemik, otoimmün, kronik inflamatuvar bir hastalıktır (Firestein 2005). RA'da kardiyovasküler, hematolojik, solunum ve nörolojik sistem tutulumları (Gümüüşdiş 2003) ile birlikte göz, kas, böbrek gibi organ tutulumları olabilmektedir (Hurd 1979, Portio vd 1991). Özellikle kardiyovasküler sistem tutulumları kendi başına bir risk faktörüdür ve yüksek seviyelerde oluşan kronik inflamatuvar mediyatörler bu riskin artmasına katkıda bulunur (Voskuyl 2006). RA'da inflamasyonla birlikte oluşan erken vasküler hasar sonrası (Kaplan ve McCune 2003) endotelial fonksiyonlarda azalma görülmektedir (Hurlimann vd 2002). Deneysel artrit modellerinde de artrit şiddetine bağlı olarak vasküler reaktivitede değişiklikler söz konusudur (Ülker vd 2000).

Ang 1-7, Mas reseptör (MasR) agonistidir (Santos vd 2003). Ang 1-7, Renin Anjiotensin Sisteminin (RAS) ana ürünlerinden biridir (Santos vd 2008) ve kardiyovasküler homeostazda merkezi bir role sahiptir. Vasodilatör, hipotansif etkilerinin yanı sıra (Ferrario vd 2005, Mercure vd 2008) koroner arterleri dilate edebildiği, koroner kan akımını artırabildiği, damar düzeyinde antiinflamatuvar etkileri olduğu düşünülmektedir (Santos ve Ferreira 2007). Bu olumlu etkiler nedeniyle farklı ilaç gruplarının Ang 1-7 düzeyleri üzerine etkileri incelenmektedir.

İleri glikasyon son ürünleri (AGE) kanda yüksek seyreden şeker düzeyleri sonucu oluşan glikasyon son ürünleridir ve RA gibi inflamatuvar hastalıklarda da ortaya çıkar (Singh vd 2001). RAGE (receptor for advanced glycation endproducts), immunoglobulin G (IgG) süper ailesinin bir üyesidir ve AGE'ler dışında inflamatuvar sitokinler tarafından da uyarılabilir ve ekspresyonu inflamasyonla artar (Peyroux ve Sternberg 2006, Bierhaus vd 2006). AGE'ler etkilerini RAGE olarak adlandırılan hücre



yüze reseptör kompleksi ile etkileşimleri aracılığı ile oluşturur (Prevost vd 1999). AGE'ler, RAGE'lere bağlandıklarında hücre içi sinyal yolları uyarılır, inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu sağlanır (Lapolla vd 2005, Inan vd 2003, Ruiz-Ortega vd 2006). Patolojik bir durum söz konusu olduğunda örneğin inflamasyonda, RAGE ekspresyonu artmaktadır (Peyroux ve Sternberg 2006, Bierhaus vd 2006).

Bu bilgiler ışığında özetle, son yıllarda RAS sistemi ile inflamatuvar hastalıklar arasında giderek artan bir bağlantının olduğu bildirilmektedir (Owen ve Campbell 1998, Ruiz-Ortega vd 2001).

Çalışmamızda insanlarda görülen RA'ya birçok yönü ile benzemesi nedeni ile Freund's Complet Adjuvant (FCA) ile indüklenen artrit modeli kullanılmıştır (Sokoloff 1984). Ang 1-7'nin, FCA ile indüklenen artrit oluşturulan sıçanlarda torasik aorta yanıtları ve RAGE'ye etkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Ang 1-7'nin damar düzeyinde antiinflamatuvar etkilerinin olduğuna dair sınırlı sayıda çalışmalar olmakla birlikte bu konu giderek önem kazanmaktadır (Santos ve Ferreira 2007). Ang 1-7'ye yönelik tedaviler güncel araştırma konularının başında gelmektedir.

Bu nedenle çalışmamızda, tek doz FCA ile indüklenen sıçan adjuvan artrit modelinde, RAS ana ürünlerinden olan ve Ang II'ye ters yönde etki gösteren MasR agonisti Ang 1-7'nin, artritli sıçanlarda ağırlığa, kan basıncına, pençe ödemeine, izole torasik aorta yanıtlarına, kanda, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , sRAGE seviyelerine ve ek olarak immünohistokimyasal olarak aorta üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## **2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI**

### **2.1. Romatoid Artrit**

RA, özellikle periferik sinovial eklemleri simetrik tutan, kronik inflamasyonla karakterize otoimmün sistemik bir hastalıktır (Firestein 2005).

#### **2.1.1. Epidemiyolojisi**

RA'nın değişik popülasyonlarda prevalansı %0,8 olarak tahmin edilmektedir. Kadınları, erkeklere oranla 2,5 kat daha fazla tutar. İnsidansı 60-64 yaş arası kadınlarda, 18-29 yaş arası kadınlara oranla 6 kat daha fazladır (Rindfleisch ve Muller 2005). Yaş ilerledikçe cinsiyet farkı azalır.

#### **2.1.2. Etiyolojisi**

RA'nın nedeni kesin olarak bilinmemekle beraber, etiyolojide rol oynadığı tahmin edilen faktörler; infeksiyon ajanları, genetik faktörler, immün sistem bozukluğu, stres, cinsiyet, travma, endokrin ve çevresel faktörler olarak sayılabilir (Gümüşdiş 2003).

RA'nın oluşumunda genetik faktörlerin rol oynadığını düşündüren, çalışmaları destekleyen mekanizma; tek yumurta ikizlerinde hastalığın ikinci ikizde çıkma şansının, çift yumurta ikizlerine göre 5 kat daha fazla oluşudur. Bu durum genetik faktörün önemini göstermektedir. Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-10 (IL-10) genlerindeki polimorfizmler ve kromozom 3 (3q13)'deki bir bölge de RA ile ilişkilidir (Symons vd 1997).

RA kadınlarda daha sık görülen birçok kronik inflamatuvar otoimmün hastalıktan birisidir. Östrojenlerin immün sistem üzerine genel olarak stimülatör etkisi vardır. Bu durum gebeliğin son dönemlerinde hastalığın sıklıkla remisyona girerek, doğumdan haftalar veya aylar sonra romatoid faktör (RF) titrelerinin artışıyla birlikte hastalığın alevlenmesiyle açıklanabilir. Gebelik süresince IL-10 gibi baskılayıcı sitokinlerin salımının artması veya hücrel immünitedeki değişiklikler bu durumu açıklayabilir. (Firestein 2005).

Çevresel faktörlerin bir kısmı RA yatkınlığı ile açık bir şekilde ilgili olabilir. Sigara içmek RA'da romatoid nodül ve çoklu eklem tutulumu ile ilişkilidir (Harel-Meir vd 2007). Kafeinsiz kahve tüketimi bağımsız olarak RA başlaması ile pozitif ilişki gösterirken, çay içimi ile hastalık başlangıcı arasında ters ilişki vardır.

### **2.1.3. Patogenez**

RA patogenezinde, hümmoral ve hücrel bağışıklık mekanizmaları birlikte rol oynar. RA'da primer inflamasyon eklemdeki sinoviyumdur (Paleolog ve Miotla 1999).

Romatoid sinovyumda, ilk olarak T hücrelerinin yoğunlukta olduğu bir hücre artışı olur. Bu durum; sinovyal mikro dolaşımında tıkanma, hücre büyümesi ve hücreler arası mesafenin açılmasına neden olur. Daha sonra, makrofaj ve dentrik hücre akımı ve bunların salgıladığı sitokinlerde artış olur. Sonuç olarak inflamasyon artar, sinovyum hipertrofik bir hale gelir ve kıkırdağı yavaş yavaş aşındırmaya başlar. Sinovyal hücrelerde artmış inflamasyon ve bunlara bağlı proliferasyon olmuş sinovyal oluşumlara pannus denir. Romatoid sinovyum ve pannuslar ayrıca yeni damarlar oluşturur ve bu damarlarda bulunan makrofaj, fibroblast ve lenfosit hücreleri angiogeneze neden olur (Direskeneli 2002).

Ayrıca romatoid sinovyada bulunan lizozomal enzimlerin, normal tavşan eklemine enjekte edilmesiyle inflamasyonun ve kıkırdak hasarının alevlendiği yapılan çalışmalarda görülmüştür (Brothers ve Hadler 1983).

RA patogenezinde, inflamatuvar sürecin CD4+ hücre aktivasyonuna bağlı olarak başladığı bilinmektedir. Aktive olan bu hücreler, interlökin-2 (IL-2) ve interferon

gamma (IFN- $\gamma$ ) gibi belirli sitokinleri salgılayarak T lenfosit hücrelerini, makrofajları ve fibroblastları uyarır. IFN- $\gamma$ , monosit ve makrofaj hücrelerinin sentezlenmesini buna bağlı sekresyonlarını aktive eder. Makrofajların aktive olmasıyla interlökin-1 (IL-1) ve TNF- $\alpha$  salgılanması artar (Direskeneli 2002). Ayrıca yardımcı T lenfositler tarafından aktive edilen B lenfositler, plazma hücrelerinden Ig ve RF salgılanmasına neden olurlar. Ig'ler sinovyal membranda, sinovyal sıvı ve eklem kıkırdağındaki antijenle birleşerek immün kompleksleri oluştururlar. Eklem boşluğuna serbestçe yayılan immün kompleksler, burada aktive olarak kemotaktik faktörlerin salınmasına yol açarlar. Kemotaktik faktörler, damar geçirgenliğini artırırlar, polimorfonükleer lökositlerin ve monositlerin bu bölgede toplanmasını sağlarlar. Bu hücreler immün kompleksleri fagosite ederek, doku hasarına neden olan lökotrien, serbest radikal, prostoglandin ve proteolitik enzimlerin yapım ve serbestleşmesine neden olurlar (Direskeneli 2002). Bu nedenle sinoviyumu kaplayan hücrelerin sayısında artış, mononükleer hücrelerin perivasküler alanında infiltrasyon, mikrovasküler hasar, sinoviyumu kaplayan hücrelerde hipertrofi ve hiperplazi, tromboz gibi fokal veya segmental damar değişiklikleri ve küçük kan damarları etrafında toplanmış mononükleer hücre infiltrasyonları görülür (Goldring 2002).

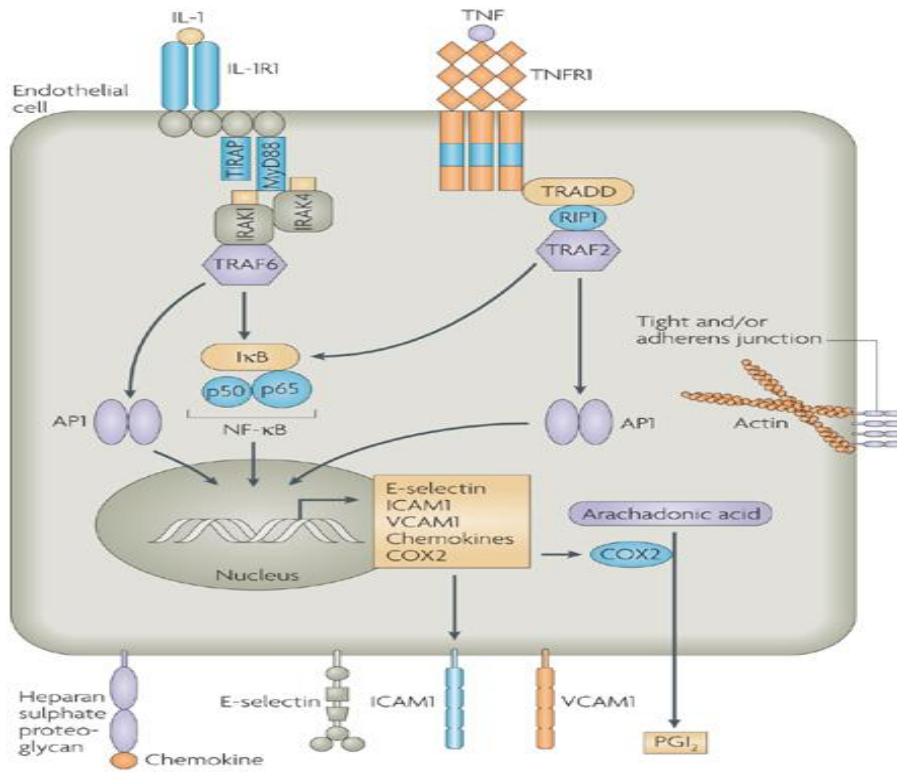
RA patogenezinde, yukarıda da bahsettiğimiz gibi sitokinlerin önemli rolleri vardır. Sitokinler, immün sistem hücreleri tarafından salınan, hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını, hücreler arası kimyasal haberleşmeyi sağlayan, immün cevabı düzenleyen proteinlerdir (Gültekin 2005).

## 2.2. İnflamasyon

İnflamasyon, canlı dokunun her türlü hasar oluşturan uyarana karşı gösterdiği ortak bir reaksiyondur. İnflamasyona çeşitli zararlı uyarılar, infeksiyonlar, antikolar veya fiziksel hasarlar neden olabilir. İnflamasyon sırasında humoral ve hücrel yanıtlarla birlikte organizmayı zedeleyici etken çevrelenerek yok edilir, zararlı süreçlerin sınırlandırılması sağlanır ve takiben doku onarımı yapılır. Histamin, serotonin, lökotrienler, prostaglandinler, bradikinin, plazma proteazları, plaket aktive edici faktör (PAF) ve serbest oksijen radikalleri gibi çeşitli inflamatuvar mediatörleri bölgede

birikirler ve doku hasarını hızla iletirler (Schwab ve Bartholdi 1996, Grossman vd 1999).

RA'da, sinoviyada düzeyleri artarak aktive olan sitokinlerden, en belirgin artışlar, TNF- $\alpha$  ve IL-1'de görülür (Turesson vd 1999). IL-1 ve TNF gibi sitokinler, proinflamatuvar sitokinlerdir ve inflamatuvar değişikliklerin oluşmasında, patojenin eliminasyonunu sağlayan hızlı bağışıklık yanıtının ortaya çıkmasında rol oynarlar (Rapalino vd 1998).



**Şekil 2.1:** IL-1 ve TNF- $\alpha$ 'nın endotel hücre içi aktivasyonu (Pober ve Sessa 2007)

### 2.2.1. IL-1 $\beta$

IL-1 monositler, lenfositler, endotel hücreleri ve mikroglialar gibi bağışıklık sistemi hücrelerinden salınır. İnflamasyon ile seyreden otoimmün hastalıkların oluşumunda etkisi olduğu düşünülür (Gardner vd 2003, Kuralay ve Çavdar 2006).

IL-1'in, endojen ve ekzojen birçok etkisi bulunur. IL-1 klasik olarak IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  olmak üzere 2 alt tip olarak tanımlanır. Her ikisi de benzer etkiye sahiptir. IL-1 $\beta$ 'nın

etkilerini gösterebilmesi için IL-1R1 reseptörüne bağlanması gerekir (Akira vd 1993, Dinarello 1998).

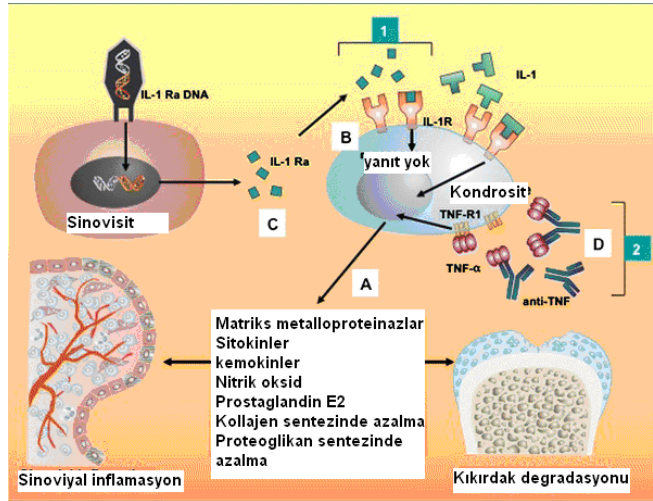
### 2.2.2. TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  birçok inflamatuvar ve enfeksiyöz hastalığın patogeneğinde önemli rol alır. TNF- $\alpha$ 'nın major kaynağı aktive olmuş monosit ve makrofajlardır. TNF, 233 aminoasit ve 26 kDA ağırlığında proproteinden sentezlenir. TNF etkisini membran bağımlı reseptör molekülleri TNF reseptör (TNFR) I (p55) ve TNFR II (p75) aracılığıyla gösterir (Dinarello 1998). TNF- $\alpha$ 'nın önemli fonksiyonları, lökositler için vasküler endotel hücre adezyonunun indüksiyonu, inflamatuvar sitokinlerden özellikle IL-1'i uyarılması, lökosit aktivasyonu, endotel hücreler ve astrositler üzerinde intrasellüler adezyon molekülü 1 (ICAM-1) ekspresyonunu artırması sayılabilir (Bazzoni ve Beutler 1996, Pober ve Sessa 2007).

İnflamatuvar sitokinlere yanıt olarak gerek IL-1 ve gerekse TNF- $\alpha$  ilgili reseptörlerine bağlanarak hücre içerisinde sinyalizasyonu başlatırlar. IL-1 ve TNF- $\alpha$ 'nın ilgili reseptörlerine bağlanması sonucu ortaya çıkan kompleksler, transkripsiyon faktörleri olan nükleer faktör-kappa B (NF-Kb) ve aktive protein-1 (AP-1) aktivasyonuna neden olacak mitojen aktive kinazların aktivasyonunu sağlar. Bu faktörler nükleus içerisinde proinflamatuvar proteinlerin ekspresyonuna neden olacak spesifik genlerin transkripsiyonunu başlatır. Bunlar arasında ICAM-1, vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), e-selektin, siklooksijenaz-2 (COX-2), kemokinler sayılabilir. COX-2, arteriolar endotel hücrelerde prostasikline (PGI) dönüşümü sağlayan COX-1'in etkinliğini artırır (Şekil 2.1).

RA'da inflamasyon, yaygın olarak subklinik vaskülitte, endotel hasarına ve hızlanmış ateroskleroza yol açmaktadır. Bu durum RA'de etkili olan IL-1 ve TNF- $\alpha$ 'nın, endotelde hücre adhezyon moleküllerinin salgılamasını ve permeabilitelerini artırmakta, inflamasyon hücrelerinin damar duvarından geçişini kolaylaştırmaktadır (Pober ve Sessa 2007). TNF- $\alpha$ , RA'da endotel tabakasının disfonksiyonundan sorumlu tutulan en önemli mediyatördür. TNF- $\alpha$  inflamasyonun başlamasında ve ilerlemesinde rol alır, endotel bağımlı gevşemeyi azaltır. TNF- $\alpha$  asetilkolin (ACh) bağımlı gevşeme için gerekli endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin aktivasyonunu bloke eder

(Hurlimann vd 2002, Metsios vd 2010). Özellikle TNF- $\alpha$  olmak üzere, RA'da sitokin düzeyleri normal bireylere göre daha yüksek saptanmakta ve vasküler hastalığın devam etmesine neden olmaktadır. Bu durum; inflamasyonun kardiyovasküler hastalıklar ve ateroskleroz oluşumunda önemli bir rol oynamasına neden olmaktadır. (Rincon vd 2001, Meyer 2001, Mikulus ve Saag 2001, Hurlimann vd 2002, Coblyn ve O'Gara 2003, Menekşe vd 2004).



Şekil 2.2: IL-1 ve TNF- $\alpha$ 'nın RA patogenezi (Calich vd 2010)

### 2.3. Vasküler Endotel

Endotel, organizmanın tüm kan damarlarının yüzeyini kaplayan vasküler düz kas ile damar lümeni arasında bazal membran üzerine yerleşmiş tek sıra, yassı epitelyum hücrelerden oluşan bir dokudur. Endotel, dokularla kan arasında bulunan, sentezlediği ve salıverdiği mediyatörlerle vasküler homeostazın regülasyonundan sorumlu olan vücudun her tarafında bulunan aktif, dinamik bir organ niteliği taşır. Erişkinlerde endotel hücre kitlesi ortalama 1kg olup, 4000-7000 m<sup>2</sup> arası yüzey alanına sahiptir (Aird 2004).

Endotel hücreleri fizyolojik ve patolojik uyarılara yanıt olarak gevşetici ve kasıcı faktörler oluşturarak hemen altındaki damar düz kas hücrelerinin tonüsünü ayarlar. Normal endotelde vasodilatör, antitrombik, antiinflamatuvar, antioksidan ve antiproliferatif faktörlerle, vazokonstriktör, protrombik, proinflamatuvar ve oksidan

moleküller denge halindedir. RA'da sistemik inflamasyonla birlikte bu denge bozulur ve endotel disfonksiyonu, buna bağlı birçok kardiyovasküler ve sistemik hastalık ortaya çıkar (Faulx vd 2003, Sandoo 2010).

Endotel hücreleri seçici bir bariyerdir. Küçük moleküllerin, sıvıların ve çözülmüş maddelerin kontrollü olarak pinositotik veziküller içinde dokulara geçmesinde seçici geçirgen bir bariyer olarak görev alır. Aynı zamanda kan akımı değişikliklerine, gerilmeye ve inflamasyon mediyatörlerine yanıt olarak çeşitli maddeler salgılayarak kan akımını düzenler. Bu moleküller normalde az miktarlarda sentezlenirken, inflamasyon gibi anormal durumlarda daha fazla sentezlenerek, bazı kan hücrelerinin damar dışına çıkmasına yardım eder. Endotel hücre hasarı bütün bu hassas dengeyi bozar. (Wilentz vd 1987, Forstermann vd 1988, Meredith vd 1993, Ganong 1999, Ross vd 2003).

Endotel tabakası vasküler tonusu, vasküler permabiliteyi, vasküler büyüme ve yeniden yapılanmayı (remodelling) etkileyen parakrin ve otokrin faktörler salıvererek kardiyovasküler homeostazda önemli rol oynar. Bu nedenle endotel bütünlüğü en önemli faktördür (Vanhoutte 1988, Furchgott ve Vanhoutte 1989). Normal vasküler tonus endotelden salınan çeşitli vazodilatör ve vazokonstriktör mediyatörler arasındaki denge ile sağlanır. Burada vazodilatör etkili olan prostasiklin(PGI<sub>2</sub>), nitrik oksit(NO) (Billiar 1995) adenosin, hidrojen peroksid, endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF), v.b. ile vazokonstriktör etkili olan tromboksan A<sub>2</sub>, endotelin-1, anjiotensin II (Ang II), prostanlar ve PAF v.b. sayılabilir. Endotel kaynaklı en güçlü vazokonstriktör endotelin-1'dir. En güçlü ve önemli vazodilatör ise NO'dur (Epstein ve Levin 1995, Cines vd 1998, Ganong 1999).

RA'da arterlerde oluşan fonksiyonel ve yapısal değişikliklerle, endotel disfonksiyonuna ve inflamasyona bağlı olarak damar direnci artmaktadır (Wallberg-Jonsson vd 2008). RA'nın damar duvarında yaptığı bir takım değişiklikler arteryel genişleme ve sertliği değiştirmektedir. RA'lı hastaların abdominal aortalarında sertleşmede artış saptanmıştır (Turesson vd 2005). Sonuç olarak RA'lı hastalarda aortik sertleşmenin arttığı ve bunun sonucunda da kardiyovasküler mortalite ve morbiditenin arttığı görülmüştür (Stout 1987).



### 2.3.1. Nitrik oksit (NO)

NO molekül ağırlığı 30 kDa olan, lipofilik özellikte, yarılanma ömrü 6-30 s olup etkisi kısa süren ve hücre membranından kolaylıkla geçebilen gaz yapılı moleküldür. NO, endotel hücrelerde sitokrom p450 homoloğu olan ve Nitrik Oksit Sintaz (NOS) olarak bilinen, kalsiyum-kalmodulin bağımlı enzimler aracılığıyla L-argininden sentezlenmektedir. (Moncada ve Higgs 1993, Tousoulis vd 2012). Biyokimyasal olaylar sonucu kalsiyum kanalları açılarak, kalsiyum hücre içine girmekte ve kalmoduline bağlanarak oluşan kompleks NOS'a bağlanarak enzimi aktive etmektedir. Bu kompleks NOS'un yapısında bulunan flavoproteinlere, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'dan ve heme flavinlerden elektron transferini kolaylaştırmaktadır. Reaksiyon sonrasında L-argininden NO ve sitrülün sentezlenmekte olup, bu reaksiyonda oksijen ve NADPH ko-substrat, tetrahidrobiopterin (BH4) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) ile flavin mononükleotid (FMN) ise koenzim olarak rol oynamaktadırlar (Tousoulis vd 2012).

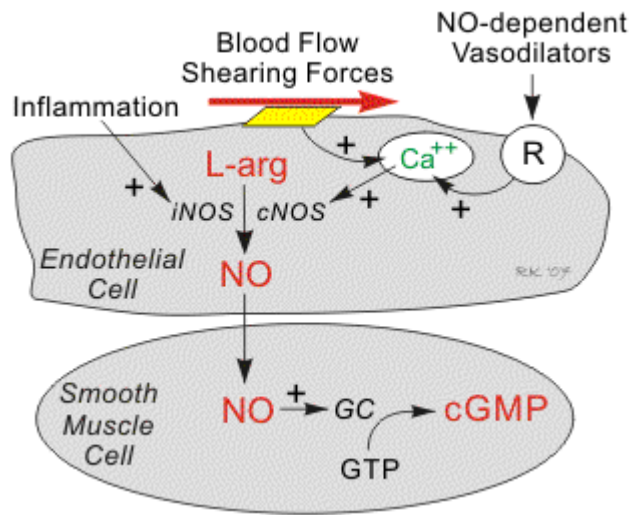
NOS enziminin hücrelerde yapısal olarak bazal düzeyde bulunan konstitüf NOS (cNOS: TipIII) ve biyokimyasal uyarılardan sonra aktive olan indüklenebilir NOS (iNOS; TipII) olmak üzere iki izotipi tanımlanmıştır. cNOS, vasküler endotel tarafından sürekli olarak fizyolojik düzeyde salgılanmakta ve kalsiyum–kalmodulin bağımlı olarak çalışmaktadır. cNOS'un eNOS ve nöronal NOS (nNOS: TipI ) olmak üzere iki izotipi bulunur.

Kan damarlarında normal, bazal koşullar altında NO sürekli cNOS tarafından üretilir. Aktivitesi kalsiyum–kalmodulin bağımlıdır ve depolanmış halde subsarkolemmada bulunan kalsiyumun açığa çıkması iki temel yolla olmaktadır. İlki vasküler endotelde kan akımının oluşturduğu sürtünme etkisine (shearing forces) bağlı, açığa çıkan kalsiyumun, cNOS'u aktive etmesi ve buna bağlı NO oluşumunun uyarılmasıdır. İkinci mekanizma ise endotel üzerinde bulunan ACh, bradikinin, P maddesi, adenosin ve diğer pek çok endojen ligandlara ait reseptörler üzerinden kalsiyum salınımının uyarılarak NO üretiminin sağlanmasıdır.

Normal, bazal koşullar altında iNOS aktivitesi çok düşüktür. cNOS'tan farklı olarak kalsiyum bağımlı değildir. iNOS aktivitesi inflamasyon sırasında, TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IFN- $\gamma$

gibi proinflamatuvar sitokinler ve bakteriyel endotoksinler tarafından indüklenir. İnflamasyon sırasında iNOS tarafından üretilen NO miktarı cNOS tarafından üretilen NO miktarından 1000 kat daha fazladır.(Fleming vd 1997, Web\_1 2008)

Nitrik oksit, sentezlendikten sonra damar düz kas hücresi içinde, guanil siklaz enzimini aktive eder. Bu enzim guanosin trifosfat (GTP)'ı defosforile ederek siklik guanosin monofosfat (cGMP) oluşmasına ve sonuçta düz kas gevşemesine neden olmaktadır (Şekil 2.3). cGMP,  $K^+$  kanallarını aktive ederek hiperpolarizasyona ve c-GMP bağlı protein kinazları aktive ederek myosin hafif zincir fosfatazların (MLCP) defosforilasyonuna neden olarak düz kas gevşemesini sağlar.

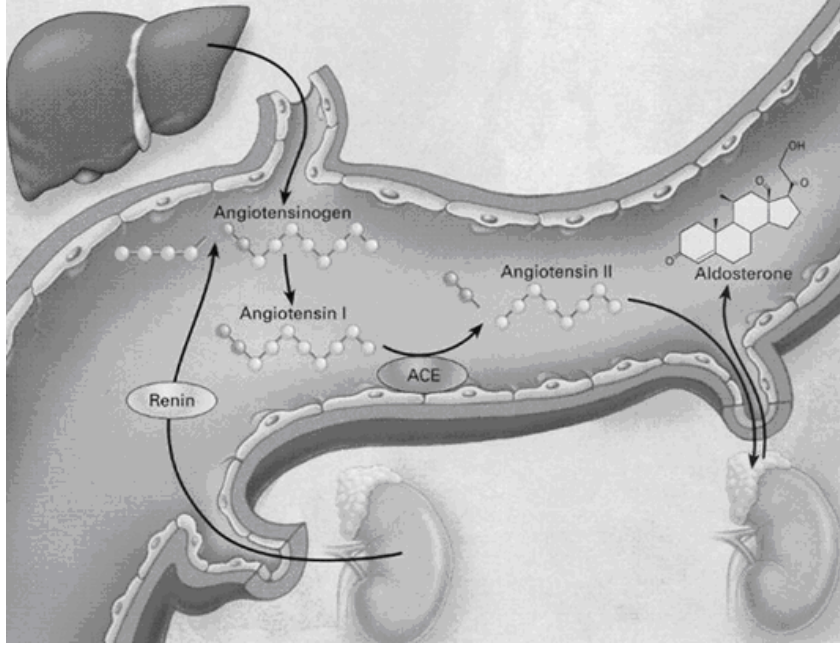


Şekil 2.3: Hücre içi NO sentezi (WEB\_1 2008)

NO'nun inflamasyonda önemli rolü bulunmaktadır. Vazodilatasyon, vasküler geçirgenlikteki değişim, ekstravazasyon, lökosit migrasyonu ve aktivasyonu gibi inflamasyon sırasında birbirini seyreden olaylar zincirinde görev alır (Coleman 2001). Özellikle RA gibi kronik inflamasyonlu hastalıklarda iNOS kaynaklı NO'nun rolü vardır (Suscheck vd 2004).

#### 2.4. Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS)

Anjiyotensinler vücudun tüm organ ve dokularında özellikle karaciğer, akciğer ve böbreğin katkılarıyla dolaşımda lokal olarak üretilirler. (Şekil 2.4)

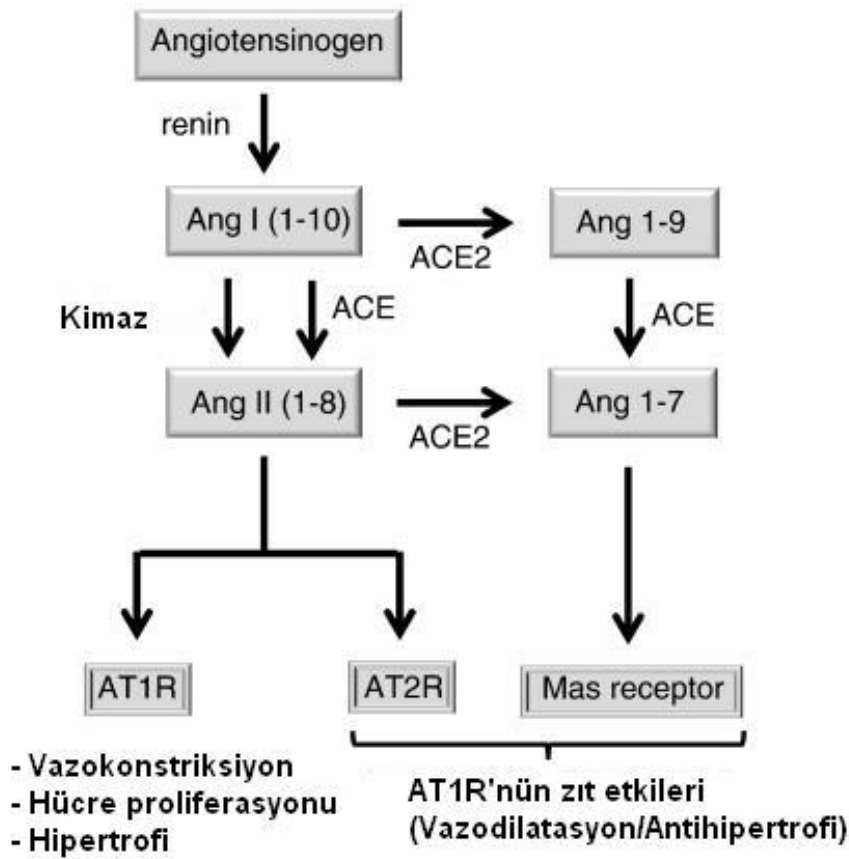


**Şekil 2.4:** Renin anjiotensin sistemi (Marcy ve Ripley 2006)

Böbrekte jukstaglomerüler hücrelerde üretilen renin, ajiotensinojeni, anjiotensin-1 (Ang I)'e, Ang I'de Angiotensin Converting Enzyme (ACE) ile RAS'ın en önemli metabolitlerinden Ang II'ye dönüşür (Schmieder 2005).

RAS, kardiyovasküler, renal ve adrenal fonksiyonların kontrolünde esas olarak Ang II üzerinden önemli bir role sahiptir. RAS'ın inflamatuvar hastalıklarda da artan şekilde katkısının olduğuna dair veriler söz konusudur (Ruiz-Ortega vd 2001). RAS, damar düz kas hücre migrasyonu, çoğalması ve ekstraselüler matriks üretiminin uyarılması, inflamatuvar hücrelerin migrasyonunu arttıran inflamatuvar kimokinler ile sitokinlerin üretimlerinin uyarılması gibi çoklu mekanizmalar ile damar hastalıkları oluşturur (Brunton vd 2009). RA'lı hastaların sinoviyal örneklerinde RAS komponentlerinin bulunduğu ve bunların inflamasyon durumlarında upregüle olduğu bildirilmiştir (Gomez vd 1993, Walsh vd 1994, Owen ve Campbell 1998) Birçok çalışmada Ang II'nin lökosit migrasyonunu, kemokin üretimini, transkripsiyon faktörü NF-Kb'nin aktivitesini indüklediği gösterilmiştir. Buna bağlı özellikle RA gibi inflamasyonlu hastalıklarda Ang II'nin bloke edilmesinin faydalı olabileceği düşünülmüştür (Firestein 2004). Bu nedenle inflamatuvar hastalıklarla RAS arasındaki ilişki son derece önemlidir (Brunton vd 2009, Chappell 2010, Da Silveira vd 2010).

RAS'ın metabolitleri arasında Ang II yanında Ang III, Ang IV ve Ang 1-7 gibi önemli aktif metabolitlerde bulunmaktadır (Ferrario ve Chappell 2004, Santos vd 2008).



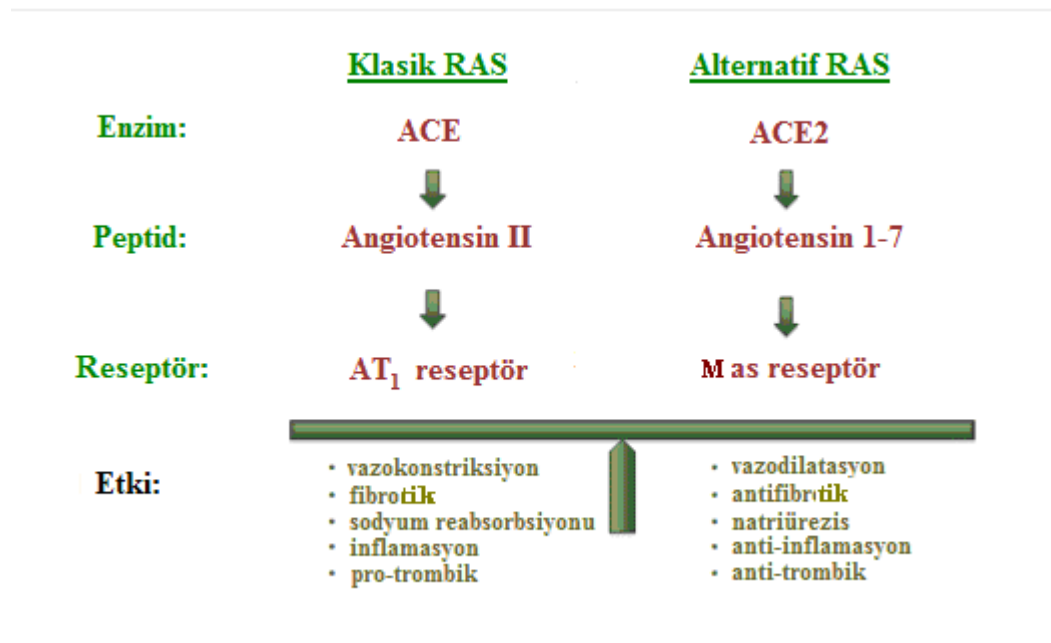
Şekil 2.5: RAS ürünleri ve sentezi (Mori vd 2013)

#### 2.4.1. Ang 1-7

Ang 1-7, RAS'ın ana ürünlerinden biri olup (Santos vd 2008) temel olarak ACE ile ilişkili karboksipeptidaz (ACE 2) aracılığı ile oluşur ve etkisini G protein kenetli MasR ile gösterir (El-Hashim vd 2012). Ang 1-7'nin oluşumu farklı yollarla olur. Ang I çeşitli endopeptidazlar tarafından Ang 1-7'ye metabolize edilir. Ang II'de karboksipeptidazlar (ACE2 gibi) tarafından yine Ang 1-7'ye dönüştürülür. ACE'nin, Ang 1-7'nin plazmadan temizlenmesinde katkısı vardır (Brunton vd 2009). (Şekil 2.5)

Ang 1-7'nin farmakolojik profili Ang II'ye ters yöndedir. Ang II vasokonstriksiyona, aldosteron salgılanmasına neden olur (Brunton vd 2009, El-Hashim

vd 2012). Ang 1-7 vasopressin salgılatır, prostoglandin biyosentezini uyarır, bazı damarlarda vazodilatasyon yapar, natriüretik etkilidir. Damar düz kası hücrelerinin çoğalmasını baskılar. Ayrıca Ang 1-7'nin damar düzeyinde antiinflamatuvar etkileri olduğu düşünülmektedir (Santos ve Ferreira 2007, Chappell 2010, Moon 2011, El-Hashim vd 2012 ). (Şekil 2.6)



**Şekil 2.6:** Klasik RAS ile alternatif RAS karşılaştırılması (WEB\_2 2013)

MAS protoonkogeni, ilk olarak in vivo tümör çalışmalarında tümörjenik aktivitesi sonucu tanımlanmış (Young vd 1986), memelilerde testis, ön beyin, amigdala, hipokampus ve saptanabilen düzeylerde yine kalp ve böbrekte eksprese edilmiştir (Alenina vd 2002).

ACE 2 – Ang 1-7 – MasR eksenini ile ACE – Ang II – AT<sub>1</sub> reseptör eksenini birbirlerine karşı olan reseptör hareketleri olarak tanımlanır. Bu durum Ang 1-7'nin etkilerinin Ang II'ye karşıt olmasından ileri gelmektedir.

Mas agonisti olan Ang 1-7'nin antijenle indüklenen artrit ve FCA artritinde belirgin antiinflamatuvar etkilerinin olduğu hatta genetik olarak MasR'ü silinen farelerde artritinin bazı bulgularının daha da arttığı gösterilmiştir (Da Silveira vd 2010). Son zamanlarda MasR'lerinin, AT<sub>1</sub> reseptörü ile heterooligomerize olabileceği ve Ang II'nin etkinliğini önleyebileceği bu nedenle AT<sub>1</sub> reseptörünün fizyolojik antagonisti olabileceği

bildirilmektedir (Kostenis vd 2005). Ang 1-7'nin vazodilatör etkisinin endotele bağlı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ang 1-7'nin vazodilatör etkisinde vazodilatör prostaglandin stimülasyonu, artan nitrik oksit üretimi, spesifik reseptörlerin stimülasyonu veya bradikininin vazorelaksan etkisinin güçlendirilmesi yer alabilir (Lemos vd 2005).

## 2.5. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE)

AGE'ler, proteinler, lipoproteinler ve nükleik asitlerde bulunan azotlu grupların, indirgeyici şekerlerin karbonil grupları ile non-enzimatik glikasyonu sonucu oluşan heterojen bileşiklerdir (Peyroux ve Sternberg 2006). Protein glikasyonu, şekerin karbonil grubu ile proteinin serbest amino grubunun Schiff bazı oluşturmasıyla başlamaktadır. Schiff bazı oluşumu saatler içerisinde gerçekleşmekte ve sonrasında günler içerisinde amadori ürünlerine dönüşmektedir. Amadori ürünleri ise daha sonra dikarbonil bileşiklerine ve sonrasında da haftalar içerisinde AGE'lere dönüşmektedir. Amadori ürünlerinin oluşumuna kadar olan bölüm geri dönüşümlü iken, daha sonraki evreler ise geri dönüşümsüz ve stabildir (Dinçer vd 2002).

AGE oluşumunda etkili faktörler; proteinlerin yapım yıkım hızı, hiperglisemi derecesi ve çevresel oksidan stresin miktarı ile yaygınlığıdır (Goldin vd 2006). AGE oluşumu genellikle uzun ömürlü proteinleri etkiler. Proteinlerdeki lizin, histidin, arginin amino asitleri glikasyona daha hassastır (Singh vd 2001).

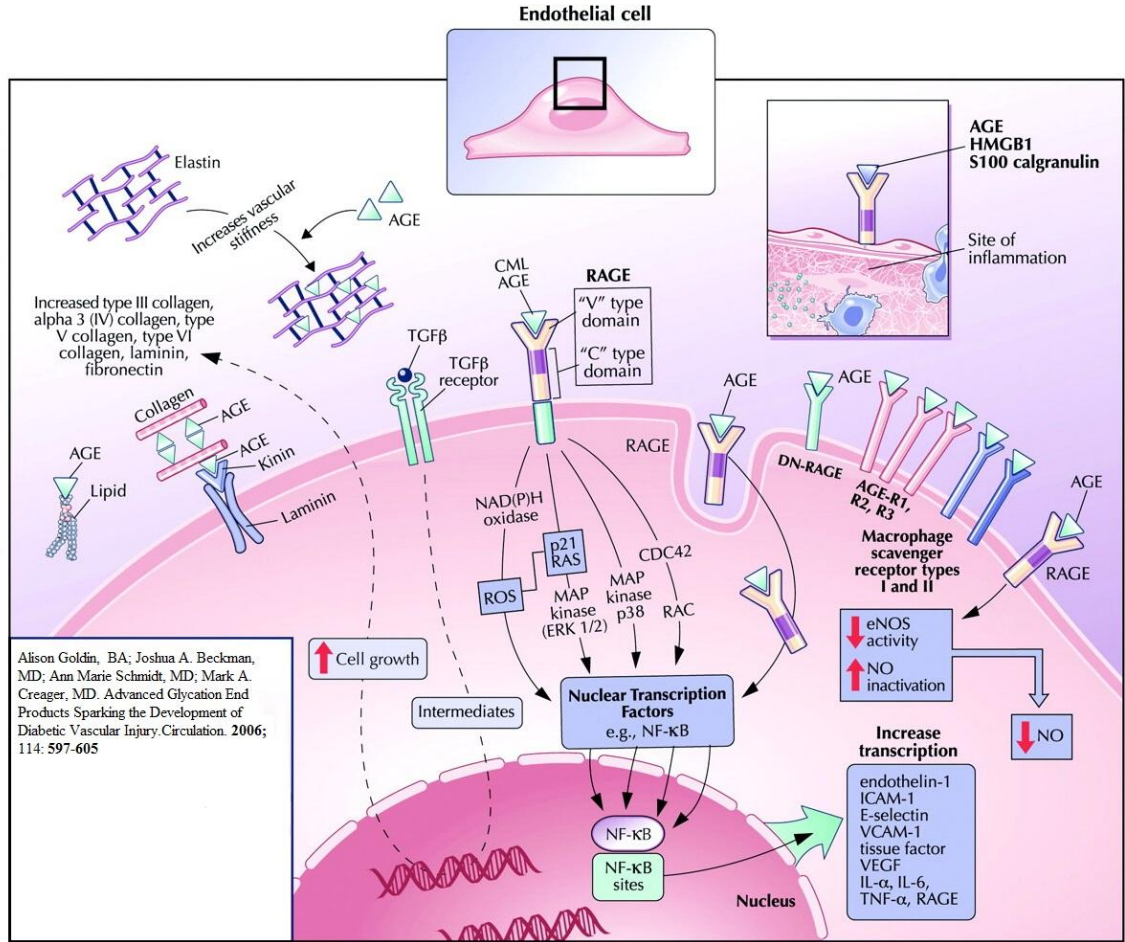
AGE'ler, mikrovasküler diyabetik hastalıkların yanı sıra özellikle bağ dokusu hastalıklarından RA'da, nörolojik hastalıklardan Alzheimer hastalığında ve son dönem böbrek yetmezliğinde patogeneizde yer almaktadır. Histopatolojik çalışmalar sonrası AGE'lerin değişik doku tiplerinde özellikle RA'da kıkırdak dokuda yanı sıra koroner plaklarda, kalp kasında vs yer aldığını göstermiştir. Bağ dokusu matriksinin yapısal bileşenlerinden örneğin kollajen, AGE'lerin primer hedeflerinden biridir (Singh vd 2001, Goldin vd 2006). AGE'ler etkilerini reseptör bağımsız yol ile ekstrasellüler matriksin yapısındaki proteinler arasında çapraz bağlar oluşturarak matriks yapısını ve fonksiyonlarını bozarak ya da reseptörleri üzerinden bağlanma sonucu hücre içi sinyal

yolaklarını aktive ederek çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ve sitokinlerin salınımına yol açarak gösterirler (Goldin vd 2006).

AGE'ler, endotelin-1 aracılığıyla vazokonstrüksiyona bağlı endotel hasarına yol açabildiği gibi, özellikle ileri yaşlarda ortaya çıkan patolojilerde, glikasyon fenomeni sorumlu tutulmakta ve AGE'ler 50 kat fazla serbest radikal üretimine neden olmaktadır (Bucciarelli vd 2006). Çalışmalar; AGE'lerin, reseptör aracılı mekanizma ile serbest radikal üretimini uyarmasının yanı sıra, artmış serbest radikallerinin de hücre içi AGE oluşumunu arttırdığını göstermektedir (Giardino vd 1996). Yine AGE'lerin toksik etkileri arasında; proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilmeleri, kendi reseptörleri ile oksidatif stresi indükleyebilmeleri ve sonuçta NF-kB gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive etmeleri, ayrıca çeşitli adezyon moleküllerine ait genlerin (endotelin, VCAM-1 gibi), inflamatuvar sitokinlerin özellikle TNF- $\alpha$ , IL-1'in, Ang II ve transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) ekspresyonlarının artışı sağlamaları gibi etkiler sayılabilir (Bierhaus vd 1997, Eidland vd 2001, Lapolla vd 2005, Yao vd 2007). Yapılan çalışmalarda AGE'nin, protein kinaz-C'yi aktive ettiği ve aktive olan protein kinaz-C'nin, vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonların patogeneğinde rol aldığı düşünülmektedir (Way vd 2001).

AGE'ler bağlandıkları reseptörlere göre;

1. RAGE (receptor for advanced glycation endproducts)
2. Çöpçü reseptörler (Class A, CD36, class B tip1, LOX- 1, FEEL-1, FEEL-2),
3. AGE-R1 (oligosakkaril transferaz- 48), AGE-R2, AGE-R3 (Galektin-3) 'dir.



**Şekil 2.7:** AGE ve RAGE endotel hücre içi sinyalizasyon yolları (Goldin vd 2006)

### 2.5.1. RAGE

RAGE, immünglobülin süper ailesinden olan ve hiperglisemik durumlarda biriken AGE'ler için en spesifik reseptör olup en çok incelenendir (Goldin vd 2006). RAGE inflamatuvar yanıt ile bağlantılı farklı ligand aileleri ile etkileşime girer. RAGE; vasküler endotel, akciğer, karaciğer, monositler, dentritik hücreler, nöronlar gibi çok farklı doku ve hücre tiplerinde eksprese edilir (Nessar 2005).

RAGE'nin hücre dışı kısmı V tipi bölge ve C tipi bölge olmak üzere 2 bölgeden oluşur. V tipi bölge, ligand bağlanmasından sorumlu iken C tipi bölge, V tipi bölgenin stabilitesini sağlar. Bu kısmı takip eden transmembran bölge ise reseptörün membrana yerleşmesini sağlar. Transmembran bölgenin ucunda ise küçük bir intrasitoplazmik

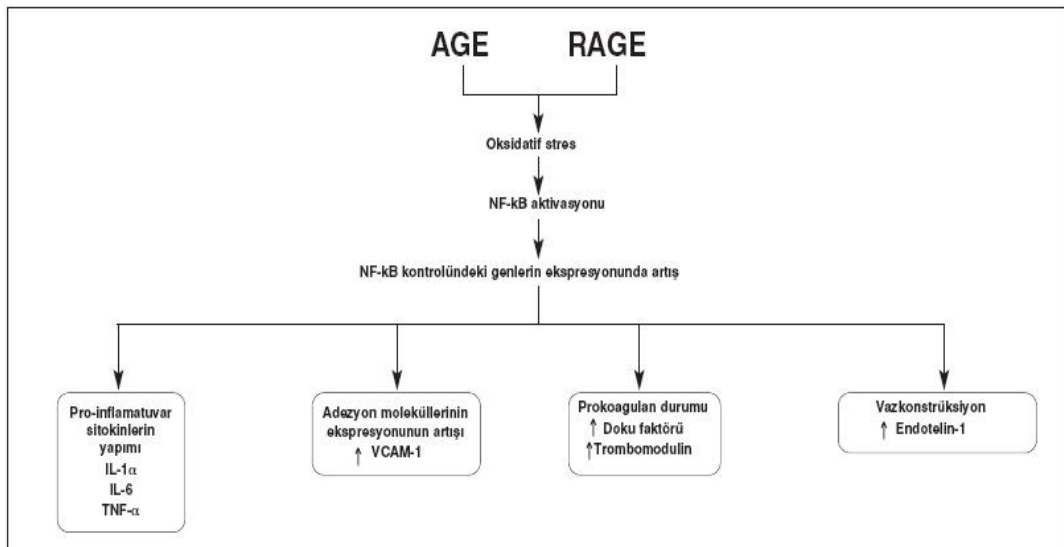


kuyruk hücre içi sinyalizasyonu sağlayan kısımdır (Schmidt vd 2001). 3 farklı RAGE izoformu mevcuttur. Bunlar;

1. Solubl RAGE (sRAGE)
2. Dominant negatif RAGE (DN-RAGE)
3. Full-length RAGE olarak adlandırılırlar.

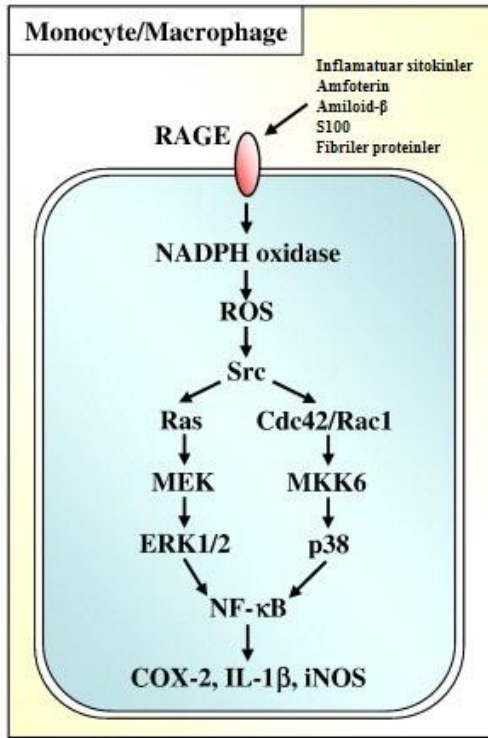
Bu 3 tip RAGE izoformu arasındaki temel fark; full-length RAGE dışındakilerde intrasitoplazmik kuyruğun olmamasıdır. Bu nedenle hücre içi sinyalizasyonu sadece full-length RAGE yapabilir. Bu özellik DN-RAGE ve sRAGE'nin, AGE etkilerini baskılayıcı tarzda etki yapmasına neden olmaktadır (Ding ve Keller 2005).

RAGE, NF-kB yolunu kullanarak gen ekspresyonunda yaptığı patolojik değişikliklerle organ hasarı oluşturabilmektedir (Goldin vd 2006). Özellikle endotel hücrelerde AGE'nin RAGE ile etkileşimi ile endotelial disfonksiyon gelişir. Endotelden salgılanan iki önemli gevşetici; nitrik oksid ve PGI<sub>2</sub>, AGE'lerin etkilediği moleküllerdir. NO damar tonusunun kontrolü için anahtar bir moleküldür (Armando ve Miguel 2004). AGE'ler bu iki vazodilatörün seviyelerini düşürürken endotel hücrelerde sentezlenen potent kasıcı ajan endotelin-1 üretimini ise NF-kB aktivasyonu ile arttırmaktadır. Bu arada, yeni damar oluşumunda önemli rol alan endotel hücre migrasyonu, AGE etkisi ile indüklenmektedir (Goldin vd 2006). (Şekil 2.8)



**Şekil 2.8:** AGE, RAGE etkileşimi (Parmaksız 2011)

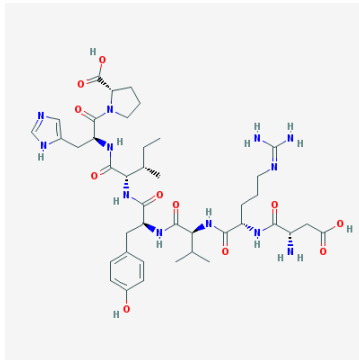
AGE'ler dışında inflamatuvar sitokinler, amfoterin, amiloid- $\beta$ , S100 ve diğer fibriler proteinler RAGE'ler için endojen ligandır. Bu ligandlar ile RAGE aracılığı ile transdüklenen sinyaller inflamasyona neden olur (Lin vd 2009). (Şekil 2.9)



Şekil 2.9: RAGE aktivasyonu sonrası hücre içi sinyalizasyon yolağı (Donato vd 2009)

## 2.6. Kimyasal Maddeler

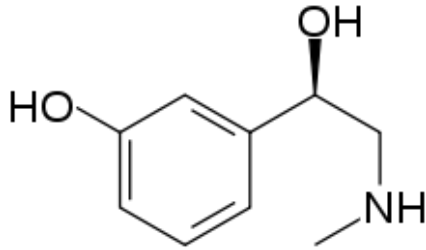
### 2.6.1. Ang 1-7





Endotel hücresi, inflamasyon gibi çeşitli patolojik durumlarda hasar görürse vazodilatör yanıt ortadan kalkar. Bu olayda temel olarak endotel kaynaklı vazodilatör maddelerin salınmaması rol oynar (Brunton vd 2009).

### 2.6.3. Fenilefrin (Phe)



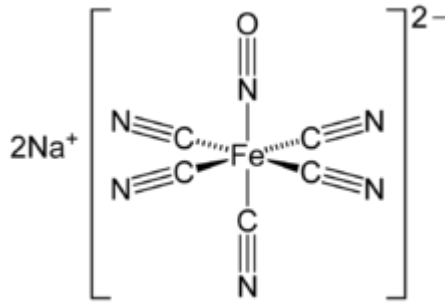
Phe, selektif  $\alpha_1$  reseptörlerine direkt, güçlü bir şekilde etki eder. Başta damarlarda vazokonstriksiyon olmak üzere diğer efektör yapıların normal fizyolojik fonksiyonlarına uygun sempatik cevapları meydana getirirler. Vazokonstriktör etkisi nedeniyle toplam periferik direnci belirgin şekilde arttırarak kan basıncını yükseltirler (Kayaalp 2012).

Phe,  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılı kasılmaya neden olup, sitozolik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonlarını membran depolarizasyonu sonucu direkt ya da indirekt olarak reseptör ya da voltaj aracılı  $Ca^{+2}$  kanalları açarak, fosfolipaz C aktivasyonu sonucu myosin hafif zincir kinaz aktive ederek ya da inositol-3 fosfat (IP3) üretimi ile birlikte IP3 ile indüklenen endoplazmik retikulumdan  $Ca^{+2}$  açığa çıkışını sağlayarak gerçekleştirebilir (Bölükbaşı Hatip vd 2009).

Phe  $\alpha_1$  reseptörler aktive edildiğinde, heterotrimerik G proteinlerinden  $G_{\alpha q}$  proteinleri aracılığı ile fosfolipaz C enzimi aktive olur. Bunun sonucunda, fosfolipaz C'nin aktivasyonu ile IP3 ve diaçilgliserol (DAG) düzeyleri artar. IP3 sarkoplazmik retikulumdan  $Ca^{+2}$  salınımını arttırarak hücre içi  $Ca^{+2}$  seviyelerinin artışına neden olur. Buna bağlı olarak  $Ca^{+2}$ -kalmomodulin kompleksi oluşur.  $Ca^{+2}$ -kalmomodulin kompleksi miyozin hafif zincir kinazı aktive ederek miyozin hafif zincirini fosforile eder. Sonuçta, düz kas kontraksiyonu gerçekleşir. Bu kontraksiyon miyozin hafif zincirinin miyozin fosfataz tarafından defosforilasyonu ile sona erdirilir (Mukai vd 2001). DAG ise protein kinaz C'yi aktive ederek iyon kanalları, pompaları vd gibi çeşitli membran proteinlerini

fosforiller.  $\alpha 1$  adrenerjik stimölasyon fosfolipaz A2 stimölasyonuna da neden olarak araşidonik asit metabolizmasında COX ve lipooksijenaz yollakları aracılığı ile biyoaktif PG ve lökotrienlerin salınımına neden olur.

#### 2.6.4. Sodyum Nitroprusid (NaNP)



NaNP direkt etkili bir düz kas gevşeticidir. Dokuda katalizlenen bir indirgenme reaksiyonu ile NO açığa çıkarır. Oluşan NO vasküler düz kasta solubl guanilat siklazı aktive ederek hücre içi cGMP artışına neden olur. cGMP daha sonra cGMP bağımlı protein kinazı aktive eder, sonuçta vazodilatasyon ortaya çıkar (Parker ve Adams 1993).

Damar düz kasları üzerinden etki ederek hem arteriollerini hem de venülleri genişletip kan basıncında belirgin düşme yapar. Vazodilatör etkisinde birçok mekanizma rol oynar. Potasyum kanallarını açmak suretiyle ve ayrıca membranda elektrojenik sodyum pompasını aktive etmek suretiyle düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon yapar. Reseptörle çalıştırılan kalsiyum kanallarından Ca<sup>+2</sup> girişini inhibe eder (Kayaalp 2012).

#### 2.6.5. Potasyum Klorür (KCl)

Damar düz kasının depolarizasyonu ile oluşan kontraktıl yanıtı, sarkolemma membranı üzerinde uzanan voltaj-bağımlı Ca<sup>+2</sup> kanallarının açılmasına bağlıdır. Kanal açılması ile hücre içine Ca<sup>+2</sup> girişi olur, bu da kontraktıl proteinleri aktive eder (Parker ve Adams 1993). Kalsiyum girişi, IP<sub>3</sub>'e duyarlı olmayan bir mekanizma ile sarkoplazmik retikulumdan hücre içi kalsiyumun salıverilmesini tetikler (kalsiyum ile indüklenen kalsiyum salıverilmesi) (Berridge ve Irvine 1989).

KCl aracılı kasılmanın başlıca voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanalları aracılığı ile olduğu düşünülmektedir (Marwan 2000).

## 2.7. Sıçan Adjuvan Artriti

Sıçan adjuvan artrit modeli; RA'da hastalığın immünolojik açıdan incelenmesi, antiinflamatuvar ilaçların geliştirilmesi ve test edilmesi için kullanılan kronik, tekrarlayan T hücre bağımlı en sık kullanılan artrit modelidir (Willem vd 2001).

FCA ile indüklenerek oluşturulan artrit modeli insanlarda görülen RA'ya birçok yönü ile benzer (Sokoloff 1984).

FCA; 0,1ml mineral yağ içinde Mycobacterium tuberculosis içermektedir. Bu madde sıçanlarda ciddi artrit oluşturur. Tek doz olarak, kuyruğun gövdeye birleştiği bölgenin sırt kısmından ya da sağ arka palmar yüzünden intradermal olarak yapılabilir. Pençeye yapılan enjeksiyonla akut inflamatuvar reaksiyon başlar ve immünolojik tepki olarak 9. günden itibaren karşı pençe ve çeşitli organlara yayılır. Artrit parametrelerine 15. güne kadar ya da istenilen süreye bağlı daha uzun bakılabilir.

Bu modelin sık kullanılma nedenleri;

1. Sağlam, kolay ve güvenilir olması,
2. Hastalığın başlangıç ve devam eden döneminde artrit parametrelerinin göreceli olarak kolay, iyi ölçülebilir olması,
3. Poliartiküler inflamasyona bağlı kemik rezorbsiyonlarının belirgin şekilde görülebilmesi sayılabilir (Bendele 2001).

Biz de çalışmamızda adjuvan artrit modelinin avantajlarını düşünerek bu modeli kullanmayı tercih ettik.

### **3. MATERYAL VE METOT**

Çalışmamız, Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu 31.01.2012 tarih ve 009 sayılı onayı alınarak, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Biriminden alınan toplam 30 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan üzerinde, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı.

Öncelikle projemizde yer alan 30 adet sıçan 5'erli gruplar halinde plexiglas kafeslere alındı.  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  ısıda ve  $60\pm 5\%$  nem oranında 12 saat karanlık/aydınlık olacak şekilde tutulmasına dikkat edildi.

#### **3.1. Adjuvan Artrit İndüksiyonu**

Adjuvan artrit oluşturmak için en etkin uygulama yolu, sıçanların sağ arka pençe palmar yüzeylerine, intradermal FCA verilmesidir (Bendele 2001). Bu çalışmada kullanılan FCA 0,1ml mineral yağ içinde Mycobacterium tuberculosis içermektedir. Artrit oluşturulan gruplarımızdaki sıçanlara, sağ arka pençeden tek doz olarak 0,1 ml FCA uygulandı.

#### **3.2. Artrit Bulgularının Değerlendirilmesi**

Her gruba ait sıçanlara, çalışma başlamadan önce, 1 hafta düzenli olarak tail cuff yöntemi ile sistolik kan basınçlarına bakılması için alıştırma dönemi yapıldı. 30'ar dk kabinde bekletildi. Böylelikle sıçanlar ortama alıştırıldı. Alıştırma süresinden sonra sistolik kan basınçlarına bakıldı.

Artrit bulguları her grup için 1., 3., 7., 10. ve 15. günlerde değerlendirildi. Değerlendirme de kilo kaybı; pençede kızarıklık, pençede şişlik, kuyrukta nodül, ekstremitelerde defomite varlığı değerlendirildi.

Artrit bulguları ve kullanılan gereçler;

1. Kilo kaybı kontrolü için; Sıçan terazisi
2. Pençe ödemi kontrolü (Resim 3.1) için; Vernier caliper
3. Sistolik kan basınçları ölçümü için; Tail - cuff yöntemi ile Biopac tansiyon ölçme cihazı



**Resim 3.1:** Pençe ödemi

### 3.3. Deney protokolü

Sıçanların proje için istenilen ağırlıklara ve gelişime ulaşmaları ile birlikte 30 adet sıçan, her grupta 10 sıçan olacak şekilde 3 çalışma grubuna ayrıldı.

3 gruba ayrılan deney hayvanlarına kuyruktan numaralama yapıldı.

1. Kontrol grubu: 1. günde 0,1 ml mineral yağ intradermal sağ arka pençeye uygulandı. 1., 3., 7., 10. ve 15. günlerde artrit bulguları değerlendirildi.
2. Artrit grubu: 1. günde 0,1 ml FCA intradermal sağ arka pençeye uygulandı. 1., 3., 7., 10. ve 15. günlerde artrit bulguları değerlendirildi.



3. Artrit + intraperitoneal Ang 1-7 verilen grup: 1. günde 0,1 ml intradermal sağ arka pençeye FCA uygulandı. Bu gruptaki sıçanlara 7. günden itibaren 8 gün süreyle 3mg/kg olacak şekilde intraperitoneal Ang 1-7 uygulandı. Diğer gruplardaki gibi artrit bulguları değerlendirildi.

Tüm hayvanlara 15. günlerinde ketamin ve xylazin anestezisi altında ötanazi yapıldı. Her gün bir hayvana ötanazi yapıldı. Anestezi altındaki sıçanların göğüs boşluğu sternum, her iki yanından açıldı. sRAGE, TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  analizi için hızlıca kan ve doku örnekleri alındı. Öncelikle sıçandan, enjektörle kan alınarak (Resim 3.2) tüpe konuldu. Ardından 3 dk. 5000 rpm'de santrifüj edilerek serumu ayrıldı. Ayrılan serum, ependorf tüplere konularak, TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  seviyelerine uygun ELISA kitler ile bakılması için -80<sup>0</sup>C de saklandı. Daha sonra hemen torasik aortaya ulaşıldı (Resim 3.3). İzole aort preparatları hızlıca organ banyosuna asıldı. Ayrıca, RAGE ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi için aortadan 2mm'lik bir parça alınarak, formol konulmuş ependorfa ayrıldı. 1 gün bekletilen bu parça, ertesi gün parafin blok yapılması için Patoloji Anabilim Dalı'na götürüldü.



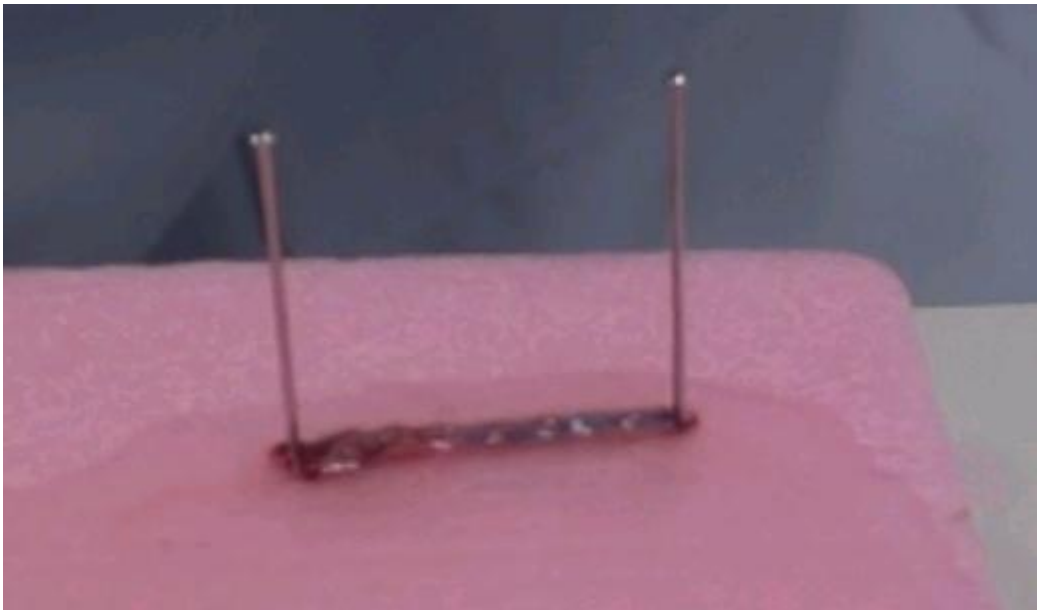
**Resim 3.2:** Kan alma



**Resim 3.3:** Aort çıkarma

### **3.4. Organ banyosu çalışması**

Her sıçana anestezi altında 15. günde işlem yapıldı. Göğüs boşluğu sternum her iki yanından açılarak torasik aortaya ulaşıldı. Aorta, arkus aortanın altından kesilerek dikkatle çıkarıldı (Resim 3.4). Çevre yağ ve bağ dokusu temizlendikten sonra 1-2 mm uzunluğunda 2 adet endotelli, 2 adet endotelsiz preparat hazırlanarak izole organ banyosuna asıldı. Endotel hasarı, intimal yüzeye forseple dikkatlice sürterek yapıldı.



**Resim 3.4:** İzole aort preparatı

Hazırladığımız aort preparatları, 20 ml'lik Krebs-Henseleit solüsyonu içeren izole organ banyolarına ayrı ayrı ve paralel olacak şekilde endotelli ve endotelsiz olarak asıldı. Her sıçan için iki endotelli ve iki endotelsiz olmak üzere toplam 4 preparat asılarak çalışmaya başlandı.

Her aort halkasının içerisinden paslanmaz çelik klips geçirilerek, klipslerden biri organ banyosunun altına diğeri izometrik ölçümleri için transdüserlere bağlandı. MP150 - 8 kanallı veri elde etme sistemi kullanılarak ölçümler bilgisayara görüntülü kaydedildi.

Krebs-Henseleit solüsyonu (mM):

1. 25 mM NaHCO<sub>3</sub>
2. 1,22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
3. 118,3 mM NaCl
4. 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>
5. 4,7 mM KCl
6. 11,1 mM Glukoz içermektedir.

Hazırlanan Krebs-Henseleit solüsyonunun pH'sı 7,4'e ayarlanıp, organ banyosu ısısı, May WBC 3044-PR heating circulator ile 37°C de tutuldu. Krebs-Henseleit solüsyonu %95 oksijen ve %5 karbondioksit karışımı (karbogen) ile devamlı gazlandırıldı. Banyolara asılan damarlara ilk olarak 1000mg daha sonra ise 1500mg ve 2000mg gerim verildi. Banyolar 20 dakikada bir yıkanarak izole aort preparatları bazal gerilimini bulmaları için 1 saat dinlendirildikten sonra çalışmaya başlandı. İzometrik gerilim değişiklikleri FDT10-A transducer aracılığı ile MP35 programı yardımı ile kaydedildi.

20 ml'lik izole organ banyolarına kasılma yanıtları için, öncelikle tek doz 60mM KCl verilerek maksimal kasılma alındı. Daha sonra artan konsantrasyonlarda ( $1.10^{-9}$ - $3.10^{-5}$  M) phe verilerek kümülatif konsantrasyon yanıt eğrileri elde edildi. Bu konsantrasyon yanıt eğrilerinde phe için submaksimal doz hesaplandı. Gevşeme yanıtları ise, submaksimal phe kasılarak ortama kümülatif olarak artan dozlarda ACh ( $1.10^{-8}$ - $3.10^{-5}$  M) ve NaNP ( $1.10^{-8}$ - $3.10^{-5}$  M) verilerek değerlendirildi. Gevşeme

yanıtları, submaksimal phe kasılmasından sonra elde edilen % değişiklik olarak hesaplandı.

### 3.5. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ve sRAGE Elisa Çalışmaları

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve sRAGE düzeyleri üretici protokolüne uygun ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. -80  $^{\circ}$ C'de işlemin yapılmasına kadar saklanan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve sRAGE için alınan kan örnekleri çıkarıldı.

Kit ile beraber gelen plate'in kuyucukları, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve sRAGE'ye ait spesifik antikorlarla kaplıydı. Kuyucuklara öncelikle standartlar ve gruplarımıza ait serum örnekleri protokele uygun şekilde dilüe edilerek pipetlendi. İlk olarak inkübasyon süresince, antikor-antijen kompleksinin oluşması için belirtilen süre kadar bekletildi. Hazırladığımız yıkama solüsyonu ile protokole uygun yıkama işlemi yapılarak antijen-antikor kompleksleri dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra biotinli antikor eklenip, ikinci inkübasyon süresi beklendi. Tekrar yıkama işlemi uygulandıktan sonra streptavidin-peroksidaz (substratın renk değişimini katalizleyen enzim) eklendi. Son yıkama işleminden sonra bütün bağlanmayan enzimler uzaklaştırıldı. Enzimin renkli substratı eklenerek, kuyucukların örneklerdeki konsantrasyona bağlı olarak renklenmesi sağlandı. Reaksiyon, stop solüsyonunun eklenmesiyle durduruldu. Sonuçlar belirtilen dalga boylarında elisa pleyt okuyucuda okundu.

### 3.6. İstatiksel Analiz

Çalışmada verilerin değerlendirilmesi için, SPSS 16,0 programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama, standart hata olarak hesaplanarak grafiklere aktarıldı. Kilo, kan basıncı ve pençe ödemi değerleri One Way ANOVA ve çoğul karşılaştırma kullanılarak ayrıca post hoc test ile değerlendirildi. Kontraktıl yanıtlar, maksimal kontraksiyonun yüzdesi olarak tanımlandı. Gevşeme yanıtları, phe kontraksiyonundan sonra elde edilen % değişiklik olarak hesaplandı. Konsantrasyon-yanıt eğrileri tekrarlayan veriler için, unpaired t-test kullanılarak hesaplandı.  $p < 0,05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

### 3.7. İlaçlar

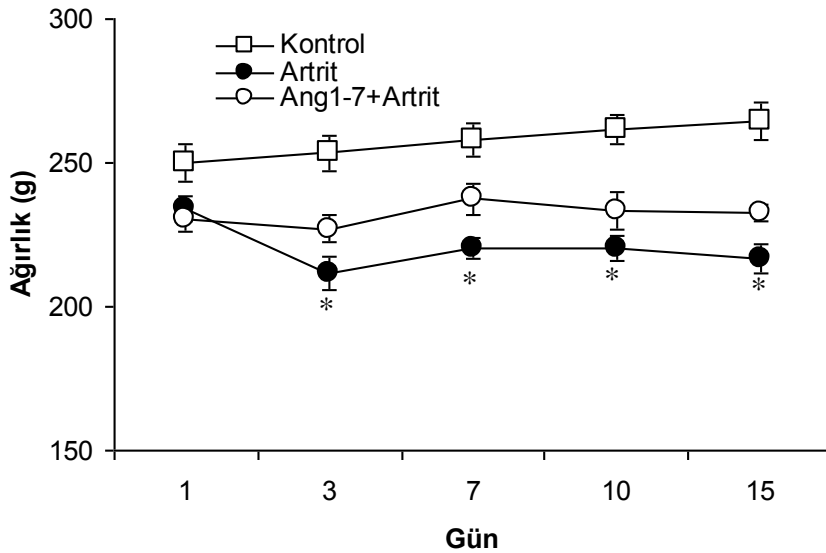
Phe hidroklorid (Sigma P6126), asetilkolin hidroklorid (Sigma A6625-256), potasyum klorid (Sigma 12636), sodyum nitroprusid ve Ang 1-7 (Sigma A9202) Sigma Chemicals Co (U.S.A) firmasından sağlandı. İlaçların stok solusyonları distile suda çözüldürülerek hazırlanmıştır. Ang 1-7, 5mg'ı 1,7 ml distile suda çözüldürülerek elde edildi. Ang 1-7, her intraperitonel uygulamadan önce taze olarak hazırlanmıştır. İlaç konsantrasyonları izole organ banyosu solusyonları içindeki final molar konsantrasyon olarak tanımlandı. Hesaplanan ilaç ağırlıkları saf ilaç ağırlığı olarak hesaplandı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Adjuvan Artritli Sıçanlarda Ağırlık, Kan Basıncı ve Peççe Ödemi Ölçümü

#### 4.1.1. Ağırlık

Artritli sıçanlarda 3. günden itibaren kilo kaybı anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 4.1).



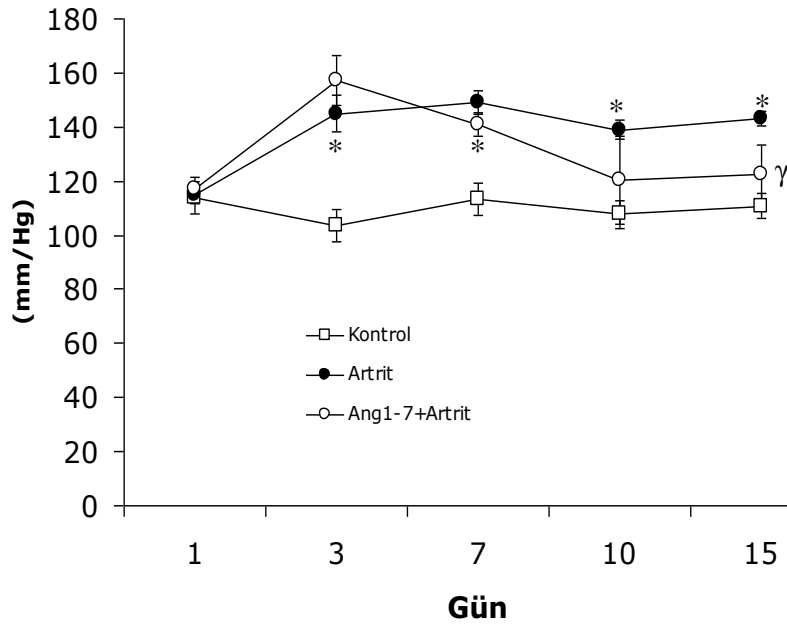
**Şekil 4.1:** Artritli sıçanlarda ağırlık değişikliği ve Ang 1-7'nin etkisi. \*  $p < 0,01$  Artrit vs Kontrol

Ang 1-7 verilen grupta ise 7. günden sonra sıçan ağırlığında bir artış gözlenirse de bu artış artritli gruba göre anlamlı bulunmadı.

Kontrol grubu ağırlık başlangıç ve 15. gün değişim oranı +%5,6 iken, bu oran artritli grupta -%7,65, artrit + Ang 1-7 alan grupta ise +%0,87'dir.

#### 4.1.2. Kan basıncı

Artritli sıçanlarda kan basıncı 3. günden itibaren yükselmeye başlamıştır ve bu yükseliş 15. güne kadar gözlenmiştir ve anlamlı bulunmuştur. (Şekil 4.2)

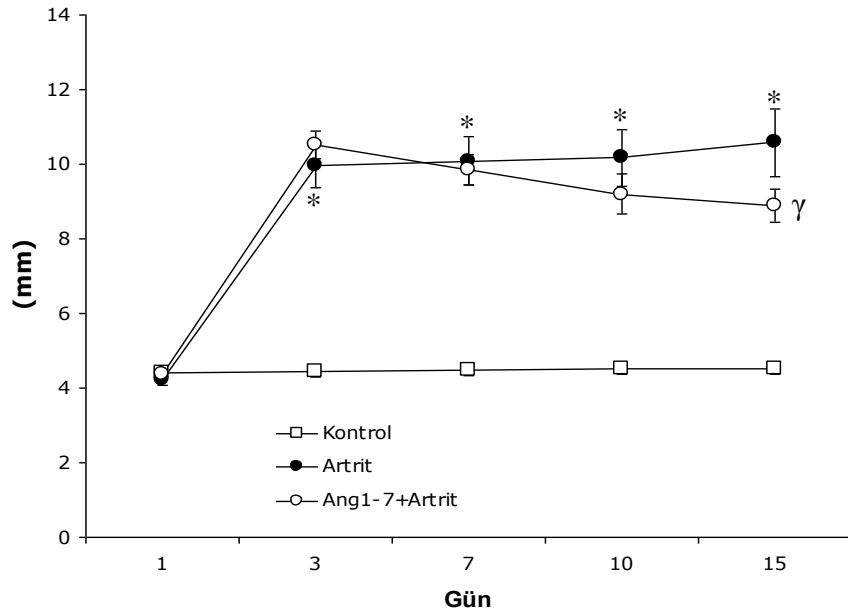


**Şekil 4.2:** Artritli sıçanlarda kan basıncı değişikliği ve Ang 1-7'nin etkisi. \* $p < 0,001$  artrit vs kontrol;  $\gamma$   $p < 0,05$  artrit vs artrit + Ang 1-7.

Öte yandan Ang 1-7 tedavisi almaya başlayan grupta, artrit grubuna göre 10. günde istatistiksel olarak önemli olmayan bir düşüş görülmüştür ( $p < 0,1$ ), fakat bu düşüş 15. günde anlamlı olarak bulunmuştur ( $p < 0,03$ ).

#### 4.1.3. Peççe ödemi ölçümü

Artrit ve artrit + Ang 1-7 alan sıçanlarda peççe ödeminde 3. günden itibaren önemli bir artış ( $p < 0,001$ ) görülmüştür ve bu artış artrit grubunda 15. güne kadar devam etmiştir. Öte yandan, Ang 1-7 tedavisi alan sıçanların peççe hacminde 10. günde (Ang 1-7 verilmişinden 3 gün sonra) anlamlı olmayan bir azalma görülmüş fakat bu azalma 15. günde anlamlı olarak bulunmuştur ( $p < 0,02$ ). (Şekil 4.3)



**Şekil 4.3:** Artritli sıçanlarda pençe ödemi ve Ang 1-7'nin etkisi. \*  $p < 0,01$  artrit vs kontrol;  $\gamma$   $p < 0,02$  artrit + Ang 1-7 vs artrit.

Başlangıç ve 15. gün değişim oranı dikkate alındığında Kontrol grubunda bu oran +%2,03 iken, artrit grubunda +%151 ve artrit + Ang 1-7 alan grupta +%104 olarak kaydedilmiştir.

## 4.2. İzole Torasik Aorta Yanıtları

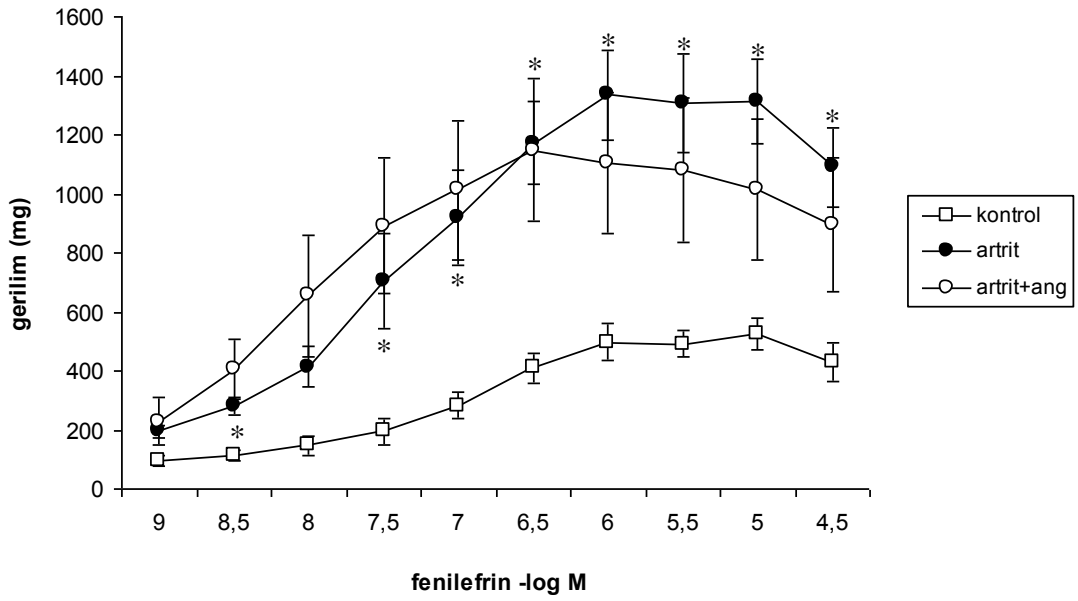
İzole torasik aorta yanıtları, endotelli ve endotelsiz preparatlarda, kasılma ve gevşeme yanıtları olarak, kontrol, artrit ve artrit + Ang 1-7 grup arasında ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

### 4.2.1. Kasılma yanıtları

#### 4.2.1.1. Fenilefrin

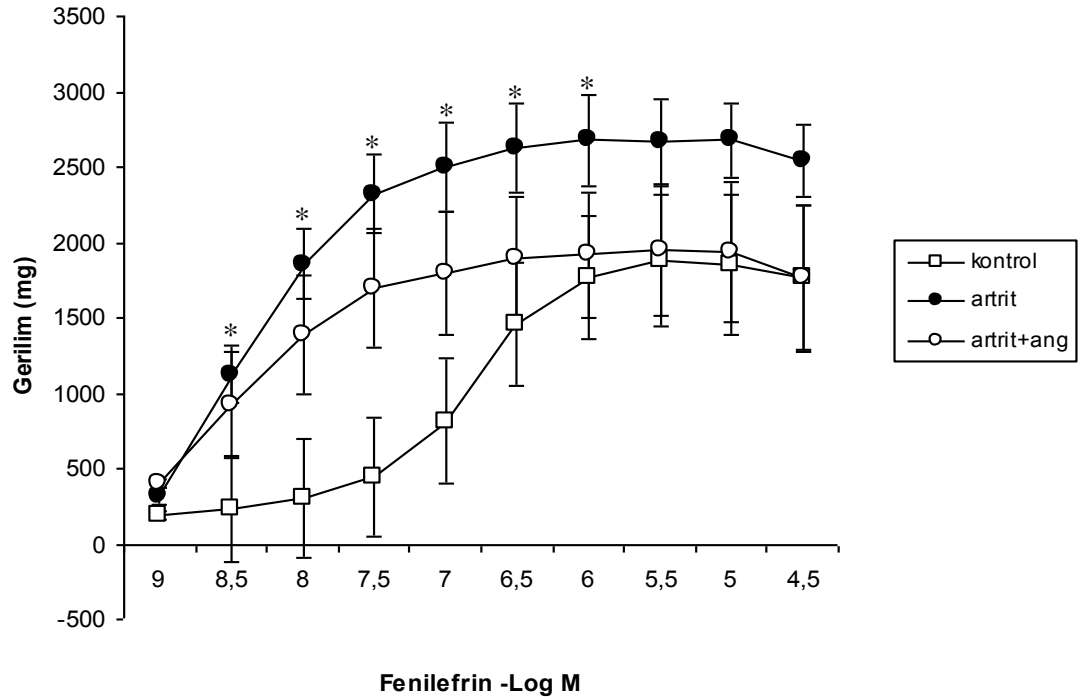
Fenilefrin ( $1.10^{-9}$ - $3.10^{-5}$ M) ve KCl (60mM) her üç grupta endotelli ve endotelsiz olarak çalışılmıştır. Endotelli preparatlarda phe kasılma yanıtları, artritli grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış bulunmuştur. Özellikle  $3.10^{-8}$ M ( $7,5 -\log M$ ) ile  $3.10^{-5}$ M ( $4,5 -\log M$ ) arasındaki dozlarda anlamlı bulunmuştur. (Şekil 4.4)





**Şekil 4.4:** Endotelli preparatlarda phe kümülatif kasılma yanıtları. \*  $p < 0,01$  artrit vs kontrol

Endotelsiz preparatlarda, phe kasılma yanıtları, artritli grupta kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0,01$ ) olarak artış göstermiştir.  $3 \cdot 10^{-9}$  M (8,5 -log M) ile  $1 \cdot 10^{-6}$  M (6 -log M) arası dozlar anlamlı bulunmuştur. (Şekil 4.5)

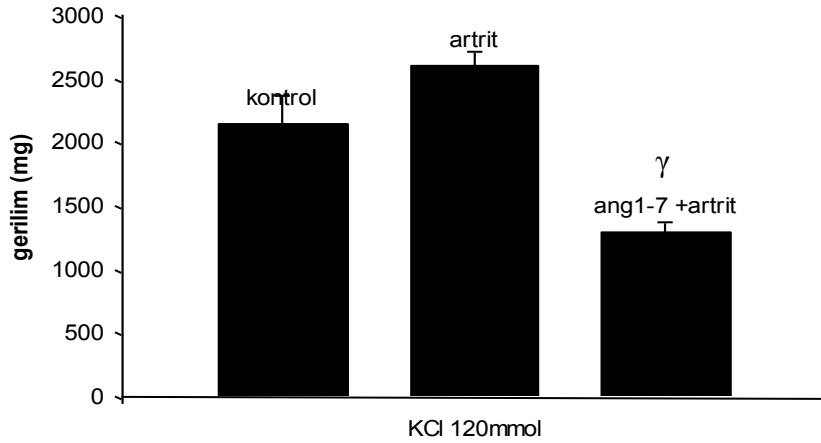


**Şekil 4.5:** Endotelsiz preparatlarda phe kümülatif kasılma yanıtları. \*  $p < 0,01$  artrit vs kontrol

Genel olarak endotelsiz preparatlarda phe kasılma yanıtları endotelli preparatlara göre daha fazla idi.

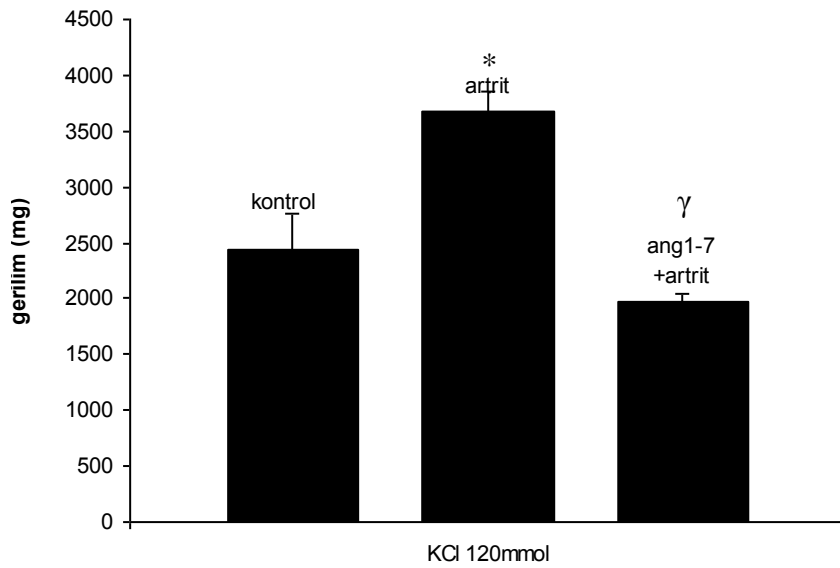
#### 4.2.1.2. KCl

Endotelli preparatlarda artrit grubunda kasılma yanıtlarında artış görülse de bu artış kontrol grubuna göre anlamlı değildir. Öte yandan Ang 1-7 verilen grupta KCl kasılma yanıtlarında anlamlı ( $p < 0,001$ ) bir azalma görülmüştür (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6:** Endotelli torasik aorta preparatlarında KCl ile indüklenen kasıcı yanıtların gruplar üzerindeki etkisi.  $\gamma$   $p < 0,001$  artrit + Ang 1-7 vs artrit

Endotelsiz preparatlarda artrit grubunda KCl kasılması anlamlı olarak artmıştır ( $p < 0,008$ ). Ang 1-7 bu kasılmayı anlamlı ( $p < 0,012$ ) olarak azaltmıştır (Şekil 4.7).



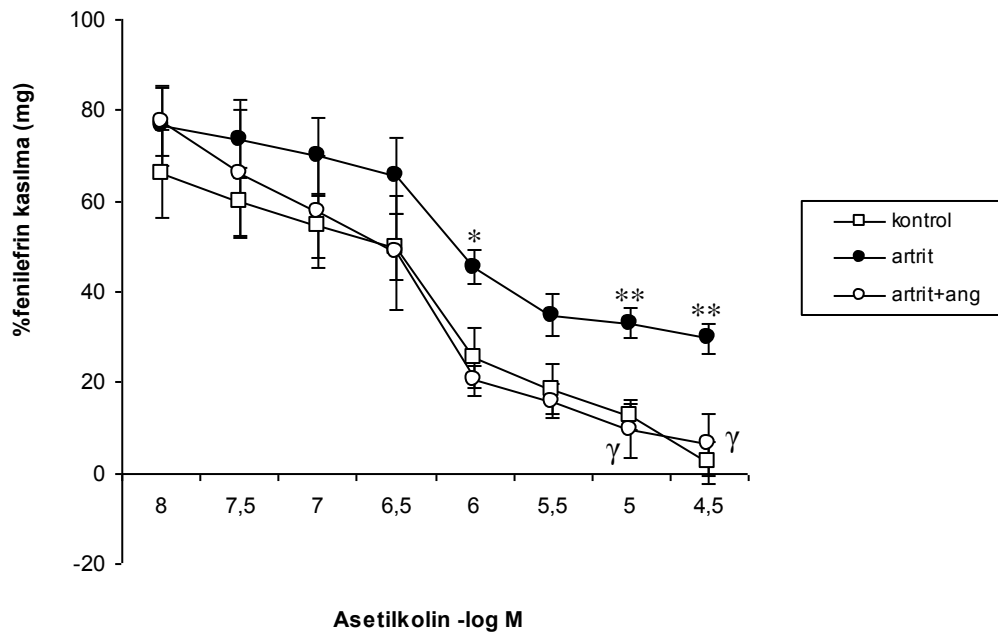
**Şekil 4.7:** Endotelsiz torasik aorta preparatlarında KCl ile indüklenen kasıcı yanıtların gruplar üzerindeki etkisi. \*  $p < 0,01$  artrit vs. kontrol;  $\gamma$   $p < 0,01$  artrit + Ang 1-7 vs. artrit.

#### 4.2.2. Gevşeme yanıtları

Gevşeme yanıtları, damarlar submaksimal phe ile kasılarak ortama kümülatif olarak artan dozlarda ACh ( $1.10^{-8}$ - $3.10^{-5}$  M) ve NaNP ( $1.10^{-8}$ - $3.10^{-5}$  M) verilerek değerlendirildi.

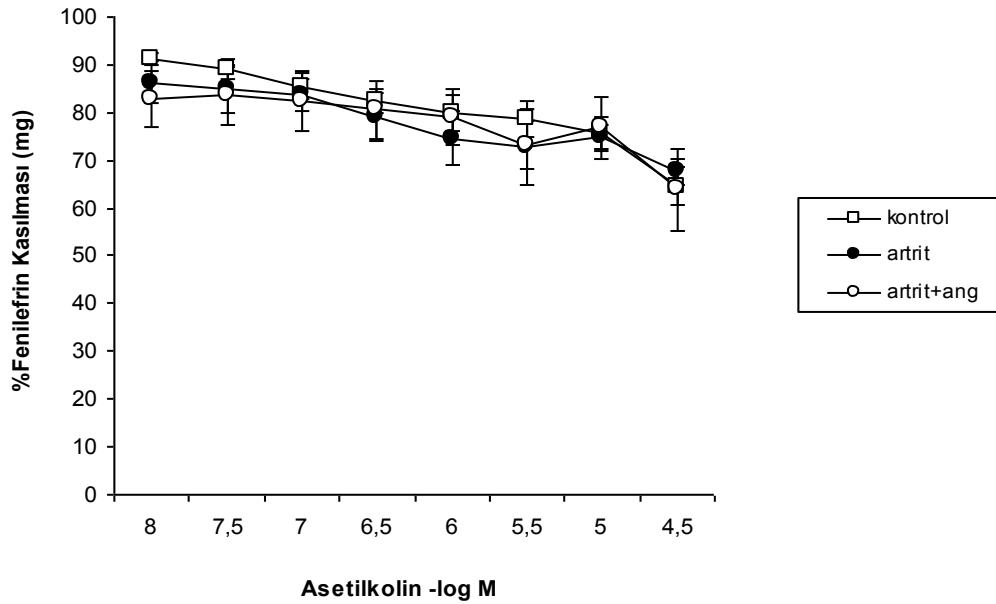
##### 4.2.2.1. Asetilkolin

Endotelli preparatlarda artrit grubunda gevşeme yanıtları daha az olup  $1.10^{-6}$ M (6 – log M) ile  $3.10^{-5}$ M (4,5 –log M) konsantrasyonlarda anlamlı bulunmuştur (Şekil 16). Ang 1-7 alan grupta ise artrit neden olduğu ACh yanıtındaki azalmayı inhibe ederek kontrol grubu değerine yakın gevşeme sağlamıştır.  $1.10^{-5}$ M (5 –log M) ve  $3.10^{-5}$ M (4,5) dozları anlamlı bulunmuştur. (Şekil 4.8)



**Şekil 4.8:** Submaksimal phe ile prekontrakte edilen endotelli aort preparatlarında ACh ile elde edilen gevşeme yanıtı. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  artrit vs Kontrol.  $\gamma$   $p<0.01$  artrit + Ang 1-7 vs artrit .

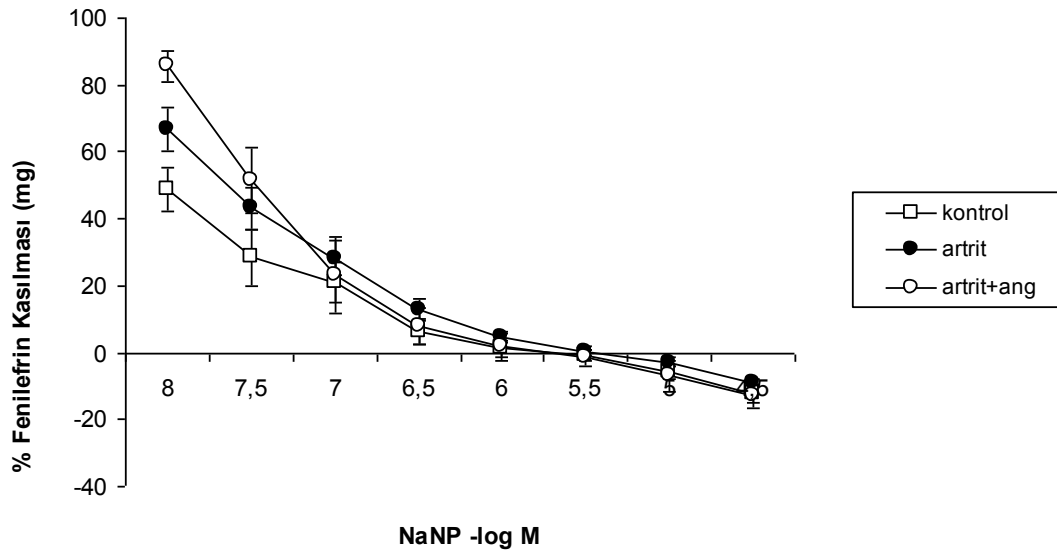
Endotelsiz preparatlarda ACh 'nin gevşetici etkisi belirgin oranda azalmış , %10-25 arası bir gevşeme normal olarak değerlendirilmiştir. Bu preparatlarda gruplar arasında önemli bir fark görülmemiştir (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9:** Submaksimal phe ile prekontrakte edilen endotelsiz aort preparatlarında ACh ile elde edilen gevşeme yanıtı

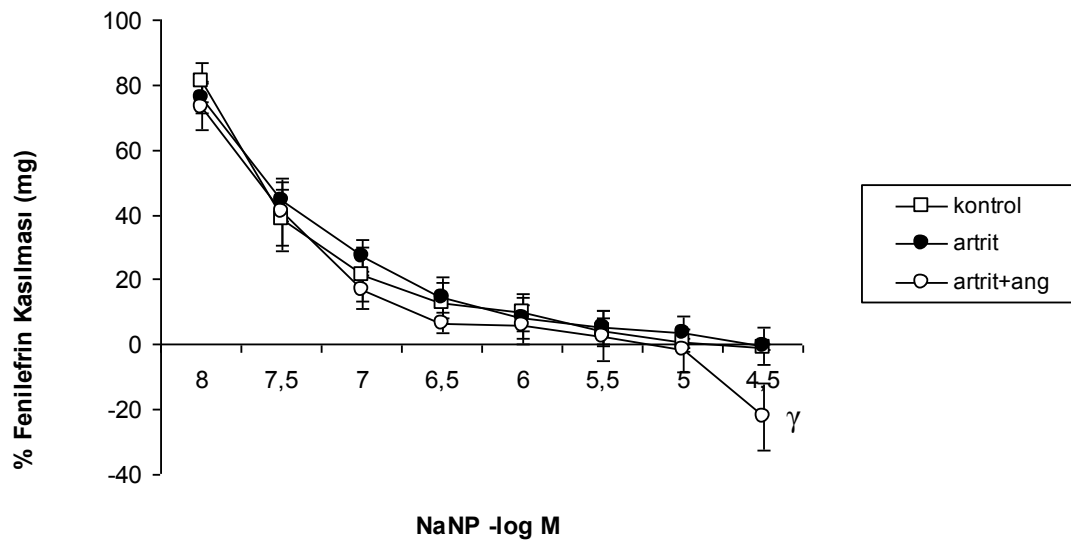
#### 4.2.2.2. NaNP

Endotelli preparatlarda NaNP ile elde edilen gevşeme yanıtlarında gruplar arasında bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10:** Submaksimal phe ile prekontrakte edilen endotelli aort preparatlarında NaNP'nin etkisi

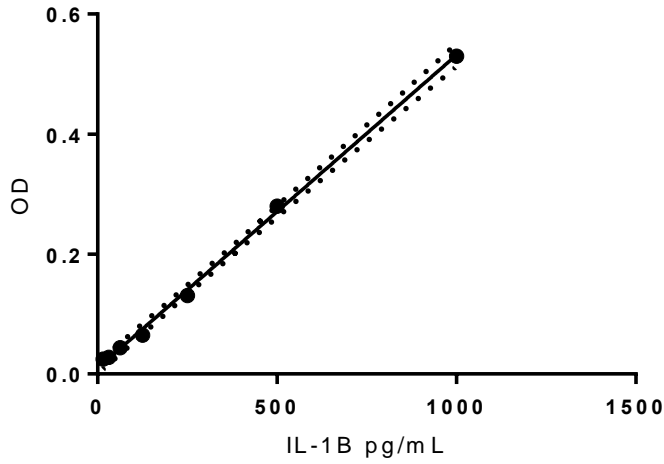
Şekil 4.11'de görüldüğü gibi endotelsiz preparatlarda da gruplar arasında bir fark bulunmamıştır, ancak Ang 1-7 grubunda son dozda;  $3 \cdot 10^{-5} \text{M}$  ( $4,5 -\log \text{M}$ ) konsantrasyonda, anlamlı bir gevşeme yanıtı elde edilmiştir ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 4.11:** Submaksimal phe ile prekontrakte edilen endotelsiz aort preparatlarında NaNP'nin etkisi  $\gamma p < 0,05$  artrit + Ang 1-7 vs artrit .

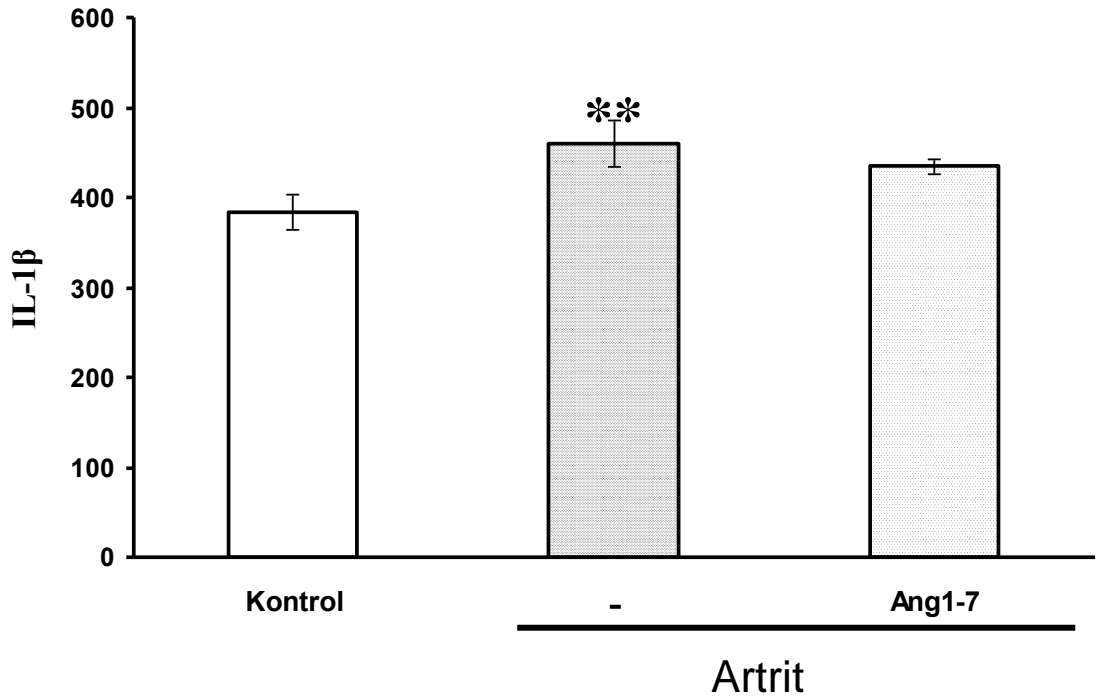
### 4.3. Elisa Kitlerle IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ve sRAGE Sonucu

#### 4.3.1. IL-1 $\beta$ sonucu



Şekil 4.12: IL-1 $\beta$  analizi için kullanılan standart ve güvenilirlik alanı

Kontrol grubundaki sıçanların kanında  $383,949 \pm 19,2$  pg/mL IL-1 $\beta$  ölçülmüştür. Artritli sıçanların kanında ise bu değer %20 artarak  $460,57 \pm 25,9$  pg/mL düzeyini yükselmiştir ( $P < 0.01$ ). Ang 1-7 artritli sıçanlarda IL-1 $\beta$  düzeyini %6 azaltarak  $434,685 \pm 7,8$  pg/MI düzeyine düşürmüştür. Ancak bu etki önemli düzeye ulaşmamıştır.

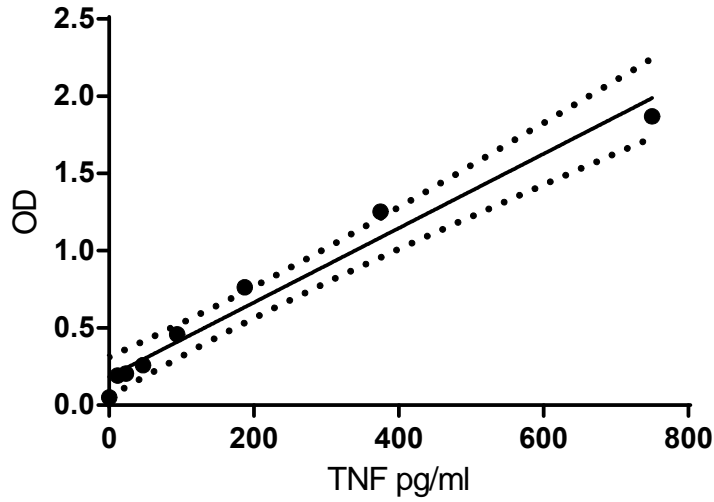


**Şekil 4.13:** Artritli sıçanlarda IL-1 $\beta$  değişikliği ve Ang 1-7'nin etkisi. \*\*p<0.01 artrit vs. kontrol

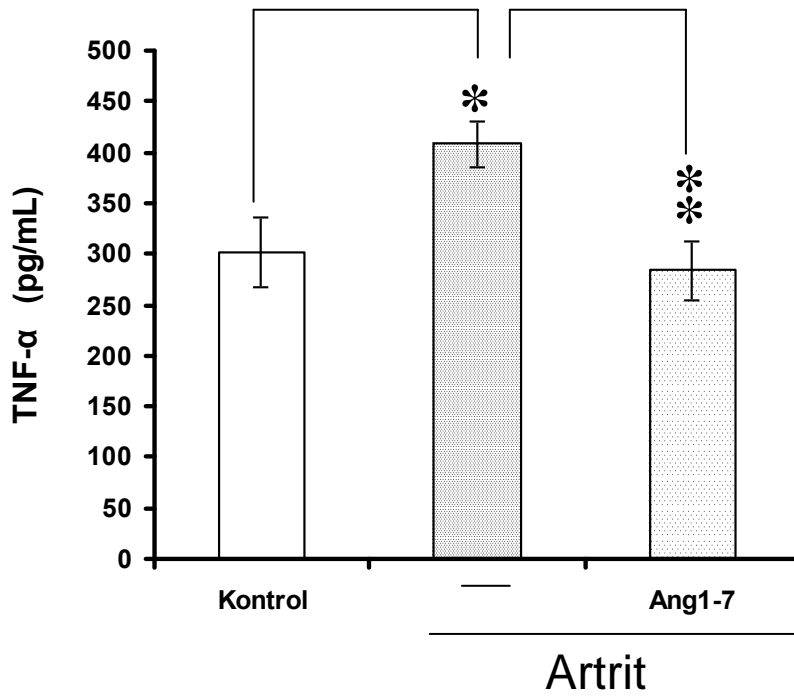
#### 4.3.2. TNF- $\alpha$ sonucu

Kontrol grubundaki sıçanların kanında  $302,641 \pm 35,148$  pg/mL TNF- $\alpha$  ölçülmüştür. Artritli sıçanların kanında ise bu değer %35 artarak  $409,138 \pm 23,07$  pg/mL düzeyini yükselmiştir (p<0,02). Ang 1-7 artritli sıçanlarda TNF- $\alpha$  düzeyini %44 azaltarak  $284,342 \pm 28,29$  pg/mL düzeyine düşürmüştür.





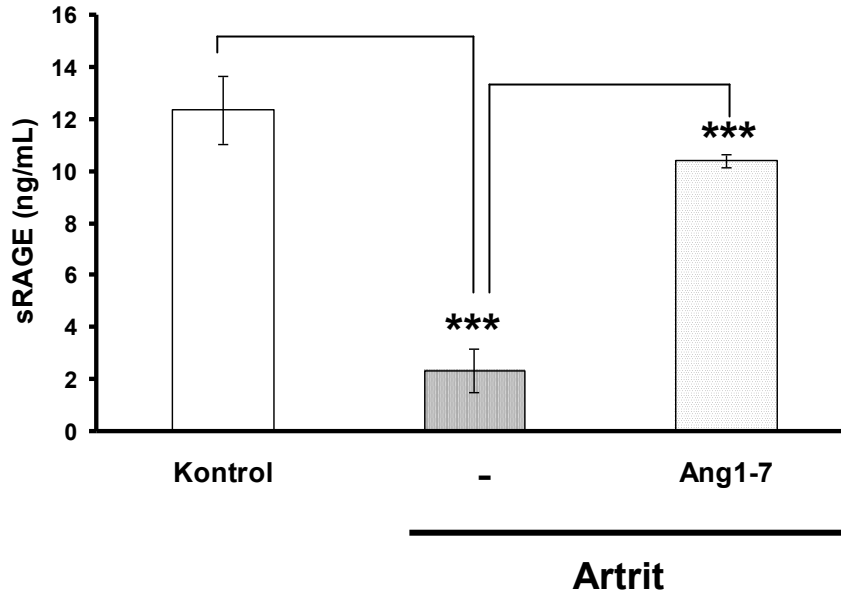
Şekil 4.14: TNF- $\alpha$  analizi için kullanılan standart ve güvenilirlik alanı.



Şekil 4.15: Artritli sıçanlarda TNF- $\alpha$  değişikliği ve Ang 1-7'nin etkisi. \*  $p < 0.02$  artrit vs. kontrol; \*\*  $p < 0.01$  artrit + Ang 1-7 vs. artrit

### 4.3.3 sRAGE sonucu

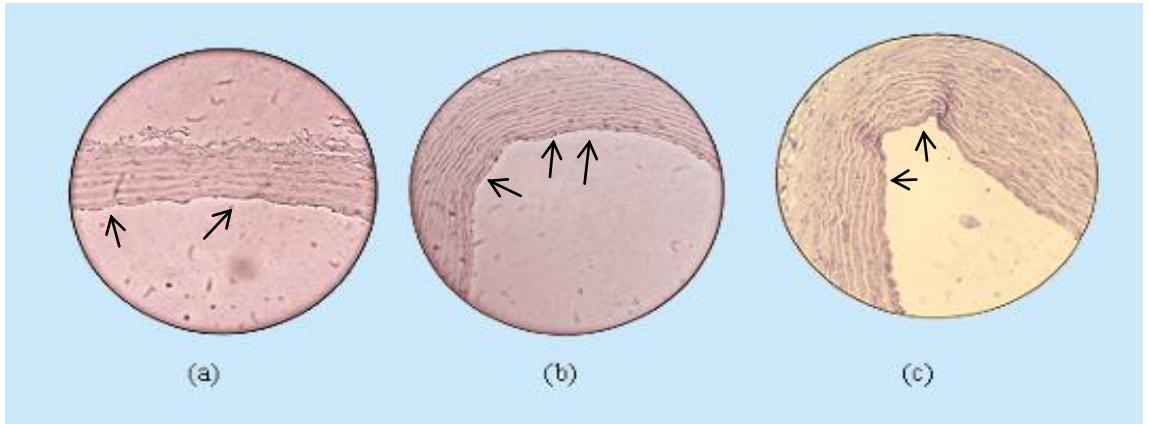
Kontrol grubundaki sıçanların kanında  $12,348 \pm 1,33$  ng/mL sRAGE ölçülmüştür. Artritli sıçanların kanında ise bu değer % 81 azalarak  $2,317 \pm 0,84$  ng/mL düzeyini düşmüştür ( $p < 0.001$ ). Ang 1-7 artritli sıçanlarda sRAGE düzeyini %350 artırarak  $10,406 \pm 0,25$  ng/mL düzeyine yükseltmiştir ( $p < 0.001$ ).



**Şekil 4.16:** Artritli sıçanlarda sRAGE değişikliği ve Ang 1-7'nin etkisi. \*\*\*  $p < 0.001$  artrit vs. kontrol; \*\*\*  $p < 0.001$  artrit + Ang 1-7 vs. artrit

### 4.4. İmmünohistokimyasal RAGE analizi

Her 3 grupta parafin bloklardan elde edilen aort kesitlerinde immünohistokimyasal inceleme sonucu RAGE saptanmıştır. Mikroskopik olarak preparatlarda RAGE artritli grupta yoğun olarak görülmektedir.



**Resim 4.1:** Kontrol (a), Artrit (b) ve Artrit + Ang 1-7 (c) gruplarında RAGE immünohistokimyasal görüntüsü (X40 büyütme)

Ek olarak endotel tabakasının kontrol grubunda intakt (a) olduğu ve fakat artritli grupta belirgin şekilde zedelendiği (b) görülmektedir. Artrit + Ang 1-7 grubunda ise endoteldeki zedelenmenin artritli gruba göre daha az olduğu (c) görülmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Romatoid Artrit, dünya popülasyonunun yaklaşık %1'ini etkileyen en yaygın otoimmün hastalıklardan biridir. Periferik eklemlerde simetrik dağılım gösteren, kalıcı sinovit ile karakterize, sistemik, kronik inflamatuvar bir hastalık olan (Firestein 2005) RA'de eklem sinoviyasında oluşan inflamasyon eklem dışına yayılıp diğer organları ve sistemleri tutabilir (Gümüüşdiş vd 2003). Özellikle kardiyovasküler sistem tutulumları kendi başına bir risk faktörüdür ve yüksek seviyelerde oluşan kronik inflamatuvar mediyatörler, bu riskin artmasına katkıda bulunarak mortalite artışına neden olmaktadır (Voskuyl 2006). Son yıllarda RAS sistemi ile inflamatuvar hastalıklar arasında giderek artan bir bağlantının olduğu bildirilmektedir (Owen ve Campbell 1998).

Çalışmamızda, insanlarda görülen RA'ya birçok yönü ile benzemesi, sağlam, kolay, güvenilir ve sık kullanılır olması, aynı zamanda hastalığın başlangıç ve devam eden döneminde, artrit parametrelerinin göreceli olarak iyi ölçülebilir olması nedeniyle FCA ile indüklenen sıçan artrit modeli kullanılmıştır (Sokolof 1984, Bendele 2001).

FCA ile oluşturulan artritte sıçanlarda sistemik değişiklikler olmaktadır. Pençe ödeminde artış ve anlamlı kilo kaybı gibi sistemik değişikliklerde bizim çalışmamızda gözlenmiştir. Adjuvan artrit, lenfositöz ve spesifik artrojenik T hücrelerinin FCA ile aktive edilmesi ile başlayan eklem inflamasyonu ve daha sonra çeşitli sitokinlerin (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) ve NO üretiminin artışı ile devam eden immun ve inflamatuvar faza sahiptir. Söz konusu bu sitokinler NO yolağını ve diğer inflamatuvar yanıtları tetikleyebilirler (Cannon vd 1996). Proinflamatuvar sitokinlerin salınımı eklemlerde yapısal değişikliklere neden olur. Sinoviyada hiperplazi ile birlikte ödem ortaya çıkar. Bu histopatolojik değişiklikler klinik olarak pençe ödemi şeklinde görülür. Proinflamatuvar sitokinlerden özellikle TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  kemik dokuda ve kıkırdakta erozyona neden olmakta ve eklem harabiyetinin sürdürülmesine katkı sağlamaktadır

(Sandoo 2010). Çalışmamızda da artritli grupta TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  seviyeleri artmış ve sRAGE seviyesi azalmıştır. Bu artışın görülen pençe ödemi ve diğer inflamatuvar reaksiyonlarda rol oynadığını düşünmekteyiz. FCA ile indüklenen artrit kilo kaybı ile de karakterizedir. Bizim çalışmamızda da kilo kaybı 3. günden itibaren başlayarak 15. güne kadar anlamlı şekilde azalarak devam etmiştir. Kilo kaybının daha az besin alımına bağlı olduğu belirtilmiştir (Martin vd 2008).

FCA ile indüklenen adjuvan artritte vasküler reaktivitede değişiklikleri söz konusudur (Ünal vd 2000, Haruna 2006). Ang II'nin endotelial disfonksiyonun ortaya çıkmasında, vasküler duvarda inflamatuvar yanıtların oluşmasına ve sonuç olarak hipertansiyonun gelişmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Ruiz-Ortega vd 2001). Bu değişiklikler RAS sistemindeki aktivasyona bağlı olabilir. FCA ile indüklenen artritte özellikle 14. günde sistolik kan basınçlarının arttığı gösterilmiştir (Sakuta vd 2010). Çalışmamızda 3. günden başlayarak sistolik kan basınçları kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Artritte ortaya çıkan inflamasyon ve endotelial disfonksiyon sistolik kan basınçlarında artışa neden olmaktadır. Çalışmamızda, artrit oluşturulan sıçanlarda Ang 1-7 sistolik kan basıncını 10.günde azalttığı ve 15. günde artritli gruba göre anlamlı şekilde kan basıncını normale dönüştürdüğü görülmüştür. Ang 1-7'nin bu etkileri, farmakolojik profilinin, Ang II'ye ters yönde olmasına, vasodilatasyona bağlı olabilir (Brunton vd 2009, El-Hashim vd 2012).

Vasküler tonus üzerinde yapılan kasılma çalışmalarında, vasküler tonusun düz kas ve endotel hücrelerinde bulunan intrasellüler  $Ca^{+2}$  depoları tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Daniel vd 1995).  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılı kasılmaya neden olan phe, sitozolik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonlarını membran depolarizasyonu sonucu direkt ya da indirekt olarak reseptör ya da voltaj aracılı  $Ca^{+2}$  kanalları açarak, fosfolipaz C aktivasyonu sonucu myosin hafif zincir kinaz aktive ederek ya da IP3 üretimi ile birlikte IP3 ile indüklenen endoplazmik retikulumdan  $Ca^{+2}$  açığa çıkışını sağlayarak gerçekleştirebilir (Demirci vd 2007, Bölükbaşı Hatip vd 2009). Çalışmamızda artritlik grupta gerek endotelli gerek endotelsiz preparatlarda phe kasılma yanıtlarında artışın nedeni hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonlarındaki artışa özellikle IP3 aracılı sitozolik  $Ca^{+2}$  açığa çıkışına bağlı olabilir. Zira artritte kalsiyumsuz ortamda phe kasılma yanıtlarının değişmemesi hücre içine giren ekstrasellüler  $Ca^{+2}$ 'un primer rol oynamadığını

düşündürmektedir (Demirci vd 2007). Ancak, endotelsiz preparatlardaki phe kasılma artışı endotel kaynaklı gevşetici mekanizmaların yok olmasına bağlı olabilir.

Öte yandan vasküler düz kasta yüksek KCl ile indüklenen kasılmalar membran depolarizasyonu sonucu olan voltaja dayalı kanallarından  $Ca^{+2}$  influxunun artışı, mitokondrial uptake artışı ve miyosin hafif zincir kinaz aktivasyonuna (Karaki vd 1997, Ratz vd 2005) ve RhoA-ilişkili kinaz ve PKC aktivasyonuna (Urban vd 2003) bağlı olabilir. Çalışmamızda endotelsiz preparatlarda anlamlı olmak üzere KCl yanıtlarının artritik grupta artmasının nedeni gevşetici mekanizmaların yok olmasına bağlı olabilir. Ang 1-7 verilen grupta gerek endotelli ve gerekse endotelsiz preparatlarda phe ve KCl yanıtlarının azalması Ang 1-7'nin  $Ca^{+2}$  homeostazında rol oynadığını düşündürmektedir. İskemi reperfüzyon hasarı ile ortaya çıkan myokardiyal bozulmada da Ang 1-7'nin  $Ca^{+2}$  homeostazını düzenleyerek, sitoprotektif etki ortaya çıkardığı ve etkisinin hastalık durumlarında daha belirgin olduğu belirtilmiştir (Wang vd 2013). Çalışmamızda Ang 1-7'nin, KCl kasılma yanıtlarında phe kasılma yanıtlarına oranla daha fazla ve anlamlı bir azalma göstermesi, Ang 1-7'nin  $Ca^{+2}$  homeostazında özellikle hücre içine  $Ca^{+2}$  girişini engelleyerek etki yaptığını düşündürmektedir.

ACh'nin endotel üzerine olan etkisi NOS'dan bağımsız mekanizmalarla da olabilir. Normal koşullarda ACh yeterli NO açığa çıkışına neden olarak endotel kaynaklı kasıcı faktörlerin etkisini maskeler. Endotelde bir bozulmanın olması durumunda superoksid radikalleri, siklooksijenaz ürünleri, endotelin gibi endotel kasıcı faktörlerin belirgin etkisi ortaya çıkar. Endoteli mekanik olarak zedelenmiş preparatlarda ACh yanıtında %30'a varan bir gevşeme beklenebilir. Zira endotelli preparatlarda endotel varlığı test edilirken %70 oranından daha fazla gevşeme beklenmelidir (Chang ve Davis 1993). Benzer şekilde endotelsiz preparatlardaki %30'a varan gevşemeler normal sınırlar içinde değerlendirilebilir. Çalışmamızda kontrol grubunda endotelli preparatlarda %80 oranından fazla bir gevşeme elde edilmesi preparatların uygun koşullarda izole organ banyosuna asıldığını göstermektedir. Endoteli mekanik olarak zedelediğimiz preparatlarda ise ACh yanıtlarına olan gevşemenin %75-90 oranında azalması ise endotelin mekanik olarak başarı ile zedelendiğini göstermektedir.

Vasküler düz kas tonusunun düzenlenmesinde endotel tabakası önemli bir rol oynamaktadır. Endotel aracılı yanıtlarda bozulma ROS'ların açığa çıkışı ya da sitokin

üretiminden kaynaklanabilir. Endotelden salınan çeşitli vazodilatör mediyatörler (NO, prostasiklin, endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör vd) endotel fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar. Adjuvan artrit modelinde, ACh'nın endotel bağımlı gevşeme yanıtlarında, artrite bağlı olarak giderek artan bir azalma söz konusudur (Demirci vd 2007). ACh gevşeme yanıtlarında vasküler endotel kaynaklı endotelyal nitrik oksid sentaz (eNOS) tarafından sentezlenen NO önemlidir. ACh ayrıca hücre içi  $Ca^{+2}$ 'u artırarak eNOS akut stimülasyonuna ve NO açığa çıkışına neden olur (Arnal vd 1996). NO inflamatuvar reaksiyonlara bağlı olarak çeşitli humoral ve hücreyel yanıtları düzenleyebilir. Ayrıca endotel için toksik olduğu bilinen sitokinlerin indüklenebilir nitrik oksid sentaz (iNOS) ekspresyonunu arttırdıkları ve fakat eNOS down regülasyonuna neden oldukları bilinmektedir (Li ve Föstermann 2000). Bu doğrultuda çalışmamızda elde edilen ve artritli grupta azalan ACh yanıtlarının, endotel tabakasındaki disfonksiyona bağlı ve endotel aracılı olabileceğini göstermektedir. Öte yandan, Ang 1-7'nin oluşturduğu yanıtta, G protein kenetli MasR'nin uyarılması sonucu eNOS aktivasyonu ve NO üretiminin stimülasyonu rol oynayabilir (Sampaio vd 2007). Ancak Ang 1-7'nin endotelsiz aortta da etkinlik göstermiştir. Ayrıca, Ang 1-7 phe ve KCl kasılmasını azaltsa da, etkisi KCl kasılması üzerinde daha fazla ve önemliydi. Bu nedenle Ang 1-7'nin hücre dışından içeriye yönelik  $Ca^{+2}$  girişini azaltarak aort kasılmasını azaltmış olabilir.

NaNP gevşemesi primer olarak damar düz kas hücrelerinde solubl guanilil siklaz aracılığı ile olur (Lovren ve Triggle 2000). Çalışmamızda NaNP gevşemesi artrit veya Ang 1-7 ile belirgin olarak değişmemiştir. Bu nedenle damar düz kasın artritte zedelenmediği ve Ang 1-7'nin etkisinde yer almadığı düşünülebilir.

Çalışmamızda anlamlı olarak artritlik grupta artan TNF- $\alpha$  seviyelerinin, Ang 1-7 alan grupta yine anlamlı olarak azalması, Ang 1-7'nin RA'da görülen endotel disfonksiyonun azaltılmasında proinflamatuvar sitokinler üzerinden etki yaptığını düşündürmektedir.

RA gibi inflamatuvar hastalıklarda endotelyal disfonksiyonun ortaya çıkışında çeşitli mekanizmalar rol oynar. Adjuvan artritte de arttığı gösterilen serbest oksijen radikalleri, süperoksid radikali üretimi ve NO'nun ROS'lara etkileşimi önemli rol oynar. Vasküler duvarda ROS'lar, endotelden, düz kas hücrelerinden ve fibroblastlardan salınır

(Griendling vd 2000, Griendling ve Fitzgerald 2003). Vasküler yatakta NADPH oksidazlar oksidatif stresin ana kaynaklarından biridir (Lassegue ve Clempus 2003). Vasküler NADPH oksidazların ekspresyonu ve aktivasyonu proinflamatuvar sitokinler olan örneğin TNF- $\alpha$  tarafından düzenlenir. Çalışmamızda artritte TNF- $\alpha$  %35, IL-1 $\beta$  %20 artmıştır. TNF- $\alpha$ , RA'da endotel tabakasının disfonksiyonundan sorumlu tutulan en önemli mediyatördür olup endotel bağımlı gevşemeyi azaltır. Çalışmamızda görülen ACh'e bağımlı gevşemelerin artritlik grupta azalmasının nedeni ayrıca TNF- $\alpha$ 'nın ACh bağımlı gevşeme için gerekli endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin aktivasyonunu bloke etmesinden kaynaklanabilir (Metsios vd 2010).

sRAGE, tam-uzunlukta olan reseptörde bulunan transmembran ve sitozolik domainden yoksun bir "decoy" (tuzak)reseptördür. RAGE'nin proinflamatuvar etkisini önler (Pullerits vd 2006). sRAGE çoğu inflamatuvar ve kardiyovasküler hastalıkta azalır. sRAGE'nin RA (Pullerits vd 2005) ve koroner arter hastalarının kanında (Falcone vd 2005) azaldığı kaydedilmiştir. Ayrıca RA'da sRAGE'nin artırılması endotel disfonksiyonuna bağımlı aort sertliği indeksi olan "Aortic augmentation index" değerini azaltır (Tam vd 2013). Bizim çalışmamızda da artritte sRAGE azalmıştır. Bu azalış ile birlikte kaydedilen TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  artışının, artritte görülen pençe ödemi gibi inflamatuvar reaksiyonların görülmesinde rol oynadığını düşünmekteyiz. Ayrıca Ang 1-7'nin sRAGE'yi arttırıcı ve TNF- $\alpha$ 'yı azaltıcı olarak birlikte sergilediği bu etki antiinflamatuvar ve damar gevşetici etkisinde önemli rol alabilir.



## 6. SONUÇ

Romatoid artritte, ilerleyen dönemlerde kardiyovasküler tutulum, koroner arterit, aortit ve pulmoner hipertansiyon olabilmektedir. Ayrıca RA'da inflamasyonla birlikte oluşan erken vasküler hasar sonrası endotelial disfonksiyon ve vasküler reaktivitede artış görülmektedir. Bu durum RA'da mortalite artışına neden olmaktadır.

RA tedavisinde steroidler, steroid dışı antiinflamatuvarlar, metotreksat, TNF- $\alpha$  inhibitörleri, azatiyoprin, klorakin, altın tuzları, penisilamin, sülfosalazin v.b. ilaçlar kullanılmaktadır. Fakat bu ilaçlar hastalığın semptomlarını geçirmekte ancak hastalığı ortadan kaldırmamaktadır. RA'da hali hazırda radikal bir tedavi yoktur.

Çalışmamızda FCA ile indüklenen sıçan artrit modelinde pençe ödemi, kilo kaybı, kan basıncı gibi sistemik bulgulara artış, vasküler yanıtlarda kasıcı ajanlara karşı artmış ve gevşetici ajanlara karşı azalmış reaktivitenin yanı sıra TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeylerinde artış ve sRAGE düzeylerinde azalma saptanmıştır. Sıçan artrit modelinde Ang 1-7'nin, artrit sistemik bulgularını düzelttiği, artritte görülen kan basıncı yüksekliğini düşürdüğü, KCl gibi kasıcı ajanlara yanıtı  $Ca^{+2}$  homeostazında özellikle hücre içine  $Ca^{+2}$  girişini engelleyerek azalttığı, ACh gibi gevşetici ajanlara karşı yanıtı, G protein kenetli MasR'nin uyarılması sonucu eNOS aktivasyonu ve NO üretiminin stimülasyonu üzerinden yaptığı görülmüştür. Ayrıca Ang 1-7'nin, proinflamatuvar sitokinlerin ve özellikle TNF- $\alpha$ 'nın seviyelerini azaltarak ve sRAGE'nin seviyelerini artırarak antiinflamatuvar ve endotel üzerine koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır.

Ang 1-7'nin artritte çoklu mekanizmalar üzerinden etki göstererek gerek hastalığa ve gerekse vasküler komplikasyonlarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu ve bu nedenle RA tedavisinde Ang 1-7'nin de yeri olabileceğini düşünüyoruz. Ang 1-7'nin gözlenen bu yararlı etkileri, RA'da yalnızca yeni bir tedavi yaklaşımı sağlamakla

kalmayacak aynı zamanda RA'da görülen vasküler komplikasyonların erken dönemde düzeltilebilmesine olanak sağlayabilecektir. Ayrıca artritli hastalarda ilaç tedavi kullanım oranını azaltarak farmakoekonomik açıdan da olumlu etkilerinin olabileceği kanısındayız.

## KAYNAKLAR

- Aird, W. C. (2004) Endothelium as an organ system. *Crit. Care. Med.*, 32: S271-9.
- Akira, S., Taga, T., Kishimoto, T. (1993) IL-6 biology and medicine. *Adv. Immunol.*, 54: 1-78.
- Alenina, N., Bader, M., Walther, T. (2002) Imprinting of the murine MAS protooncogene is restricted to its antisense RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290: 1072–1078.
- Armando, R., Miguel, A. M. (2004) Advanced glycation and endothelial functions: A link towards vascular complications in diabetes. *Life Sciences*, 76: 715-730
- Arnal, J.F., Tack, I., Besombes, J.P., Pipy, B., Negre-Salvayre, A. (1996) Nitric oxide and superoxide anion production during endothelial cell proliferation. *Am. J. Physiol.*, 271: 1521-1526.
- Bazzoni, F., and Beutler, B. (1996) the tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.*, 334: 1717-1725.
- Bendele, A. M. (2001) Animal models of rheumatoid arthritis. *J. Musculoskel. Neuron Interact.*, 1:377- 385.
- Berridge, M. J., Irvine, R. V. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 341: 197 -202.
- Bierhaus, A., Chevion, S., Chevion, M., Hofmann, M., Quehenberger, P., Illmer, T., Luther, T., Berentshtein, E., Tritschler, H., Muller, M., Wahl, P., Ziegler, R., Nawroth, P. P. (1997) Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*, 46: 1481- 1490.
- Bierhaus, A., Stern, D. M., Nawroth, P. P. (2006) RAGE in inflammation: a new therapeutic target? *Curr Opin Investig Drugs*, 7: 985- 991.
- Billiar, T. R. (1995) Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Ann. Surg.*, 221: 339-49.

- Bölükbaşı Hatip, F., Hatip-Al-khatib, İ., Ülker, S., Dökmeci, İ. (2009) Adjuvanla artrit oluşturulmuş sıçan modelinde izole aort preparatının reaktif yanıtları ve allopürinol'ün gevşeme yanıtlarına etkisi Pamukkale Tıp Dergisi, 2:107-17
- Brothers, G. B., Hadler, N. M. (1983) Diurnal variations in rheumatoid synovial effusions. *J Rheumatol*, 10: 471- 474.
- Brunton, L. L., Lazo, J. S., Parker, K. L. (2009) Goodman and Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli, çeviri Editörü Süzer Ö., Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti., İstanbul, s184-185.
- Brunton, L. L., Lazo, J. S., Parker, K. L. (2009) Goodman and Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli, çeviri Editörü Süzer Ö., Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti., İstanbul, s794-800.
- Bucciarelli, L. G., Kaneko, M., Ananthkrishnan R., Harja E., Lee, L. K., Hwang, Y. C., Lerner, S., Bakr, S., Li, Q., Lu, Y., Song, F., Qu, W., Gomez, T., Zou, Y. S., Yan, S. F., Schmidt, A. M., Ramasamy, R. (2006) Receptor for advanced-glycation end products: key modulator of myocardial ischemic injury, *Circulation*, 113 : 1226-34.
- Cannon, G.W., Openshaw, S.J., Hibbs, J.B., Hoidal, J.R., Huechstadt, T.P. ( 1996) Griffiths M. Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. *Art Rheumatism*, 39:1677-1684
- Chang, K.S.K., Davis, R.F.(1993) Propofol produces endothelium-independent vasodilatation and may act as a Ca<sup>2+</sup> channel blocker. *Anesth. Analg.*, 76: 24-32
- Chappell, M. C. (2010) Angiotensin-converting enzyme 2 autoantibodies: further evidence for a role of the renin-angiotensin system in inflammation Hypertension and Vascular Disease. *Arthritis Res. Ther.*, 12: 128.
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M., Stern, D. M. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91: 3527-61
- Coblyn, S. J., O'Gara, T. P. (2003) The heart in rheumatic disease. In: Hochberg CM, Silman JA, Smolen SJ, eds *Rheumatology*. Philadelphia, Mosby, s305-13.
- Coleman, J. W. (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.*, 1: 1397- 1406.
- Da Silveira, K. D., Coelho, F. M., Vieira, A. T., Sachs, D., Barroso, L. C., Costa, V. V., Bretas, T. L., Bader, M., de Sousa, L. P., da Silva, T. A., dos Santos, R. A., Simões e Silva, A. C., Teixeira, M. M. (2010) Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, MAS, in experimental models of arthritis, 185: 5569-76.

- Daniel, E.E., Van-Breemen, C., Schilling, W.P., Kwan, C.Y. (1995) Regulation of vascular tone: cross-talk between sarcoplasmic reticulum and plasmalemma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73:551 -7.
- Demirci, B., Uysal, A., Ülker, S. (2007) Alterations in the vascular reactivity of aorta in the early and late phase of adjuvant-induced arthritis in rat. *Vascular Disease Prevention*, 4:11- 19.
- Dinareello, C. A. (1998) İnterleukin -1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int. Rev. Immunol.*, 16: 457- 499.
- Dinçer, Y., Akçay, T., Alademir, Z., İlkova, H. (2002) Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 51: 1360- 2.
- Ding, Q., Keller, J. N. (2005) Evaluation of RAGE isoforms, ligands and signaling in the brain. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1746: 18- 27.
- Direskeneli, H. (2002) Romatoid Artrit Etiyopatogenezi. Hamuryudan 5th edition. Romatoid artrit, MD yayıncılık, sf:8- 15.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., Giambanco, I. (2009) S100B'S double life: Intracellular regulator and ekstracellular signal. *Biochim Biophys. Acta.*, 1793 : 1008-22
- Eidland, A., Sebekova, K., Schinzel, R. (2001) Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *Am. J. Kidney Dis.*, 38: 100-6.
- El-Hashim, A. Z., Waleed, M. R., Raj, R., Heba T. A., Saghir A., Benter, I. F. (2012) Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF-κB-dependent pathways. *British Journal of Pharmacology*, 6: 1964-1976.
- Epstein, H. F., Levin, E. R. (1995) Endothelins. *New Engl. J. Med.*, 333: 356-63.
- Falcone, C., Emanuele, E., D'Angelo, A., Buzzi, M.P., Belvito, C., Cuccia, M., et al. (2005) Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25:1032-7.
- Faulx, M. D., Wright, A. T., Hoit, B. D. (2003) Detection of endothelial dysfunction with brachial artery ultrasound scanning. *Am. Heart J.*, 145 :943-51
- Ferrario, C. M., Trask, A. J., Jessup, J. A. (2005) Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 289: 2281-90.
- Ferrario, C. M., Chappell, M. C. (2004) Novel angiotensin peptides. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61: 2720-2727.

- Firestein, G. S. (2004) The T cell cometh: interplay between adaptive immunity and cytokine networks in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 114: 471–474.
- Firestein, G. S. (2005). Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. Harris ED, Budd CR (ed), *Kelly's Textbook of Rheumatology*, seventh (7th) edition Philadelphia, 996-1042.
- Fleming, I., Bauersachs, J., Buse, R. (1997) Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *J. Vasc. Res.*, 34: 165-174.
- Forstermann, U., Mugge, A., Alheid, U., Haverich, U., Frolich, J. C. (1988) Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ. Res.*, 62: 185-90.
- Furchgott, R. F., Vanhoutte, P. M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.*, 3: 2007- 18.
- Ganong, W. F. (1999) *Tıbbi Fizyoloji. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği Çevirisi*.19. Baskı. İstanbul. Barış Kitabevi, 12: 627- 42.
- Gardner, R. V., McKinnon, E., Poretta, C., et. al. (2003) Hemopoietic function after use of IL-1 with chemotherapy or irradiation. *J. Immunol.*, 171: 1202-6
- Giardino, I., Edelstein, D., Brownlee, M. (1996) Bcl-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 97: 1422-8.
- Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M., Creager, M. A. (2006) Advanced Glycation End Products Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation*, 114: 597-605
- Goldring, S. R. (2002) Bone and joint destruction in rheumatoid arthritis: what is really happening? *J. Rheumatol.*, 29. Suppl., 65: 44 -8.
- Griendling, K.K., Sorescu, D., Ushio-Fukai, M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.*, 86:494–501.
- Griendling, K.K., FitzGerald, G.A. (2003) Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*, 108:1912–6.
- Grossman, S., Wolfe, B. B., Yasuda, R. P., Wrathall, J. R. (1999) Alterations in AMPA receptor subunit expression after experimental spinal cord injury. *The journal of neuroscience*,19: 5711-5720.
- Gültekin D. (2005) Romatoid artritli hastalarda ACCP (Anti-Cyclic Cıtrullinated Peptide) düzeyleri., *Uzmanlık Tezi, İstanbul Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul*,69s

- GümüŖdiŖ, G. (2003) Bağ Dokusu Hastalıkları: Romatoid Artrit. GümüŖdiŖ G, DoęanavŖargil E (eds). Klinik Romatoloji El Kitabı, Güven Matbaası, İzmir, s209-227.
- Harel-Meir, M., Sherer, Y., Shoenfeld, Y. (2007) Tobacco smoking and autoimmune rheumatic diseases. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 3: 707-15.
- Haruna, Y., Morita, Y., Komai, N., Yada, T., Sakuta, T., Tomita, N., Fox, D.A., Kashihara, N. (2006) Endothelial Dysfunction in Rat Adjuvant-Induced Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 54: 1847–1855
- Hurd, E. R. (1979) Extraarticular manifestations of RA. *Semin. Arthritis Rheum.*, 8: 151-176
- Hurlimann, D., Forster, A., Noll, G. et al. (2002) Anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*, 106: 2184-87
- Inan, M. S., Razzaque, M. S., Taguchi, T. (2003) Pathological significance of renal expression of NF-kappa B. *Contrib. Nephrol.*, 139: 90–101.
- Kaplan, M. J., McCune, W. J. (2003) New evidence for vascular disease in patients with early rheumatoid arthritis. *Lancet*, 361: 1068-69.
- Karakia, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui Saito, M., Amano, K., Harada, K., Miyatoma, S., Nakazawa, H., Won, K., Sato, K. (1997) Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle. *Pharmacological Reviews*, 49: 2
- Kayaalp, O. S. (2012). Anti Hipertansif İlaçlar. *Tıbbi Farmakoloji. Cilt 1 Pelikan Kitapçılık. Ankara, s402*
- Kayaalp, O. S. (2012). Sempatometik İlaçlar. *Tıbbi Farmakoloji. Cilt 2. Pelikan Kitapçılık. Ankara, s1020*
- Kostenis, E., Milligan, G., Christopoulos, A., Sanchez-Ferrer, C. F., Heringer-Walther, S. (2005) G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*, 111: 1806-13.
- Kuralay, F., Çavdar, Z. (2006) İnflamatuar medyatörlere toplu bir bakıŖ, *Genel Tıp Derg.*, 16: 143-152
- Lapolla, A., Traldi, P., Fedele, D. (2005) Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin. Biochem.*, 38: 103-15.
- Lassegue, B., Clempus, R.E. (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 285: 277–97.

- Lemos, V. S., Silva, D. M., Walther, T., Alenina, N., Bader, M., Santos, R. A. (2005) The Endothelium-Dependent Vasodilator Effect of the Nonpeptide Ang (1-7) Mimic AVE 0991 Is Abolished in the Aorta of Mas-Knockout Mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 46: 274-9.
- Li, H. , Föstermann, U. (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. 190: 244-254.
- Lin, L., Park, S., Lakatta, E. G. (2009) RAGE signaling in inflammation and arterial aging *Front Biosci.*, 14: 1403–1413.
- Lovren, F., Triggle, C. (2000) Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. *Br. J. Pharmacol.*, 13:521–9.
- Luscher, T.F.(1991) Endothelium-derived nitric-oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *Eur. Heart J.*, 12: 2-11
- Martin, Al., Castellero, E., Granado, M., Lopez-Menduina, M., Villanua, M.A., Lopez-Calderon, A. (2008) Adipose tissue loss in adjuvant arthritis is associated with a decrease in lipogenesis, but not with an increase in lipolysis. *J. Endocrinol.*, 197: 111-9
- Marwan, H., Cristina, B. G., Mary, F. W., Ann, M. B., Joseph, L. and James, R. S. (2000) High Glucose-enhanced Acetylcholine Stimulated CGMP Masks Impaired Vascular Reactivity in Tail Arteries from Short-term Hyperglycemic Rats. *Int. J. Exp. Diabetes Res.*, 1: 69–79
- Menekşe, E. B., Cantürk, F., Alaylı, G. (2004) Romatoid Artritte Kardiyovasküler Tutulum. *Romatizma*, 19: 187-192
- Mercure, C., Yogi, A., Callera, G. E., Aranha, A. B., Bader, M., Ferreira, A. J., et al. (2008) Angiotensin (1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ.Res.*, 103: 1319-26.
- Meredith, I. T., Yeung, A. C., Weidinger, F. F., et al. (1993) Role of impaired endothelium-dependent vasodilation in ischemic manifestations of coronary artery disease. *Circulation*, 87: 56- 66.
- Metsios, G. S., Stavropoulos-Kalinoğlu A., et. al. (2010) Vascular Function and Inflammation in Rheumatoid Arthritis:the Role of Physical Activity. *Open Cardiovasc. Med. J.*, 4: 89-96.
- Meyer, O. (2001) Atherosclerosis and connective tissue diseases. *Joint Bone Spine*, 68: 564-75.
- Mikuls, T., Saag, G. K. (2001) Comorbidity in rheumatoid arthritis. In: O' Dell RJ, ed. *Rheum Dis Clin North Am.* Philadelphia: W.B. Saunders Company, 283-303.
- Moncada, S., Higgs, A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, 329 :2002-2012



- Moon, J. Y. (2011) ACE2 and Angiotensin (1-7) in Hypertensive Renal Disease. *Electrolyte Blood Pres.*, 9: 41-44.
- Mori, J., Zhang, L., Oudit, G.Y., Lopaschuk, G. D. (2013) Impact of the renin-angiotensin system on cardiac energy metabolism in heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 63: 98-106
- Mukai, Y., Shimokawa, H., Mataba, T., et al. (2001) Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease—a novel therapeutic target in hypertension. *The FASEB J.*, 00-0735: 1-19
- Nessar, A. (2005) Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 67: 3–21.
- Owen, C. A., Campbell, E. J. (1998) Angiotensin II generation at the cell surface of activated neutrophils: novel cathepsin G-mediated catalytic activity that is resistant to inhibition. *J. Immunol.*, 160: 1436–1443.
- Paleolog, M. E., Miotla, J. M. (1999) Angiogenesis in arthritis: role in disease pathogenesis and as a potential therapeutic target. Review, *Angiogenesis*, 2: 295-307.
- Parker, J. L., Adams, H. R. (1993) Selective inhibition of endothelium – dependent vasodilator capacity by Escherichia coli endotoxemia. *Circ. Res.*, 72: 539- 551.
- Parmaksız, İ. (2011) Advanced Glycation End-Products in Complications of Diabetes Mellitus. *Marmara Medikal Journal*, 24: 141- 148
- Peyroux, J., Sternberg, M. (2006) Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol. Biol. Paris*, 54: 405- 19.
- Portio, V., Minisola, G., Porzio, F. (1991) Extraarticular manifestations of RA. *Clin. Ther.*, 139: 233-236.
- Prevost, G., Fajardy, I., Fontaine, P., Danzep, M., Besmond, C. (1999) Human rage glycer dimorphism and hla class II drb1-dqa1-dqb1-haplotypes in type 1 diabetes. *European Journal of Immunogenetics*, 26: 343-348.
- Pullerits, R., Bokarewa, M., Dahlberg, L., Tarkowski, A. (2005) Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res. Ther.*, 7: 817-24.
- Pullerits, R., Brisslert, M., Jonsson, I.M., Tarkowski, A. (2006) Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via beta2 integrin mac-1. *Arthritis Rheum.*, 54: 3898-907
- Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., et al. (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nature Medicine*, 4: 814-821.

- Ratz, P.H., Berg, K.M., Urban, N.H., Miner, A.S. (2005) Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium sensitizing stimulus. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 288: 769–83.
- Rincon, D. I., Williams, K., Stern, P. M., et al. (2001) High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum.*, 44: 2737-2745.
- Rindfleisch, J. A., Muller, D. (2005) Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *American Family Physician*, 72: 1038-1047.
- Ross, M. H., Kaye, G. I., Pawlina, W. (2003) *Histology*. 4th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 96: 326-55.
- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Suzuki, Y., Rupe´rez, M., Egido, J. (2001) Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 10: 321-329.
- Ruiz-Ortega, M., Ruperez, M., Esteban, V., Rodriguez-Vita, J., Sanchez-Lopez, E., et al. (2006) Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant.*, 21: 16–20.
- Sakuta, T., Morita, Y., Satoh, M., Fox, D.A., Kashihara, N. (2010) Involvement of the Renin– Angiotensin System in the Development of Vascular Damage in a Rat Model of Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 62: 1319–1328
- Sampaio, W. O., dos Santos, R. A. S., et al. (2007) Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways. *Hypertension*, 49: 185- 92.
- Sandoo, A. (2010) Endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: the role of Inflammation and classical cardiovascular disease risk factors on the microvasculature and the macrovasculature. Ph. D. Thesis, University of Birmingham, 227s.
- Santos, R. A., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., Silva, D. M., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H. P., Speth, R., Walther, T. (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100: 8258-63.
- Santos, R. A., Ferreira, A. J. (2007) Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 16: 122-8.
- Santos, R. A., Ferreira, A. J., Simoes e Silva, A. C. (2008) Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp. Physiol.*, 93: 519-27.

- Santos, R. A., Anderson, J. F. and Silva, A. C. S. S. (2013) Recent advances in the angiotensin-converting enzyme<sup>2</sup>–angiotensin(1–7)–Mas axis, *Exp. Physiol.*, 93: 519–527
- Schmidt, A. M., Yan, S. D., Yan, S. F., et al. (2001) The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J. Clin. Invest.*, 108: 949-55.
- Schmieder, R. E. (2005) Mechanisms for the clinical benefits of angiotensin II receptor blockers. *Am. J. Hypertens.*, 18: 720-730.
- Schwab, M. E., Bartholdi, D. (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol. Rev.*, 2: 319-370.
- Singh, R., Barden, A., Mori, T., et al. (2001) Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia*, 44: 129- 46.
- Sokoloff, L. (1984) Animal models of rheumatoid Arthritis. *Int. Revi. Exp. Pathl.*, 26: 107-145.
- Stout, R. W. (1987) Aging and atherosclerosis. *Age*, 16: 65- 72.
- Suscheck, C. V., Schnorr, O., Kolb–Bachofen, V. (2004) The role of INOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage–promoting, protective, or active at all? *Curr. Mol. Med.*, 4: 763-775.
- Symons, D. P., Bankhead, C. R., Harrison, B. J., et al. (1997) Blood transfusion, smoking and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary carebased incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum.*, 40: 1955-1961.
- Tam, L.S., Shang, Q., Li, E.K., Wong, S., Li, R.J., Lee, K.L., Leung, Y.Y., Ying, K.Y., Yim, C.W., Kun, E.W., Leung, M.H., Li, M., Li, T.K., Zhu, T.Y., Chui, R.K., Tseung, L., Yu, S.L., Kuan, W.P., Yu, C.M. (2013) Serum soluble receptor for advanced glycation end products levels and aortic augmentation index in early rheumatoid arthritis-a prospective study. *Semin. Arthritis Rheum.*, 42:333-45.
- Tousoulis, D., Kampoli, A. M., Papageorgiou, C. T. N. and Stefanadis, C. (2012) The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function *Current Vascular Pharmacology*, 10: 4-18.
- Turesson, C., Jacobsson, L., Bergström, U. (1999) Extra-articular rheumatoid arthritis: Prevalance and mortality. *Rheumatology*, 38: 668-674.
- Turesson, C., Jacobsson, L., Ryden, A. A., Sturfelt, G., Wollmer, P., Lanne, T. (2005) Increased stiffness of the abdominal aorta in women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology. Oxford*, 44: 896-901.

- Urban, N.H., Berg, K.M., Ratz, P.H. (2003) K<sup>+</sup> depolarization induces RhoA kinase translocation to caveolae and Ca<sup>2+</sup> sensitization of arterial muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 285: 1377–85.
- Ülker, S., Önal, A., Bölükbaşı Hatip, F., et al. (2000) Effect of nabumetone treatment on vascular responses of the thoracic aorta in rat experimental arthritis. *Pharmacology*, 60: 136-42.
- Vanhoutte, P. M. (1988) The endothelium-modulator of vascular smooth-muscle tone. *N. Engl. J. Med.*, 319: 512-3.
- Voskuyl, A. E. (2006) The heart and cardiovascular manifestations in rheumatoid arthritis. *Rheumatology. Oxford*, 45: 4-7.
- Wallberg-Jonsson, S., Caidahl, K., Klintland, N., Nyberg, G., Rantapää-Dahlqvist, S. (2008) Increased arterial stiffness and indication of endothelial dysfunction in long-standing rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.*, 37: 1-5.
- Walsh, D. A., Suzuki T., Knock, G. A., Blake, D. R., Polak J. M. and Wharton, J. (1994) AT1 receptor characteristics of angiotensin analogue binding in humansynovium. *Br. J. Pharmacol.*, 112: 435-442
- Wang, L., Luo, D., Liao, X., He, J., Liu, C., Yang, C., Ma, H. (2013) Ang-(1-7) offers cytoprotection against ischemia-reperfusion injury by restoring intracellular calcium homeostasis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*
- Way, K. J., Katai, N., King, G. L. (2001) Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet Med.*, 18: 945-59.
- Web\_1(2008).Cardiovascular Physiology Cocepts.  
<http://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF011>
- Web\_2 (2013) Technology, Tarix Pharmaceuticals [ww.tarixpharma.com/technology/](http://ww.tarixpharma.com/technology/)
- Wilentz, J. R., Sanborn, T. A., Haudenschild, C. C., Valeri, C. R., Ryan, T. J., Faxon, D. P. (1987) Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to vascular injury. *Circulation*, 75: 636-42.
- Willem, V. E., Josee, P. A., Wagenaar, H., Marca, H. M. (2001) Adjuvant Arthritis in the Rat. *Current Protocols in Immunology Unit Number, Unit 15: 4*
- Yao, D., Taguchi, T., Matsumura, T., et al. (2007) High glucose increases angiotensin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A. *J. Biol. Chem.*, 282: 31038-45.
- Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O. and Wigler, M. (1986) Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains, *Cell* 45: 711–719.

## ÖZGEÇMİŞ

### ECZACI ÖZNUR AÇIKALIN

#### Biyografi

**Ad ve Soyad:** Öznur Açıkalin

**Doğum Tarihi ve Yeri:** 06.09.1977, Denizli

**Medeni Durumu:** Evli, 1 kız annesi

**Yabancı Dil:** İngilizce

**Adres:** Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Kınıklı  
Kampüsü 20070 Denizli Türkiye

**Tel:** 0258 296 1721 iş

0533 218 3037

**email:** oznursarica@hotmail.com

#### Eğitim:

Merkez Efendi İlkokulu Denizli	1983-1988
Merkez Ortaokulu Denizli	1988-1991
Denizli Lisesi Denizli	1991-1994
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Ankara	1994-1998
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fak.Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans	2009-

#### Mesleki İş Yaşamı:

1. Bağ -Kur İl Müdürlüğü Eczacı-Denizli	1998-2004
---	-----------

- |  |           |
|--|-----------|
| 2. Denizli Devlet Hastanesi Eczacı-Denizli | 2004-2005 |
| 3. Öznur Eczanesi-Eczacı- Denizli          | 2005-     |

### **Yayınlar:**

### **Posterler ve Bildiriler;**

1. Adjuvan Artritli Sıçan Modelinde, Ang 1-7'nin İzole Organ Banyosunda Torasik Aorta Yanıtlarına Etkisi, (2013) 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi Lara, Antalya, Poster Sunumu, P-156
2. Unilateral 6-Hidroksi Dopamin-Sustantia Nigra lezyonlu Sıçan Parkinson Hastalığı Modelinde Vareniklin'in Analjezik Etkisi (2013) 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi Lara, Antalya .Poster Sunumu, P-157

### **Ulusal ve Uluslararası Kongre ve Toplantılara Katılım:**

1. Türk Eczacılar Kongresi 19-21 Haziran 2003, İstanbul
2. Uluslararası Eczacılık Kongresi, 3-8 Eylül, 2009, İstanbul
3. 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi 19-22 Ekim 2011, Eskişehir
4. 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi 4-7 Kasım 2013, Lara, Antalya

### **Mesleki Eğitimler:**

1. Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi, Farmasötik Bakım, Hipertansiyon, Astım Eğitimi, 27-28 Ocak 2007, Denizli
2. Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi, Uygun Antibiyotik Kullanımı ve Klinik Eczacılık. 29 Haziran 2008, Denizli
3. Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi, Obezite Eğitimi, 20 Eylül 2008, Denizli
4. Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi, Ağrı Eğitimi, 21 Eylül 2008, Denizli
5. Farmakovijilans Meslek İçi Eğitim Programı, 15 Mart 2009, Denizli
6. Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi, Diyabet ve Koroner Arter Hastalıkları, 9-10 Mayıs 2009

7. Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi, Kozmetik / Dermakozmetik Eğitimi, 17-18 Nisan 2010
8. Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi. Romatizmal Hastalıklar Artrit Eğitimi, 15 Ekim 2011, Denizli
9. Sigara Bıraktırma Danışmanlığı Eğitimi, 23 Haziran 2011, Denizli
10. Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Dermatolojik Sorunlar ve İlaç Kullanımı, 8 Aralık 2012, Denizli

### **Bilimsel Dernek Üyelikleri**

Türk Eczacılar Birliği	1998-
Denizli Eczacılar Odası	1998-
EDAK Ecza Koop.	2005-
Denizli Eczacı Odası Yönetim Kurulu Üyesi	2008-2009