

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

**RESİSTİN UYARIMI İLE VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRELERİNİN
PROLİFERASYONU YOLAĞINDA PLC VE PKC'NİN ROLÜ**

Fatih UZUNER

Doktora Tezi

Antalya, 2016

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

**RESİSTİN UYARIMI İLE VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRELERİNİN
PROLİFERASYONU YOLAĞINDA PLC VE PKC’NİN ROLÜ**

Fatih UZUNER

Doktora Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No. 2013.03.0122.006)

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

Antalya, 2016

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Enstitü Kurulumuzun 22.06.2000 tarih ve 2/9 sayılı ilke kararına dayalı olarak, Üniversitemiz Senatosu'nun 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı ile onaylanan «Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için doktora çalışma alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği» ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (Orjinalleri ekte sunulmuştur.).


1- Öztürk, Oktay Hasan; Çetin, Arzu; Tokay, Alper; Uzuner, Fatih; Tanrıöver, Gamze; Yeşilkaya, Akin. PDGF-beta receptor and PKC have no effect on angiotensin II-induced JAK2 and STAT1 phosphorylation in vascular smooth muscle cells under high glucose condition. Journal of Receptors And Signal Transduction. Volume: 31 Issue: 5 Pages: 340-349 Published: OCT 2011


2- Tokay, Alper; Cetin, Arzu; Uzuner, Fatih; Yesilkaya, Akin. Observing better transfection efficiency in primary cultured VSMCs: Comparison and development of two different protocols. Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi Volume: 37 Issue: 1 Pages: 94-98 Published: 2012


3- Caglar, Serkan; Cetin, Arzu; Uzuner, Fatih; Tokay, Alper; Kirca, Mustafa; Yesilkaya, Akin. The role of AT1 receptor, Ras and NAD(P)H oxidase on p38 MAPK phosphorylation by angiotensin II stimulation in primary cultured vascular smooth muscle cells. Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi Volume: 37 Issue: 4 Pages: 407-416 Published: 2012


Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

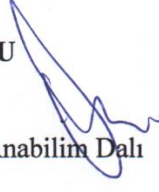
Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. 25/12/2015

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

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

Üye : **Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı 

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

Üye : **Prof. Dr. Gürsel BİBEROĞLU**
Gazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı 

ONAY:

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

Prof. Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapındaki ölümlerin en büyük nedenidir ve kardiyovasküler hastalıkların nedenleri çeşitlilik göstermesine rağmen, en sık görülen nedeni aterogenez ve sonrasında gelişen trombozudur. Endotelial disfonksiyon, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu ile karakterize patolojik bir süreç olan ateroskleroz, aterojenik lipoproteinlerin arter intimasında birikmesiyle gelişir.

Obezite ve diyabet, kardiyovasküler hastalıklar için iki önemli risk faktörüdür. Obezite üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda keşfedilen adipokinlerin tanımlanmasından beri adipoz doku endokrin bir organ olarak kabul edilmektedir. Son dönemlerde tespit edilen resistin proteininin endotelial disfonksiyon, vasküler disfonksiyon, kardiyak hipertrofi ve vasküler düz kas hücrelerinin migrasyonunu ve proliferasyonunu arttırmak suretiyle ateroskleroz gibi çeşitli patofizyolojik süreçlerde rol aldığı ortaya konulmuştur.

Resistin vasküler düz kas hücrelerinde migrasyona ve proliferasyona hangi sinyal yollarını kullanarak yol açtığının anlaşılması, anjiyogenezisi ve bunu takip eden patofizyolojik durumları önlemede önemli bir avantaj sağlayabilir.

Bu çalışmada, resistin ile inkübasyon sonrasında vasküler düz kas hücrelerinde, PLC ve PKC izoenzimlerinin aktivasyonu sonucu oluşan NADPH oksidaz kaynaklı süperoksit anyonu miktarı, p44/42 MAPK ve p38 MAPK fosforilasyonunun proliferasyon yolağındaki etkileri araştırıldı.

Elde ettiğimiz verilere göre, resistin ile uyarım sonrasında vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu yolağında, PKC izoenzimlerinin fosforilasyonunun ve diğer alt yolların aktivasyonunun PLC'nin aktivasyonuna bağlı olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, PLC'nin aktivasyonu sonrasında fosforile olan PKC izoenzimlerinin, p44/42 MAPK fosforilasyonu ve NADPH oksidaz enzim kompleksi üzerinden oluşan ROS aracılığıyla proliferasyonun gerçekleşmesinde önemli bir rolü olduğu düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Resistin, Vasküler düz kas hücresi, PLC, PKC, p44/42 MAPK, ROS

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVDs) are globally the leading cause of death and the underlying mechanisms vary on the diseases but mostly atherogenesis and developed thrombosis. Atherosclerosis which is characterized by endothelial dysfunction, vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and migration, is a pathological process and occurs as result of atherogenic lipoproteins accumulation in arterial intima.

Obesity and diabetes are two important risk factors for CVD. Since the adipokines are defined according to the results of the studies on obesity, adipose tissue is recognized as an endocrine organ. It has been suggested that newly discovered resistin plays an important role in various pathophysiological processes such as atherosclerosis by increasing endothelial dysfunction, vascular dysfunction, cardiac hypertrophy, migration and proliferation of VSMCs.

Understanding of which signal pathways are involved in effects of resistin on VSMCs proliferation and migration, might provide an important advantage in preventing angiogenesis and the following pathophysiological conditions.

In our study, we investigated the effects of the amount of NADPH oxidase-derived superoxide anion and phosphorylation of p44/42 MAPK and p38 MAPK resulted from PLC and PKC isoenzymes activation on proliferation pathway after incubation of resistin in VSMCs.

Our results suggested that after resistin incubation, phosphorylation of PKC isoenzymes and activation of the other downstream pathways are dependent on activation of PLC in the proliferation pathway of VSMCs. PKC isoenzymes which are phosphorylated after activation of PLC are considered to have an important role in the proliferation pathway by p44/42 MAPK and produced of superoxide anion via NADPH oxidase activity.

Key Words: Resistin, Vascular smooth muscle cell, PLC, PKC, p44/42 MAPK, ROS

TEŞEKKÜR

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

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Hayatımın her aşamasında desteklerini esirgemeyen sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Fatih UZUNER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİ	3
2.1. Adipoz Doku ve Resistin	3
2.1.1. Resistin	3
2.1.2. Resistin'in Terminolojisi	3
2.1.3. Resistin'in Yapısı	4
2.1.4. Resistin'in Üretim Yeri	5
2.1.5. Resistin'in İnflamasyon ve Sinyal Yolaklarındaki Rolü	5
2.1.6. Resistin, Süperoksit Anyonu ve NADPH Oksidaz İlişkisi	7
2.1.7. Resistin ve Kardiyovasküler Hastalıklar	8
MATERYAL VE METOD	10
3.1. Deney Modeli	10
3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar	10
3.1.2. Kullanılan Aktivatörler	10
3.1.3. Kullanılan İnhibitörler	10
3.2. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin Kültürü	11
3.2.1. Kullanılan Solüsyonlar	11
3.2.2. Medyum (Besi Yeri) Hazırlanması	12
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması (Tripsinizasyon)	12
3.2.4. Hücre Sayımı	12
3.3. PKC Fosforilasyonunun ELISA Yöntemi ile Ölçülmesi	12
3.3.1. Rat Fosfo-Protein Kinaz C ELISA Kit İçeriği	12
3.3.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	13
3.3.3. Deney Prosedürü	13
3.4. ERK1/ERK2 Fosforilasyonunun ELISA Yöntemi ile Ölçülmesi	13
3.4.1. Fosfo ERK1 (T202/Y20) / ERK2 (T185/Y187) İmmünoDeney Kiti İçeriği	13

3.4.2. Kit içeriğindeki Kimyasalların Hazırlanması	13
3.4.3. Örneklerin Hazırlanması	14
3.4.4. Deney Prosedürü	14
3.5. p38 MAPK Fosforilasyonunun ELISA Yöntemi ile Ölçülmesi	15
3.5.1. Hücre Tabanlı p38 MAPK (Thr180 – Tyr182) ELISA Kiti İçeriği	15
3.5.2. Kimyasalların Hazırlanması	15
3.5.3. Deney Prosedürü	15
3.6. Süperoksit Dismutaz ile İnhibe Olabilen Sitokrom C Redüksiyonu Yöntemi ile Süperoksit Anyonu Ölçümü	16
3.7. Protein Miktarının Tayini	17
3.7.1. Mikro Bisinkoninikasit (BCA) Deney Kitinin Prensibi	17
3.7.2. Numunelerin protein Miktar Tayini	17
3.8. VDKH'lerinde Hücre Proliferasyonlarının Ölçülmesi	17
3.8.1. WST-1 Deneyinin Prensibi	17
3.8.2. Deney Prosedürü	18
3.9. İstatistiksel Analizler	18
3.10. Materyal ve Kimyasal Malzemeler	18
3.11. Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler	19
BULGULAR	20
4.1. Resistin Uyarımı Sonrasında Vasküler Düz Kas Hücrelerinin Proliferasyonu	20
4.2. Resistin Uyarımı Sonrasında Vasküler Düz Kas Hücrelerinde PKC Fosforilasyonu	22
4.3. Resistin Uyarımı Sonrasında Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Oluşan Süperoksit Anyonu	23
4.4. Resistin Uyarımı Sonrasında Vasküler Düz Kas Hücrelerinde p44/42 MAPK Fosforilasyonu	25
4.5. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde p38 MAPK Fosforilasyonu	27
TARTIŞMA	30
SONUÇLAR	36
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMPK	:Adenozin monofosfat-aktive kinaz
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Dulbecco Modifiye Eagle Medyum)
ELISA	:Enzyme-linked immunosorbent assay (enzim bağılı immünosorbent ölçümü)
ERK	:Extracellular-signal-regulated kinase (ERK; hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz) veya MAPK
FBS	:Fetal bovine serum (fetal sığır serumu)
FIZZ	:Found in inflammatory zone (imflamatuvar alanda bulunan)
HBSS	:Hank's Balance Salt Solution (Hank'in dengeli tuz solüsyonu)
HUVECs	:Human umbilical venous endothelial cells (insan umbilikal ven endotel hücreleri)
IL 6	:İnterlökin 6
MAPK	:Mitogen-activated protein kinase (mitojen-aktive edici protein kinaz)
NADPH	:Nikotinamid adenin ainükleotid fosfat redükte
O₂⁻	:Süperoksit anyon radikali
PBMC	:Peripheral Blood Mononuclear Cells (Periferel kandaki mononükleer hücreler)
PBS	:Phosphate buffer saline (fosfat tamponu tuz solüsyonu)
PKC	:Protein kinaz C
PLC	:Fosfolipaz C
RELM	:Resistin like molecule (resistin benzeri molekül)
ROS	:Reactive oxygen species (reaktif oksijen türleri)
TNF-α	:Tumor necrosis factor alpha (tümör nekrozis faktör alfa)
VDKH	:Vasküler düz kas hücresi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Fare ve insan resistin'i arasındaki farklar [27].	5
2.2. Resistin'in hücre içi sinyal yolları üzerine olan etkisi [27].	7
4.1. Resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu.	21
4.2. PKC fosforilasyonu ölçüm sonuçları.	23
4.3. Resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinde oluşan süperoksit anyonu ölçüm sonuçları.	25
4.4. Resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinde p44/42 MAPK fosforilasyonu ölçüm sonuçları.	27
4.5. p38 MAPK fosforilasyonu ölçüm sonuçları.	29
5.1. Resistin uyarımı sonrasında proliferasyona giden hücre içi sinyal yolağı.	35

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Resistin benzeri moleküller gen ailesi üyelerinin terminolojisi [11].	4
4.1. Resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyon düzeylerine ait absorbands değerleri.	21
4.2. Resistin uyarımı sonrasında PKC fosforilasyonuna ait absorbands değerleri.	22
4.3. Resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinde oluşan süperoksit anyonu miktarlarına ait absorbands değerleri.	24
4.4. Resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinde p44/42 MAPK fosforilasyonuna ait absorbands değerleri.	26
4.5. p38 MAPK fosforilasyonuna ait absorbands değerleri.	28

GİRİŞ

Ateroskleroz, endotelial disfonksiyon ile birlikte vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu ile karakterize patolojik bir süreçtir [1]. Koroner ve periferik arter hastalıkları, iskemik inme ve konjestif kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklar dünya üzerindeki ölümlerin başlıca nedenidir. [2]. Tüm dünyada epidemik hale gelen kardiyovasküler hastalıkların en sık nedeni aterogenez ve buna eklenen trombozdur. Ateroskleroza genetik yatkınlık olmasına karşılık aterosklerozla ilişkili hiperlipidemi, hipertansiyon ve diyabetes mellitus (DM) çoğunlukla sonradan edinilir. Ateroskleroz kişinin beslenme ve yaşam standardına bağlı olarak önlenir [3]. Ateroskleroz arter intimasında plazmadan kaynaklanan aterojenik lipoprotein birikmesine karşı gelişen karmaşık bir inflamatuvar - fibroproliferatif yanıt olup, aortadan epikardiyal koroner arterlere kadar farklı büyüklükteki sistemik arterleri etkileyebilir [3].

Obezite ve diyabet kardiyovasküler hastalıklar için iki önemli risk faktörüdür. Tekrarlanan klinik gözlemlere rağmen obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar arasındaki moleküler bağlantı hala büyük ölçüde belirsizliğini korumaktadır [2]. Obezite üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda keşfedilen adipokinlerin tanımlanmasından beri adipoz doku endokrin bir organ olarak kabul edilmektedir [4].

Keşfedilen bu adipokinler arasında son dönemlerde tespit edilen resistin proteini üzerinde farklı araştırma gruplarının yapmış olduğu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda molekülün, endotelial disfonksiyon, vasküler disfonksiyon, kardiyak hipertrofi ve vasküler düz kas hücrelerinin migrasyonunu ve proliferasyonunu arttırmak suretiyle ateroskleroz gibi çeşitli patofizyolojik süreçlerde rol aldığı ortaya koyulmuştur [2, 4].

Jung ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, insan vasküler düz kas hücrelerinde (VDKH) ve insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (human umbilical venous endothelial cells: HUVECs) makrofajlar tarafından sekrete edilen resistin'in aterogeneze neden olabileceği bildirilmiştir [1].

Resistin'in ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinazlar 1/2 (Extracellular-signal-regulated kinase 1/2: ERK 1/2) ve fosfatidilinositol 3-kinaz yolağının aktivasyonu ile düz kas hücrelerinin proliferasyonunu desteklediği Calabro ve arkadaşları [5] tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir.

Chemaly ve arkadaşlarının [6] yaptıkları deneylerin sonucunda, resistin'in *in vivo* uzun süre artmış ekspresyonunun sıçanlarda miyokardiyal disfonksiyon ve yeniden düzenlenmeyle ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Ding ve arkadaşlarının [7] yapmış oldukları araştırmalar sonucunda, insan koroner düz kas hücrelerinin migrasyonunun resistin uyarımı sonrasında protein kinaz Cε (PKCε) tarafından düzenlenen matriks metalloproteinazlar ile olabileceği bildirilmiştir.

Ayrıca homosisteinin adipositlerden resistin ekspresyonunu ve sekresyonunu uyararak vasküler düz kas hücrelerinin migrasyonunu arttırdığı, Jiang ve arkadaşlarının [8] elde ettikleri veriler sonucunda ortaya konulmuştur.

Yukarıda bahsi geçen çalışmalarda ve bunlardan başka yapılan araştırmalarda resistin'in, *in vivo* ve/veya *in vitro* ortamlarda çeşitli hücre tiplerinde, hücre yapısının bozulmasına, proliferasyona ve migrasyona sebep olduğu ifade edilmiştir [1, 5-11].

Resistin'in, yukarıda belirtilen etkilerini gösterirken, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu da arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [12-14]. Hong ve arkadaşları [15] izole ettikleri henle kulbunun yukarı çıkan kalın kolunda yaptıkları fizyolojik testler sonunda, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) aktivasyonuna bağlı olarak ROS oluşumunun PKC α üzerinden gerçekleştiğini göstermişlerdir. Adenozin monofosfat-aktive kinaz'ın (AMPK) PKC'yi baskılayarak NADPH oksidaz üzerinden ROS oluşumunu inhibe ettiği Mugabo ve arkadaşları [16] tarafından gösterilmiştir. Ou ve arkadaşlarının [12] yapmış olduğu çalışmada, resistin'in, AMPK'nın fosforilasyonunu baskılayarak, PKC α üzerinden NADPH oksidaz aktivasyonu ile ROS oluşumunu desteklediği gösterilmiştir.

Resistin'in bu patofizyolojik durumlardan sorumlu tutulması, resistin'in vasküler düz kas hücreleri üzerindeki migrasyona ve proliferasyona neden olan etkilerini hangi hücre içi sinyal yollarını kullanarak gerçekleştirdiğinin tespit edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Bu yolların daha iyi anlaşılması anjiyogenezisi ve sonrasında gelişen patofizyolojik durumları önlemede önemli bir avantaj sağlayabilir.

Bizim amacımız, resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyon yolağında PLC ve/veya PKC'nin, mitojen-aktive edici protein kinaz (MAPK: mitogen-activated protein kinase) ailesinin aktivasyonu ve ROS üretimi üzerine olan etkilerini ortaya çıkarmaya çalışmaktır. Bu amaç doğrultusunda ileri sürdüğümüz hipotez, resistin ile muamele edilen vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonuna, MAPK ailesinin aktivasyonunu ve NADPH oksidaz üzerinden oluşan süperoksit anyonunu arttıran, PKC ve PLC aktivasyonu sebep olmaktadır.

GENEL BİLGİ

2.1. Adipoz Doku ve Resistin

Adipoz doku, son on yıl içerisinde endokrin bir organ olarak kabul edilmeye başlanmıştır. Leptin'in 1994 yılında keşfedilmesi ile adipositlerin biyolojisi, metabolik ve endokrin fonksiyonları, adipositlerden salınan ve adipositokinler olarak adlandırılan moleküllerin periferik metabolik etkileri yeni bir çalışma alanı olarak ortaya çıkmıştır. Şimdilerde obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların bu adipositokinlerden büyük ölçüde etkilendiği kabul edilmektedir. Dolayısıyla adipoz doku obezite ile ilişkili rahatsızlıkların patogenezinde doğrudan rol oynamaktadır. Bu sebepten adipositokinlerle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Leptin'in insanlar için bir anti-obezite hormonu olduğu kabul edilmiş ve yoğun bir şekilde incelenmiştir. Sonrasında keşfedilen resistin de yine adipositlerden salgılanmasına rağmen insanlardaki fonksiyonuyla ilişkili çok sayıda karşıt görüş vardır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde en tutarlı ve potansiyel etkisi en umut verici olan adipositokin, adiponektindir. Bununla birlikte adipoz dokudan köken alan, IL-6 ve TNF α gibi sitokinler ve biyolojisi tam olarak bilinmeyen birçok molekül vardır [17].

2.1.1. Resistin

Adipositlerden salgılanan, insülin duyarlılığı üzerine etkili, yeni bir faktör olarak resistin'in keşfi, adiposit-obezite-insülin direnci arasındaki ilişkinin açıklığa kavuşturulmasında yeni bir mekanizma olarak öne sürülmüştür. Bugüne kadar, resistin'in biyolojik etkileri ve regülasyonu hala tartışmalıdır ve insanlarda resistin'in insülin direncinin düzenleyicisi olarak bir rolü olduğu şüphelidir. Ancak yapılan çalışmalar, aterosklerozun da içinde bulunabileceği inflamatuvar süreçlerde resistin'in de bir rolü olduğuna dair kanıtları ortaya koymuştur [17].

2.1.2. Resistin'in Terminolojisi

Resistin molekülü, birbirine yakın tarihlerde bağımsız üç araştırma grubu tarafından farklı deneysel yaklaşımlar sonucunda;

- inflamatuvar bölgede bulunan genler ile ilgi çalışmada, inflamatuvar proteinlerin bir homoloğu olarak [18],
- tiyazolidindionların hedeflerinin tanımlanmasını amaçlayan bir çalışmada [19] ve
- mikro-dizi yöntemiyle adipoz dokudan salgılanan faktörleri tanımlayan bir çalışma sırasında keşfedilmiştir [11, 17].

Holcomb ve arkadaşlarının [18] çalışması sonrasında, resistin molekülü, araştırmacılar tarafından inflamatuvar bölgede bulunan yeni genler: FIZZ 1-3 (found in inflammatory zone: FIZZ 1-3) olarak isimlendirilmiştir. Araştırmacılar deneysel astım çalışması sırasında ekspresyonu artan yeni bir murin geni, Fizz1'i, keşfetmişlerdir. Nükleotid homoloji araştırması sonrasında araştırmacılar buna ilaveten iki fare geni (Fizz2 ve Fizz3) ve iki insan geni (FIZZ2 ve FIZZ3) tanımlamalarına rağmen resistin benzeri alfa olarak bilinen Fizz1 üzerinde yoğunlaşmaya devam etmişlerdir.

Holcomb ve arkadaşlarının raporundan kısa süre sonra Steppan ve arkadaşları [19] obezite ile diyabet arasındaki bağlantının resistin hormonu olduğunu söylemişlerdir. Steppan ve arkadaşları adiposit farklılaşması sırasında transkripsiyonu artan ve anti-diyabetik ilaçların bir sınıfı olan tiyazolidindionlar ile transkripsiyonu azalan genleri araştırırken fare resistin'ini keşfetmişlerdir. Bu çalışmada fare resistin'inin obezitede arttığı ve insülinin etkisini bozduğu bulunmuştur.

Bunlara ek olarak, iki ayrı araştırma grubu, Rajala ve arkadaşları [20] ve Kim ve arkadaşları [21], fare adipositlerinin farklılaşması sırasında uyarılan genler araştırırken resistin'i keşfetmişlerdir. Kim ve arkadaşları [21] resistin'i, adiposit-spesifik salgı faktörü (adipocyte-specific secretory factor: ADSF) olarak isimlendirmişlerdir.

Daha sonra Chumakov ve arkadaşlarının [23] yapmış olduğu çalışmalar sonrasında on-sistein proteini (ten-cysteine protein: Xcp1) olarak adlandırılan fakat Gerstmayer ve arkadaşları [22] tarafından daha önce resistin-benzeri gama (Retnlg) olarak tanımlanan gen, dördüncü üye olarak aileye katılmıştır.

Mevcut isimlendirmede resistin proteini tercih edilir ve geni "retn" ile ifade edilir. Fakat "ADSF" (adipocyte-specific secretory factor) ve "FIZZ3" (found in inflammatory zone) sinonim olarak kullanılır [17] (Tablo 2.1) [11].

Tablo 2.1. Resistin benzeri moleküller gen ailesi üyelerinin terminolojisi [11].

Resmi Adı	Resmi Gen sembolü	Diğer İsimleri
İnsan		
Resistin	RETN	XCP1, FIZZ3
Resistin benzeri Beta	RETNLB	XCP2, FIZZ2
Fare		
Resistin	Retn	Xcp4, Fizz3, ADSF
Resistin benzeri Alfa	Retnla	Xcp2, Fizz1
Resistin benzeri Beta	Retnlb	Xcp3, Fiz2
Resistin benzeri Gama	Retnlg	Xcp1

2.1.3. Resistin'in Yapısı

Resistin, resistin-benzeri moleküller ailesine dahil, 12.5 kDa ağırlığında, sisteince zengin bir proteindir. Resistin molekülü, 17 aminoasit içeren bir sinyal peptidi, 37 aminoasit içeren bir değişken bölge ve molekülün imza niteliğini oluşturan önemli bir C-terminali bölgesi olmak üzere, rat ve farelerde 114 aminoasitten oluşurken, insandaki resistin molekülü 108 aminoasitten oluşur [24, 25]. Resistin molekülünü kodlayan gen insanlarda kromozom 19, farelerde kromozom 8'de lokalizedir. Fare ve insan resistin'i, genomik DNA seviyesinde % 46.7, mRNA seviyesinde dizi homolojisi ile % 64.4 ve aminoasit seviyesinde % 59 oranında benzerlik göstermektedir [25, 26] (Şekil 2.1).

	Fare						İnsan	
Kromozom	8 A1; 8 0.37 cM						19p13.2	
Genomik organizasyon								
Fare	73	162	140	763	78	264	142	2279
	56,2%		59,7%		70,8%		70,9%	
		37,2%		41,6%		36,7%		
İnsan	36	195	128	376	78	320	236	
Amino asit sayısı	114						108	

Şekil 2.1. Fare ve insan resistin'i arasındaki farklar [27].

RELM- α (FIZZ 1) sekrete edilen bir proteindir. En yaygın bulunduğu yer adipoz dokulardır, ayrıca fare ve sıçanlarda (murine) allerjik pulmoner inflamasyonda inflamatuvar bölgede yer almaktadır [18]. RELM- β (FIZZ 2) sadece gastrointestinal sistemde goblet ve epitelial hücreler tarafından salgılanır ve tümörlerde belirgin şekilde eksprese olmaktadır, bu durum proliferasyonda olası bir rolü olduğunu düşündürmektedir [24]. RELM- γ , en yeni tanımlanmış RELM ailesi üyesidir. Hematopoietik dokularda bulunmakta ve sitokin benzeri fonksiyonu olduğu düşünülmektedir [22].

2.1.4. Resistin'in Üretim Yeri

Murine ve insan resistin'i, amino asit seviyesinde %50'den fazla benzerlik gösterse de ekspresyonları farklıdır [17]. Farelerde, adiposit farklılaşması ve yağ dokusu miktarı ile orantılı olarak beyaz adipoz dokuda eksprese olmaktadır [19]. Ayrıca hipofiz bezi, hipotalamus ve kan dolaşımında da bulunmaktadır [28]. Ratlarda sadece adipoz dokuda değil, adrenal bez, iskelet kası, pankreas ve dalakta da sekrete edilmektedir [29-31]. Farelere zıt olarak insanlarda adipositlerden olan ekspresyonu az miktarda gerçekleşmektedir [32-35]. İnsanlarda diğer dokulara kıyasla en fazla ekspresyon kemik iliğinde olmakta fakat plasentanın trofoblastik hücrelerinde, pankreasta, primer lösemi hücrelerinde, sinoviyal dokuda ve dolaşım kanında da bulunmaktadır [26, 30, 32, 36-41]. Beyaz adipoz dokularda resistin eksprese eden hücreler monosit ve makrofajlardır [34, 36, 42]. Bu bilgilere dayalı olarak, insan adipoz dokularındaki resistin varlığı daha yüksek olasılıkla adipoz dokusunun yağ olmayan stromal-vasküler fraksiyonu tarafından üretilmesiyle olmaktadır [27].

2.1.5. Resistin'in İnflamasyon ve Sinyal Yolaklarındaki Rolü

Resistin'in ilk başlarda insülin direncine neden olduğu bildirilse de, son dönemlerde resistin'in hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda proinflamatuvar bir durumu tetikleyebildiği gösterilmiştir [43].

Resistin patofizyolojisi ile ilgili birçok yeni çalışma olmasına rağmen, resistin'in inflamasyonda nasıl davrandığı ile ilgili az bilgi bulunmaktadır [27].

Resistin ekspresyonu monosit-makrofaj farklılaşması boyunca artmaktadır, bu durum resistin'in monosit-makrofaj farklılaşmasında rolü olduğunu göstermektedir [34, 36].

TNF- α , IL-1 β , IL-6 veya lipopolisakkarit (LPS) gibi proinflamatuvar araçların periferik kandaki mononükleer hücrelerde (peripheral blood mononuclear cells: PBMCs)

resistin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir, bu durum resistin'in inflamasyon sürecinde rolü olduğunu göstermektedir [43-46].

Ek olarak, C-reaktif proteini (C-reactive protein (CRP)), resistin'in hem mRNA ekspresyonunu hem de protein sekresyonunu doza ve zamana bağlı olarak PBMC hücrelerinde indüklemektedir [47].

Silswal ve arkadaşları hem insan hem de fare makrofajlarını insan rekombinant resistin molekülü ile inkübe etmişler ve proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-12'in üretiminde artış olduğunu bulmuşlardır. Bilim adamlarının gösterdiği gibi, bu durum bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B aracılığı ile olmaktadır [48].

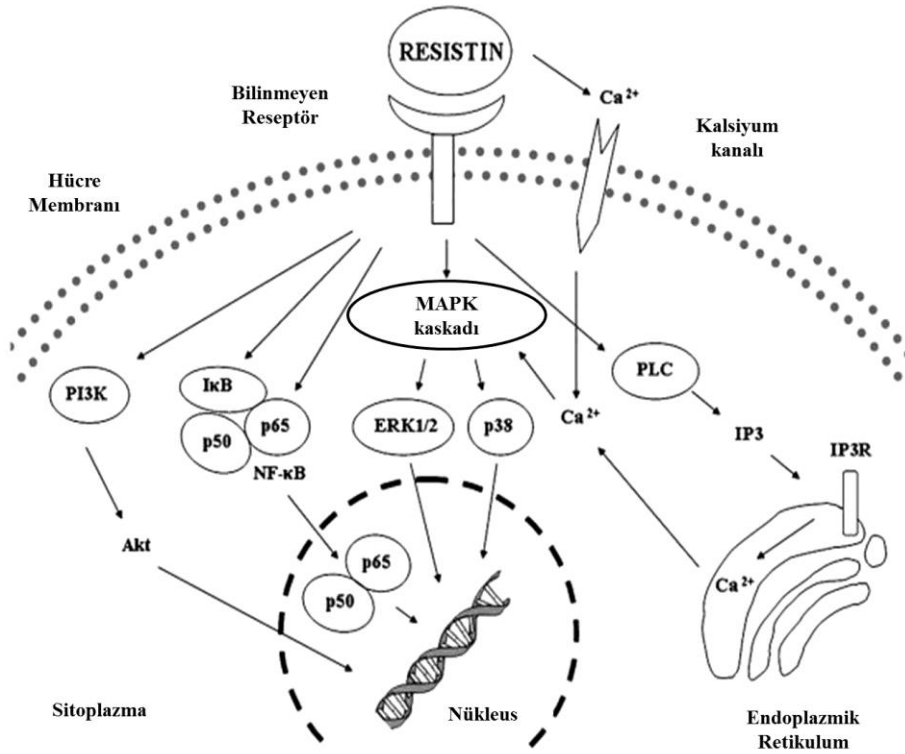
Resistin, PBMC'lerde doza bağımlı NF- κ B aktivitesini indüklemektedir. Bu durum NF- κ B'in hem p65 hem de p50 alt ünitelerinin sitoplazmadan nükleusa geçişi ile sonuçlanmaktadır [43]. Bu etki, inhibitör protein olan I κ B α ve NF- κ B'nin p65 alt ünitesinin resistin aracılı fosforilasyonu ile oluşmaktadır [47].

Resistin sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu, ekstrasellüler çevreden kalsiyum akımı ve fosfolipaz C (PLC) aktivasyonu ile arttırmaktadır, bu durum intrasellüler havuzdan kalsiyum salınımına neden olmaktadır [49].

Resistin insan adipositlerinde minimum düzeyde eksprese olmaktadır fakat bu hücreler resistin için hedef hücreler olabilirler. Nagaev ve arkadaşları resistin'in, PBMC'lerdeki etkisine benzer şekilde, proinflamatuvar sitokinler olan IL-6, IL-8 ve TNF- α ekspresyonunu beyaz adipoz doku vasıtasıyla (*in vitro* ortamda) uyarabildiğini göstermişlerdir [50].

Resistin insan adipositlerini hedef alır ve TNF- α 'ya benzer şekilde adipoz dokuda inflamatuvar süreçleri artırır. TNF- α 'ya zıt olarak, resistin adipoz spesifik belirteçlerin (CEBPA, FABP4 ve SLC2A4) baskılanmasını indüklememektedir. Bu durum, her ikisinin de NF- κ B'yi aktive etmesine karşın resistin'in intrasellüler sinyal yolağının TNF- α 'dan farklı olduğunu göstermektedir. Rekombinant insan resistin'inin NF- κ B'yi aktive ederek proinflamatuvar sitokin olan IL-8'in ve monosit kemoatraktant protein-1 (monocyte chemoattractant protein: MCP-1)'in üretimlerini arttırdığını göstermişlerdir [50].

Birçok hücre hattı kullanılarak Erk, p38 ve Akt gibi mitojen-aktive edici protein kinaz (MAPKs)'ların, resistin uyarımı sonrasında fosforile olduğu Şekil 2.2'de gösterilmiştir [5, 49, 51, 52].



Şekil 2.2. Resistin'in hücre içi sinyal yolları üzerine olan etkisi [27].

Jamaluddin ve arkadaşlarının 2011 yılında yayınlamış oldukları derlemede resistin'in vasküler disfonksiyona sebep olduğu belirtilmiştir [9]. Chemaly ve arkadaşları ve Kang ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan iki farklı *in vivo* çalışmada resistin'in kardiyak hipertrofiyi uyardığı gösterilmiştir [6, 10]. Jiang ve arkadaşlarının VDKH'lerinde gerçekleştirdikleri araştırmada resistin'in süreye ve konsantrasyona bağlı olarak vasküler düz kas hücrelerinde migrasyonu arttırdığı tespit edilmiştir [8]. Ding ve arkadaşlarının, bir *in vitro* çalışma sonucunda elde ettikleri verilere göre, rekombinant insan resistin'i ile muamele edilen insan vasküler düz kas hücrelerinde migrasyonun arttığı tespit edilmiş, resistin'in bu etkisini de PKCε aktivasyonu ile gerçekleştirdiği bulunmuştur [7]. Jung ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada resistin ile inkübe edilen insan VDKH'lerinin migrasyonunda artış olduğu tespit edilmiş ve bu durumun aterogeneze ve ateroskleroz oluşumuna sebep olabileceği bildirilmiştir [1].

2.1.6. Resistin, Süperoksit Anyonu ve NADPH Oksidaz İlişkisi

Ou ve arkadaşlarının *in vitro* çalışması sonucunda insan göbek ven endotel hücre kültüründe resistin uyarımı sonrasında NADPH oksidaz aktivitesindeki artışa bağlı olarak yükselen süperoksit anyonu miktarının endotel disfonksiyona sebep olarak ateroskleroza sebep olabileceği ileri sürülmüştür [12].

Shyu ve arkadaşlarının deneyleri sonucunda resistin'in vasküler düz kas hücrelerinde reaktif oksijen türlerini artırarak, migrasyon ve proliferasyonu uyarmak suretiyle aterogeneze sebep olabileceği belirtilmiştir. [53].

Manduteanu ve arkadaşlarının insan endotel hücreleri ile yapmış oldukları *in vitro* çalışmada, yüksek glukozlu kültür ortamında resistin ile inkübe edilen hücrelerde NADPH oksidaz aktivitesinin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) arttığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu durumun diyabetli hastalarda ateroskleroz riskini arttırabileceğini ifade etmektedirler [13].

Pirvulescu ve arkadaşlarının insan endotel hücreleri ile yaptıkları çalışmada da resistin ile muamele edilen hücrelerde NADPH oksidaz aktivitesinde ve hücre içi ROS üretiminde artış olduğunu saptamışlardır [14].

Fan ve arkadaşlarının elde ettikleri verilere göre, insan pulmoner arter düz kas hücrelerinde, resistin benzeri moleküller ailesinin bir üyesi olan hipoksi-uyarımlı mitojenik faktör (hypoxia-induced mitogenic factor HIF/FIZZ1/RELM α) uyarımı sonrasında hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonunda artış olduğu ve bu artışın da PLC-IP3 sinyal yolağı üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir [54].

2.1.7. Resistin ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Kan dolaşımındaki normal resistin seviyesi 10 – 20 ng/mL iken, resistin'in patolojik konsantrasyonu 20 – 100 ng/mL olarak tanımlanmıştır. Klinik olarak, artan vücut ağırlığı ile birlikte resistin seviyesinin obez ve diyabetik hastalarda arttığı ve bunun da kardiyovasküler hastalıklara sebep olabileceği ileri sürülmektedir [2].

Obesitenin kardiyovasküler komplikasyonları, spesifik olarak endotelial ve vasküler fonksiyon bozukluğu ile açıklanmaktadır [55]. Obesite, tip-2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklarla artan inflamatuvar mediyatörlerinden dolayı inflamatuvar bir durum olarak kabul edilmektedir [56, 57]. Son 20 yılda adipokinler üzerine yapılan çalışmalar obesite ve kardiyovasküler hastalıklar arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir [58].

Plazma resistin seviyesi TNF- α , soluble TNF- α reseptör-2 veya IL-6 gibi inflamasyon belirteçleri ile ilişkilidir. Resistin'in insanlarda CRP'den bağımsız olarak koroner aterosklerozde prediktif bir faktör olduğu gösterilmiştir [58-60]. Son zamanlarda resistin'in kardiyak hasarda kullanılan biyolojik belirteç seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ve miyokard iskemik hasarın derecesi için bir belirteç olabileceği öne sürülmektedir [61].

Resistin, kemirgenlerde genellikle adipoz dokudan köken almaktadır ve hiperresistinemi farelerde glukoz toleransını bozucu yönde bir etki göstermektedir. Hayvan modellerinin aksine, insanlarda resistin için majör kaynak adipositlerden ziyade immünokompetan hücreler gibi gözükmemektedir [36]. Resistin makrofajlarda intarsellüler, ateromlarda ekstrasellüler olarak bulunmaktadır [1].

Rae ve arkadaşları, 2006 yılında yapmış oldukları çalışma sonucunda elde ettikleri veriler ışığında, tip 2 diyabet hastalarında, resistin'in sadece arteriyel inflamasyona değil aynı zamanda makrofajlarda trigliserid ve kolesterol birikimine neden olarak aterogenez ve koroner kalp hastalığının belirgin şekilde hızlanmasına sebep olabileceğini belirtmişlerdir [62].

Resistin'in köpük hücre oluşumunu, SR-A ve CD36 çöpçü (scavenger) reseptörlerin up regülasyonu ve ters kolesterol taşıyıcı (reverse cholesterol transporter) ABCA1 (ATP -

binding cassette transporter A1)'ın down regülasyonu ile olabileceği, Lee ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma sonucunda iddia edilmiştir [63].

Son dönemlerde resistin'in endotelial disfonksiyon için bir aracı olduğu öne sürülmektedir ve endotelin (ET-1) salınımı aracılığı ile endotelial hücrelerin aktivasyonunu tetiklediği gösterilmiştir. Resistin, vasküler hücre adezyon molekülü (vascular cell adhesion molecule-1: VCAM-1), intraselüler adezyon molekülü (intercellular adhesion molecule-1: ICAM-1), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri (vascular endothelial growth factor receptors: VEGFR), matriks metaloproteinazlar (matrix metalloproteinases: MMPs) ve MCP-1 ekspresyonunu tetiklemektedir. Resistin ayrıca endotelial hücrelerdeki CD40 sinyal yolağı için inhibitör bir anahtar molekül olan TNF reseptör-ilişkili faktör 3 (TNF receptor-associated factor 3: TRAF3) ekspresyonunu azaltmaktadır [52, 64, 65]. Bu *in vitro* çalışma sonuçları fonksiyonel çalışmalar ile onaylanmıştır. Sonuçta resistin'in insan endotelial hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu tetiklediği ve kapiller benzeri tüp oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir [52, 66, 67]. Son dönemlerde rapor edildiği gibi, bu durum resistin ile aktive olan TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis: tümör nekrozis faktör benzeri apoptozisin zayıf uyarıcısı) ile sağlanabilir ve bu durum değişen nitrik oksit üretiminden bağımsız olmaktadır [66, 68]. Resistin ayrıca düz kas hücre proliferasyonuna da neden olmaktadır bundan dolayı artan restenoz insidansında kısmen payı olabilir [5].

Anjiogenesisiz, aterosklerotik plakların neden olduğu rüptür ve intra arteriyel tıkanmalar ile sonuçlanmaktadır [69]. Zıt olarak revaskularizasyon ve kolateral döngü iskemik kalp kası ve uzuvlarda meydana gelen bir olaydır ve terapötik bir hedef haline gelmektedir [70]. Ancak anjiogenik terapidaki başarısızlıkların nedeni endotelial bozukluktan dolayı büyüme faktörlerinin azalan etkinliği olabilir [71]. Resistin'in anjiogenesisi tetiklediği rapor edilmiş olsa da resistin aracılı endotel fonksiyon bozukluğu resistin'in anjiogenik etkisini bozabilir [52, 66]. Ayrıca resistin'in fare kardiyomiyositlerinde glukoz metabolizmasını bozduğu ve kardiyak iskemiye kötüye götürdüğü gösterilmiştir. Bu durum stimüle kardiyak TNF- α sekresyonundan ve miyokardiyal hasar belirteçlerinden kaynaklanabilir [67, 72]. Ayrıca kan damarlarının anormal oluşumu farklı patolojilere de neden olabilir (tümör, diyabetik retinopati, romatoid artrit veya sistemik lupus eritromatozis). Tüm bu veriler, resistin'in makrofajlarda kolesterol ve trigliserid birikimine, arteriyel inflamasyona, endotelial bozukluğa ve anjiogenesisize yol açtığını göstermektedir. Bu durum, hızlı bir aterogenez ve koroner kalp hastalığı gelişmesine neden olabilir. Ayrıca resistin'in koroner ateroskleroz için ve miyokardiyal iskemik bozukluk için bir belirteç olabileceği öne sürülmektedir. Resistin bu süreçlerin patofizyolojisinden sorumlu tutulduğundan beri, resistin'inin bloke edilmesi, anjiogenesisi önlemede önemli bir faktör olarak görülmektedir [27].

MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Modeli

Deneyisel çalışmalar, 250-350 g ağırlığındaki 12-14 haftalık 10 adet erkek wistar ratlardan izole edilen torasik aortalardan kültüre edilen, 7-14 kuşak primer vasküler düz kas hücre kültüründe yapıldı.

Çalışmada kullanılan resistin ve inhibitörlerin konsantrasyon ve uygulama süreleri referanslarda belirlendiği gibidir [5, 12, 64, 73-82].

Çalışmada, VDKH'lerinin proliferasyonu, PKC fosforilasyonu, NADPH oksidaz enzim kompleksi üzerinden oluşan süperoksit anyonu miktarı, p44/42 MAPK fosforilasyonu ve p38 MAPK fosforilasyonu ölçüldü. Ölçümler hiçbir aktivatör ve inhibitör ile inkübasyona bırakılmayan kontrol grubunda, resistin ile uyarılan ve inhibitörler ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücre gruplarında gerçekleştirildi.

3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar

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

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

3.1.2. Kullanılan Aktivatörler

Resistin: Toz halindeki 25 µg resistin 10 mL steril distile su içerisinde çözüldü (2500 ng/ml) ve 500 µL'lik alikatlara bölünüp -20 °C'ta saklandı. Kullanım esnasında 6 kuyucuklu plaklarda ve 96 kuyucuklu plaklarda serum içermeyen medyum ortamında final konsantrasyon 100 ng/mL olacak şekilde pipetlendi.

3.1.3. Kullanılan İnhibitörler

U73122: Toz halindeki 5 mg PLC inhibitörü 10,760 mL DMSO içerisinde çözüldü (1 mM) ve 100 µL alikatlara bölünüp -20 °C'ta saklandı. Kullanmadan önce 1mM, 100 µL'lik PLC inhibitörü üzerine 900 µL serum içermeyen medyum koyularak 10 kat dilüe edildi ve ara stok hazırlandı. Kullanım esnasında 6 kuyucuklu plaklarda ve 96 kuyucuklu plaklarda serum içermeyen medyum ortamında final konsantrasyon 5 µM olacak şekilde pipetlendi.

Ro 320432 hydrochloride (PKCα, βI, βII, γ, ε inhibitörü): Toz halindeki 1 mg inhibitör 8,18 mL DMSO içerisinde çözüldü (250 µM) ve 1 mL'lik alikatlara bölünüp -20° C'ta saklandı. Kullanmadan önce 250 µM, 1 mL'lik PKCα, βI, βII, γ,ε inhibitörü üzerine 4 mL serum içermeyen medyum koyularak 5 kat dilüe edildi ve ara stok hazırlandı. Kullanım

esnasında 6 kuyucuklu plaklarda ve 96 kuyucuklu plaklarda serum içermeyen medyum ortamında final konsantrasyon 3 µM olacak şekilde pipetlendi.

Rottlerin (PKCδ inhibitörü): Toz halindeki 10 mg PKCδ inhibitörü 19,36 mL DMSO içerisinde çözüldü (1 mM) ve 250 µL'lik alikvatlar halinde -20 °C'ta saklandı. Kullanmadan önce, 1 mM 250 µL'lik PKCδ inhibitörü üzerine 1 mL serum içermeyen medyum koyularak 5 kat dilüe edildi ve ara stok hazırlandı. Kullanım esnasında 6 kuyucuklu plaklarda ve 96 kuyucuklu plaklarda serum içermeyen medyum ortamında final konsantrasyon 1 µM olacak şekilde pipetlendi.

HBDDE (Selective PKCα and PKCγ inhibitor): Toz halindeki 1 mg PKCα ve PKCγ inhibitörü 2,956 mL DMSO içerisinde çözüldü (1 mM) ve 100 µL'lik alikvatlar halinde -20 °C'ta saklandı. Kullanım esnasında 6 kuyucuklu plaklarda ve 96 kuyucuklu plaklarda serum içermeyen medyum ortamında final konsantrasyon 10 µM olacak şekilde pipetlendi.

Difenileniyodonyum (DPI:NADPH oksidaz inhibitörü): Toz halindeki 10 mg NADPH oksidaz inhibitörü 15,9 mL DMSO içerisinde çözüldü (2 mM) ve 1 mL'lik alikvatlar halinde -20 °C'ta saklandı. Kullanmadan önce, 2 mM 1mL'lik NADPH oksidaz inhibitörü üzerine 3 mL serum içermeyen medyum koyularak 4 kat dilüe edildi ve ara stok hazırlandı. Kullanım esnasında 6 kuyucuklu plaklarda ve 96 kuyucuklu plaklarda serum içermeyen medyum ortamında final konsantrasyon 10 µM olacak şekilde pipetlendi.

PD098059 (p44/42 MAPK inhibitörü): Toz halindeki 5 mg p44/42 MAPK inhibitörü 18,665 mL DMSO içerisinde çözüldü (1 mM) ve 500 µL alikvatlara bölünüp -20 °C'ta saklandı. Kullanım esnasında 6 kuyucuklu plaklarda ve 96 kuyucuklu plaklarda serum içermeyen medyum ortamında final konsantrasyon 20 µM olacak şekilde pipetlendi.

SB203580 (p38 MAPK inhibitörü): Toz halindeki 5 mg p38 MAPK inhibitörü 13,2 mL DMSO içerisinde çözüldü (1mM) ve 500 µL alikvatlara bölünüp -20 °C'ta saklandı. Kullanım esnasında 6 kuyucuklu plaklarda ve 96 kuyucuklu plaklarda serum içermeyen medyum ortamında final konsantrasyon 10 µM olacak şekilde pipetlendi.

3.2. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin Kültürü

Deneyisel çalışmalar, daha önceden kültüre edilip sıvı nitrojen içerisinde dondurulup saklanan vasküler düz kas hücrelerinde yapılmıştır. Dondurularak sıvı nitrojen içerisinde saklanan 4 ve 5'inci kuşak vasküler düz kas hücrelerinin çözülmesi ile oluşturulan vasküler düz kas hücre kültürlerinde yeterli hücre sayısını elde etmek için hücreler 7. kuşağa kadar pasajlandı. Deneyde 7-14'ncü kuşaklar arasındaki primer vasküler düz kas hücre gurupları kullanıldı [83].

3.2.1. Kullanılan Solüsyonlar

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, dengeli tuz solüsyonu)

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

1X Tripsin-EDTA

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

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu

Solüsyon, 10,000 U penisilin, 10 mg streptomisin içermektedir.

3.2.2. Medyum (Besi Yeri) Hazırlanması

Besi yeri olarak Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kullanılır. Solüsyon 425 mL medyum üzerine 50 mL fetal bovine serum (FBS) (%10), 5 mL (%1 v/v) penisilin-streptomisin, L-glutamin 0,584 g/L olacak şekilde, 20 mL saf DMEM'de çözülerek hazırlanır. Solüsyon steril filtrelerden geçirilir ve her şişeye 10 mL konulur. Konsantrasyonu 25 mM olacak şekilde 5,9625 g Hepes tartılır ve 20 mL saf DMEM içinde çözülüp steril filtrelerden geçirilir. Her şişeye 20 mL konulur. Sonuçta toplam 500 mL'lik besiyerleri hazırlanır.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması (Tripsinizasyon)

Pasajlanacak olan hücrelerin bulunduğu kültür kabının medyumunu çekildi. Hücreler 37 °C'ye getirilmiş 5 mL HBSS ile 1 kez yıkandı. HBSS aspire edildi. 5 mL 1X tripsin-EDTA flaska konuldu ve 37 °C'lik etüvde 5 dakika inkübe edildi. Üzerine 5 mL medyum eklendi ve hafifçe çalkalandı. Steril pipet yardımıyla 10 mL'lik solüsyon 15 mL'lik plastik santrifüj tüpüne alındı. 1450 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve dipteki pellet 1 mL medyum ile süspansiyon edildi. Bölünecek flask sayısına göre her bir flaskta 9 mL medyum olacak şekilde medyum eklendi ve flasklara bölündü. Bölünen flaskların 24 saat sonra medyumları değiştirildi [83].

3.2.4. Hücre Sayımı

Hücre kabı içerisindeki hücreler tripsinize edildi ve sonrasında santrifüj edildikten sonra süpernatant ortamdaki hücreler uzaklaştırıldı. Hücre sayımı için dipte kalan pellet 1 mL medyum ile süspansiyon edildi. Süspansiyondan thoma lamına damlatıldı ve 5 farklı alan sayılıp toplandı. Toplam sayı 5'e bölündü ve çıkan değer 10^6 ile çarpılıp 1 mL'deki hücre sayısı hesaplandı. [83].

3.3. PKC Fosforilasyonunun ELISA Yöntemi ile Ölçülmesi

3.3.1. Rat Fosfo-Protein Kinaz C ELISA Kit İçeriği

96 kuyucuklu plaka
Enzim eşleniği: 10 mL
Standart A: 0 pg/ mL
Standart B: 50 pg/ mL
Standart C: 100 pg/ mL
Standart D: 250 pg/ mL
Standart E: 500 pg/ mL
Standart F: 1000 pg/ mL
Substrat A: 6 mL
Substrat B: 6 mL
Durdurma solüsyonu: 6 mL
Yıkama solüsyonu 100X: 10 mL
Dengeleyici solüsyon: 6 mL

3.3.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Düz kas hücreleri 6-kuyucuklu petrilere pasajlandı ve % 80 yoğunluğa gelinceye kadar rutin olarak beslendi. Yoğunluğu % 80'e gelen hücreler serum içermeyen DMEM ile bir kez yıkandı. Serum içermeyen 2 mL DMEM (pH 7,4) hücrelere eklendi ve 24 saat inkübe edildi. 6 kuyucuklu petrilere deneye uygun inhibitör ve aktivatörler ile belirli zaman periyotlarında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu bitirmek için buz üzerinde medyum hızlı bir şekilde aspire edildi. Hücreler 1 mL 1X PBS ile 2 kez yıkandı ve PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 200 µL soğuk lizis tamponu eklendi. Hücreler kuyucuklardan özel hücre kazıyıcısı yardımıyla kazındı ve plastik tüplere toplandı. Tüp içerisindeki hücreler ultrasonik homojenizatör ile 9000 rpm'de 10 saniye sonike edildi. Hücreler sonikasyon işleminden sonra santrifüjde +4 °C'de 12500 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. Tüp içerisindeki temiz süpernatant kısmı ELISA yöntemiyle PKC fosforilasyonunun ölçülmesi için kullanıldı.

3.3.3. Deney Prosedürü

Antikor ile kaplı kuyucuklar içerisine 50 µL standartlar ve hazırlanan örnekler koyuldu. Kontrol için özel olarak işaretlenmiş kuyucuğa 50 µL PBS (pH 7.0-7.2) ilave edildi. Kuyucukların üzerine 5 µL dengeleyici solüsyon eklendi ve iyice karıştırıldı. Sonrasında 100 µL enzim ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Plağın kapağı kapatılarak 37 °C'da 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar içerisinde yer alan inkübasyon karışımı çekildi ve tüm kuyucuklara 100X yıkama solüsyonunun 1:100 dilüe edilmesi ile elde edilen 1X yıkama solüsyonu konuldu ve tekrar çekildi. Yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı. Yıkama işlemi bittikten sonra plak ters çevrildi ve kurutma kağıdı üzerine vurarak kurutma işlemi gerçekleştirildi. Kontrol kuyucuğu da dahil tüm kuyucuklara 50 µL substrat A ve substrat B ilave edildi. Plakanın kapağı kapatılarak karanlık ortamda oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında her kuyucuğa 50 µL durdurucu solüsyon ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Plak, 96 kuyucuklu plak okuyucu spektrofotometre cihazında (Biotek Marka MicroQuant) 450 nm'de okutularak örneklerin absorpsiyon değerleri ölçüldü.

3.4. ERK1/ERK2 Fosforilasyonunun ELISA Yöntemi ile Ölçülmesi

3.4.1. Fosfo ERK1 (T202/Y20) / ERK2 (T185/Y187) İmmüno-deney Kiti İçeriği

96 kuyucuklu fosfo ERK1/ERK2 monoklonal antikor ile kaplı mikro plak
Fosfo-ERK1/ERK2 standart
Fosfo ERK1/ERK2 Tespit Edici Antikor
Lizis Tamponu 6
Konsantre Örnek Sulandırıcı 1(5X)
Konsantre Kimyasal Sulandırıcı 2 (10X)
Konsantre Yıkama Tamponu (25X)
Renklendirme Kimyasalı A 12.5 mL hidrojen peroksit
Renklendirme Kimyasalı B 12.5 mL kromoken (tetrametilbenzidin)
Streptavidin-HRP
Durdurucu Solüsyon

3.4.2. Kit içeriğindeki Kimyasalların Hazırlanması

Yıkama tamponu: Oda sıcaklığında oluşan kristallerin yok olması sağlandıktan sonra 20ml'lik konsantre yıkama tamponu distile su ile dilüe edilerek 500 mL'lik kullanıma hazır yıkama tamponu hazırlandı.

Örnek Sulandırıcı 1: 20 mL'lik konsantre örnek sulandırıcı 1 (5X), distile su ile dilüe edilerek 100ml'lik kullanıma hazır örnek sulandırıcı 1 hazırlandı.

Deney Sulandırıcı: Örnek sulandırıcı 1 içerisine 8 mL Lizis tamponu ilave edilerek, kullanıma hazır 48 mL'lik Deney sulandırıcı hazırlandı.

Kimyasal Sulandırıcı 2: 5 mL'lik konsantre kimyasal sulandırıcı (10X) distile su ile dilüe edilerek 50 mL'lik kullanıma hazır Kimyasal sulandırıcı 2 hazırlandı.

Fosfo ERK1/ERK2 Belirleyici Antikor: Fosfo ERK1/ERK2 belirleyici antikor 1.0 mL kimyasal sulandırıcı 2 ile sulandırılarak 6.0 µg/mL stok solüsyonu hazırlandı. Deney öncesinde hemen kullanmak için ise bu stok solüsyonu yine kimyasal sulandırıcı 2 ile dilüe edilerek 400ng/mL kullanıma hazır fosfo ERK1/ERK2 belirleyici antikor hazırlandı.

Streptavidin-HRP: Deney öncesinde hemen kullanım için kimyasal sulandırıcı 2 kullanılarak taze hazırlandı.

Substrat Solüsyonu: Renklendirici kimyasalı A ve B eşit miktarlarda karıştırılarak deney aşamasında 15 dakika içerisinde kullanıldı. Bu aşama karanlıkta gerçekleştirildi.

3.4.3. Örneklerin Hazırlanması

Düz kas hücreleri 6-kuyucuklu petrilere pasajlandı ve % 80 yoğunluğa gelinceye kadar rutin olarak beslendi. Yoğunluğu % 80'e gelen hücreler serum içermeyen DMEM ile bir kez yıkandı. Serum içermeyen 2 mL DMEM (pH 7,4) hücrelere eklendi ve 24 saat inkübe edildi. 6 kuyucuklu petrilere deneye uygun inhibitör ve aktivatörler ile belirli zaman periyotlarında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu bitirmek için buz üzerinde medyum hızlı bir şekilde aspire edildi. Hücreler 1 mL 1X PBS ile 2 kez yıkandı ve PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 200 µL soğuk lizis tamponu eklendi. Hücreler kuyucuklardan özel hücre kazıyıcısı yardımıyla kazındı ve plastik tüplere toplandı. Tüp içerisindeki hücreler ultrasonik homojenizatör ile 9000 rpm'de 10 saniye sonike edildi. Hücreler sonikasyon işleminden sonra santrifüjde +4 °C'de 12500 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. Tüp içerisindeki temiz süpernatant kısmı ELISA yöntemiyle ERK1/ERK2 fosforilasyonunun ölçülmesi için kullanıldı.

3.4.4. Deney Prosedürü

Fosfo ERK1/ERK2 ile kaplanmış olan 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 100 µL standart ve numune ilave edildi. Deney sulandırıcı kimyasalı sıfır standardı olarak kullanıldı. Plak kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Her kuyucuk içerisindeki sıvılar uzaklaştırıldı ve yıkama tamponu (400 µL) kullanılarak kuyucuklar 3 defa yıkandı. Yıkama işleminden sonra plak ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerine vurularak kurutuldu. Kuyucuklar üzerine 100 µL dilüe fosfo ERK1/ERK2 tespit edici antikor ilave edildi. Plak kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 3 defa yıkama işlemi gerçekleştirildi. Her kuyucuğa taze hazırlanan streptavidin-HRP'den 100 µL koyuldu ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 3 defa yıkama işlemi gerçekleştirildi. Taze hazırlanan Substrat solüsyonundan her kuyucuğa 100 µL koyuldu ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her kuyucuğa 50 µL durdurucu solüsyon koyuldu ve nazikçe karıştırıldı. Plak, 96 kuyucuklu plak okuyucu spektrofotometre

cihazında (Biotek Marka MicroQuant) 450 nm’de okutularak örneklerin absorbands değerleri ölçüldü.

3.5. p38 MAPK Fosforilasyonunun ELISA Yöntemi ile Ölçülmesi

3.5.1. Hücre Tabanlı p38 MAPK (Thr180 – Tyr182) ELISA Kiti İçeriği

96 kuyucuklu plak

Konsantre yıkama tamponu A (20X)

Konsantre yıkama tamponu B (20X)

Fiksasyon solüsyonu

Konsantre söndürme (quenching) tamponu

Bloklama solüsyonu (5X)

Konsantre fare anti fosfo p38 MAPK (tirozin180 – tirozin182) antikoru

Konsantre fare anti p38 MAPK antikoru

Konsantre anti-fare IgG

TMB (3,3', 5,5'-tetra metil benzidin) tek basamaklı substrat kimyasalı

Durdurucu solüsyon

3.5.2. Kimyasalların Hazırlanması

Yıkama tamponu: Konsantre yıkama tamponu A ve B distile su ile 20 kat seyreltilerek 1X yıkama tamponları hazırlandı. Kristal oluşumu oda sıcaklığında bekletilerek engellendi.

Konsantre söndürme (quenching) tamponu: 1X yıkama tamponu A ile 30 kat sulandırılarak kullanmadan önce hazırlandı.

Bloklama solüsyonu (5X): Distile su ile 5 kat sulandırıldı ve 1X bloklama solüsyonu elde edildi..

Konsantre fare anti fosfo p38 MAPK (tirozin180 – tirozin182) antikoru: 1X Bloklama solüsyonu ile 1000 kat sulandırıldı. Kullanılmadan önce karıştırıldı.

Konsantre fare anti p38 MAPK antikoru: 1X Bloklama solüsyonu ile 1000 kat sulandırıldı. Kullanılmadan önce karıştırıldı.

Konsantre anti-fare IgG. 1X Bloklama solüsyonu ile 1000 kat sulandırıldı. Kullanılmadan önce karıştırıldı.

3.5.3. Deney Prosedürü

Her kuyucuğa 3000 hücre ekildi ve % 5’lik CO₂ ’li etüvde 37 °C’da gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında aktivatör ve inhibitörler uygulandı. Kültür medyumunu uzaklaştırıldı ve her defasında 200 µL 1X yıkama tamponu A kullanılarak 3 defa yıkama işlemi yapıldı. Yıkama tamponu plak ters çevrilip sallanarak iyice uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100 µL fiksasyon solüsyonu koyuldu ve oda sıcaklığında çalkalanarak 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 200 µL 1X yıkama tamponu A ile 3 defa yıkama işlemi gerçekleştirildi ve plak ters çevrilip sallanarak yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 200 µL 1X söndürme tamponu koyuldu ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 200 µL 1X yıkama tamponu A ile 4 defa yıkama işlemi gerçekleştirildi ve plak ters çevrilip sallanarak yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Kuyucuklara

200 µL bloklama tamponu koyuldu ve 37 °C'da 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 200 µL 1X yıkama tamponu B ile 3 defa yıkama işlemi gerçekleştirildi ve plak ters çevrilip sallanarak yıkama tamponu uzaklaştırıldı. İlgili kuyucuklara 50 µl 1X anti-fosfo p38 MAPK ve 1X anti-p38 MAPK koyuldu ve oda sıcaklığında çalkalanarak 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 200 µL 1X yıkama tamponu B ile 4 defa yıkama işlemi gerçekleştirildi ve plak ters çevrilip sallanarak yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 50 µL 1X IgG koyuldu ve 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 200 µL 1X yıkama tamponu B ile 4 defa yıkama işlemi gerçekleştirildi ve plak ters çevrilip sallanarak yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100 µL TMB eklendi ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklendi ve hemen 96 kuyucuklu plak okuyucu spektrofotometre cihazında (Biotek Marka MicroQuant) 450 nm'de okutularak örneklerin absorbans değerleri ölçüldü.

3.6. Süperoksit Dismutaz ile İnhibe Olabilen Sitokrom C Redüksiyonu Yöntemi ile Süperoksit Anyonu Ölçümü

Süperoksit anyonu miktarlarının Sitokrom C redüksiyonu ile ölçümü Görlach ve arkadaşlarının [84] metoduna göre yapıldı.

HEPES modifiye Tyrode's Solüsyonu

HEPES modifiye Tyrode's solüsyonu hazırlamak için, 1,8 mM, CaCl₂. 2 H₂O, 2,6 mM KCl, 137 mM NaCl, 0,36 mM NaH₂PO₄, 0,49 mM MgCl₂, 5,6 mM glukoz ve 10 mmol/L HEPES tartılarak, her biri 50 mL distile suda çözüldü. Çözeltiler 1 hafta +4 °C'de saklandı. Deney sırasında gereken hacmi elde etmek için aynı hacimde karıştırılarak pH:7,4'e ayarlandı.

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Toz halindeki 15000 U SOD, 1 mL 0.1 M pH: 7.5 KH₂PO₄-K₂HPO₄ tamponu içinde çözüldü. 50 µL'lik alikotlar halinde -20 °C'de saklandı. Deneyde, ortamdaki final konsantrasyonu 150 U/mL olacak şekilde kullanıldı.

Sitokrom C

Deneyde ortamında, final konsantrasyonu 80 µM kullanılmak üzere gereken miktar tartılarak distile su içinde çözüldü ve 8×10^{-3} M sitokrom C stoğu hazırlandı. Stok, 500 µL'lik alikotlar halinde -20 °C'de saklandı.

Deney Prosedürü

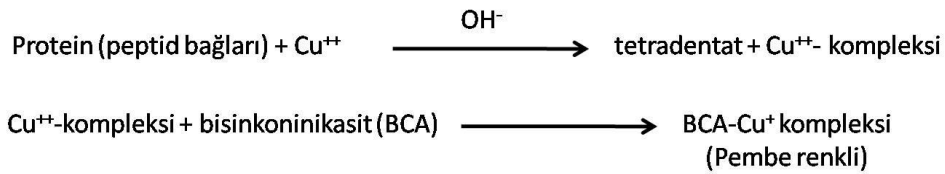
6 kuyucuklu plaklarda büyütülen hücreler 24 saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tüm kuyucuklar 37 °C'ye ısıtılmış HEPES modifiye Tyrode's ile 2-3 kez yıkandı. Ardından SOD bulunması gereken ve bulunmaması gereken kuyucuklar belirlenerek kuyucuklara HEPES modifiye Tyrode's solüsyonu ve SOD eklenerek final hacim 2 mL olacak şekilde pipetleme yapıldı ve 10 dakika 37 °C'da inkübasyona bırakıldı. Uygulama sonrasında, inhibitörler uygun konsantrasyonlarında ortama eklendi ve inkübasyon sürelerinin dolması için 37 °C'de bekletildi. Kuyucuklara resistin ilavesinin hemen sonrasında sitokrom C'nin ışıkta redüksiyonunu engellemek amacıyla karanlık ortamda tüm kuyucuklara final konsantrasyonu 80 µM olacak şekilde sitokrom C pipetlendi ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücre kültürü plakları buz üzerine alınarak reaksiyon sonlandırıldı. En kısa sürede tüm kuyucuklardaki solüsyonların 550 nm dalga boyundaki absorbans verileri alındı. Bundan sonra okumalar köre karşı yapıldı. Süperoksit-spesifik sitokrom C

indirgenmesi, SOD'la inkübe edilen ve SOD'la inkübe edilmeyen kuyucukların absorbans ölçümleri arasındaki farktan hesaplandı. Her kuyucuğun protein miktarlarının ölçümü için plaklar, ölçümden hemen sonra buz üzerinde bekletilerek protein ölçümü yapıldı. Çıkan protein miktarlarına göre veriler düzeltilerek süperoksit anyonu üretimi Abs μg protein/mL cinsinden gösterildi [83].

3.7. Protein Miktarının Tayini

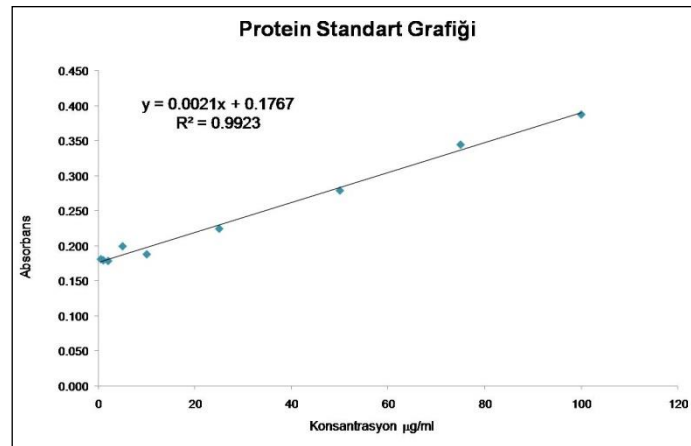
3.7.1. Mikro Bisinkoninikasit (BCA) Deney Kitinin Prensibi

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



3.7.2. Numunelerin protein Miktar Tayini

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



Şekil 3.1. Protein standart grafiği

3.8. VDKH'lerinde Hücre Proliferasyonlarının Ölçülmesi

3.8.1. WST-1 Deneyinin Prensibi

VDKH'lerinde uygulanan inhibitör ve aktivatörlere cevap olarak değişen hücre proliferasyonlarının saptanması için WST-1 ile ölçümler yapıldı. Deneyin prensibi, bir

tetrazolyum tuzu olan WST-1'in [2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4 disülfofenil)-2H tetrazolyum], elektron taşıyıcı reaktif içerisinde mitokondriyal süksinat tetrazolium redüktaz sistem varlığında koyu kırmızı renkli formazana indirgenmesi esasına dayanır. Canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri üzerine kurulu bir sistem olduğu için formazandan dolayı oluşan koyu kırmızı renk canlı hücre sayısıyla doğru orantılıdır. Oluşan kırmızı rengin yoğunluğu 440 nm'de (referans dalga boyu 600 nm) spektrofotometrede ölçülür. Nonradyoaktif olan WST-1 deneyi, hücre proliferasyonu ve sitotoksitesi deneylerinde canlı hücrelerin sayısının tayin edilmesine izin veren hassas kolorimetrik bir ölçüm yöntemidir.

3.8.2. Deney Prosedürü

Vasküler düz kas hücreleri 75 cm²'lik flasklarda % 95 doluluğa ulaştıktan sonra 1X tripsin-EDTA solüsyonu ile hücreler yapıştıkları yüzeyden kaldırıldıktan sonra ortama büyüme medyumu eklenerek tripsin-EDTA'nın etkisi baskılandı. Deney tüpü içerisinde toplanan hücreler 1450 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve pellet büyüme medyumu ile resüspanse edildi. Medyumla resüspanse edilen hücreler deney tüpü içerisinde homojen bir dağılım göstermesi için pipetaj yapılarak karıştırıldı. Hücre sayımı yapılarak, 96 kuyucuklu plağa her kuyucuğa 2500 hücre düşecek şekilde ekim yapıldı. Hücre ekimi yapılan plak % 5 CO₂ ihtiva eden 37°C'taki etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki medyum çekildi ve kuyucuklara 200 µL serum içermeyen medyum koyuldu ve yine aynı şekilde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sona erdiğinde ilgili kuyucuklara aktivatör ve inhibitörler pipetlenerek 96 kuyucuklu plak tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sona erdiğinde kuyucuklar içerisindeki medyumlar çekilerek her kuyucuğa yeniden 100µL serum içermeyen medyum koyuldu ve üzerlerine 10 µL WST-1 çözeltisi eklenerek nazikçe çalkalandıktan sonra 37°C'ta 4 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan kırmızı rengin yoğunluğu 440 nm'de (referans dalga boyu 600 nm) 96 kuyucuklu plak okuyucu spektrofotometre cihazında ölçüldü.

3.9. İstatistiksel Analizler

Tüm sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi. Vasküler düz kas hücrelerinde PKC fosforilasyonu, p44/42 MAPK fosforilasyonu, p38 MAPK fosforilasyonu, NADPH oksidaz enzim kompleksi üzerinden oluşan süperoksit anyonu ve hücre proliferasyonu ölçümlerinde gruplar arasındaki farklılıkların tespiti için varyans analizi (Anova), farklı bulunan değişkenlerde farklılığa sebep olan grubun belirlenmesi amacıyla Sidak (Post Hoc) testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 21.0 paket programı ile yapıldı. Tüm analizler için anlamlılık seviyesi p < 0,05 olarak belirlenmiştir.

3.10. Materyal ve Kimyasal Malzemeler

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS), fetal bovine serum, L-glutamin, penisilin-streptomisin, dimetil sülfoksit (DMSO), sitokrom C, superoksit dismutaz ve tripsin-EDTA (etilen diamin tetraasetik asit) Sigma'dan satın alınmıştır.

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

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

Hücre kültüründe aktivatör olarak kullanılan Resistin ve inhibitör olarak kullanılan, Rottlerin (PKC δ inhibitörü), Difenileniyodoniyum (DPI:NADPH oksidaz inhibitörü) Sigma'dan, U73122 (PLC inhibitörü) ve HBDDE (Selective PKC α and PKC γ inhibitor) Abcam'den, Ro 320432 hydrochloride (PKC ϵ inhibitörü) Tocris Bioscience'dan, SB203580 (p38 MAPK inhibitörü) ve PD098059 (p44/42 MAPK inhibitörü) Cell Signaling'den satın alınmıştır.

Protein ölçümleri için Pierce marka micro protein deney kiti kullanılmıştır.

Cell Proliferation Reagent WST-1 ROCHE firmasından satın alınmıştır.

Phospho ERK 1 / 2 ELISA Kit R&D Systems firmasından satın alınmıştır.

P-PKC (Phospho protein kinase C) ELISA Kit MyBioSource firmasından satın alınmıştır.

p38 MAPK (Thr180/Tyr182) ELISA Kit RayBiotech firmasından satın alınmıştır.

3.11. Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler

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

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

Primer hücre kültürü işlemleri, protein ölçümleri, süperoksit anyonu ölçümleri, ELISA ölçümleri ve proliferasyon, Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapıldı.

BULGULAR

4.1. Resistin Uyarımı Sonrasında Vasküler Düz Kas Hücrelerinin Proliferasyonu

Kültür ortamındaki vasküler düz kas hücrelerinin, resistin ve inhibitörle birlikte resistin inkübasyonu sonrasında proliferasyonlarındaki değişim, herhangi bir uyarıya maruz bırakılmayan kontrol grubu ile kıyaslandı.

Vasküler düz kas hücrelerinin 100 ng/mL resistin ile 24 saat [5] inkübasyonu sonrasında proliferasyonundaki artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tesbit edilmiştir.

PLC inhibitörü olan U 73122 (5 μ M, 30 dakika; [73]) ile inkübasyon sonrasında resistin uyarımına maruz bırakılan düz kas hücrelerinin proliferasyonundaki değişimin kontrol grubu seviyelerinde olduğu belirlenmiştir.

Düz kas hücrelerinin PKC α , β I, β II, γ , ϵ inhibitörü Ro 320432 (3 μ M, 30 dakika; [77]) ile inkübasyonu sonrasında resistin ile uyarımı neticesinde proliferasyondaki değişimin kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı görülmüştür.

PKC δ inhibitörü olan Rottlerin (1 μ M, 30 dakika; [73]) ile inkübasyonun ardından 24 saat resistin ile uyarılan VDKH'lerinde proliferasyon seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

Vasküler düz kas hücrelerinin, PKC α , γ inhibitörü olan HBDDE (10 μ M, 30 dakika; [79]) ile inkübasyonunu takiben resistin ile inkübasyona bırakılması neticesinde proliferasyondaki değişimin kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

NADPH oksidaz inhibitörü olan DPI (10 μ M, 30 dakika; [12, 80]) ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan VDKH'lerinde proliferasyon seviyesinin kontrol grubu seviyesine yakın olduğu, proliferasyondaki değişimin anlamlı olmadığı görülmüştür.

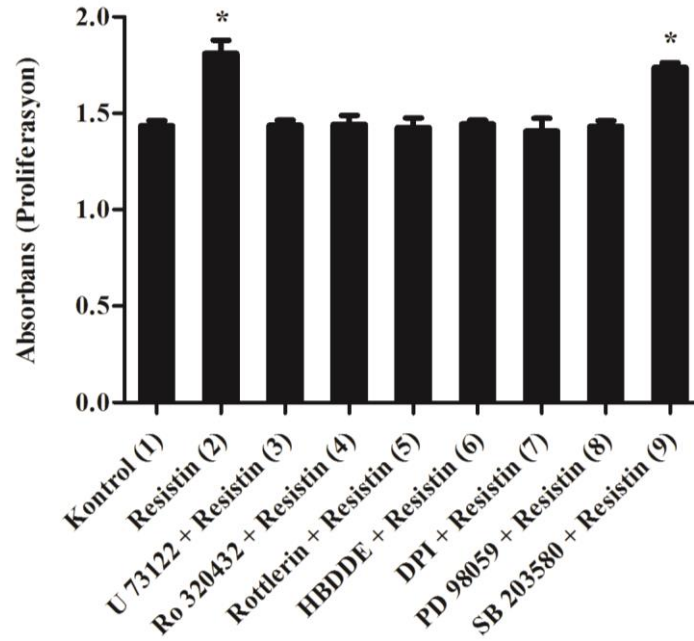
Düz kas hücrelerinin, p44/42 MAPK inhibitörü olan PD 98059 (20 μ M, 30 dakika; [77, 82]) inkübasyonunu takiben resistin ile uyarımı neticesinde proliferasyondaki değişimin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Vasküler düz kas hücrelerinin, p38 MAPK inhibitörü olan SB 203580 (10 μ M, 30 dakika; [5, 85]) ile inkübasyonunun ardından 24 saat resistin ile uyarımı sonucunda proliferasyondaki artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tesbit edilmiştir.

Vasküler düz kas hücrelerinin WST-1 kiti ile ölçülen proliferasyon düzeylerine ait absorbans değerleri Tablo 4.1'de, tabloya ilişkin bar grafiği ise Şekil 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyon düzeylerine ait absorban değerleri. Veriler, ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

Gruplar	n	Ortalama \pm S.D.	F	p	post hoc
Kontrol (1)	10	1,4355 \pm 0,0264	123,32	0,01	2, 9 > 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8,
Resistin (2)	10	1,8108 \pm 0,0691			
U 73122 + Resistin (3)	10	1,4383 \pm 0,0251			
RO 320432 + Resistin (4)	10	1,4431 \pm 0,0461			
Rottlerin + Resistin (5)	10	1,4259 \pm 0,0504			
HBDDE + Resistin (6)	10	1,4444 \pm 0,0201			
DPI + Resistin (7)	10	1,4081 \pm 0,0653			
PD 98059 + Resistin (8)	10	1,4319 \pm 0,0292			
SB 203580 + Resistin (9)	10	1,7377 \pm 0,0249			



Şekil 4 1. Resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu. (1) Herhangi bir aktivatör ve/veya inhibitör ile inkübasyona bırakılmayan grup. (2) Vasküler düz kas hücrelerinin resistin ile inkübasyonu sonrasında kontrol grubuna göre proliferasyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır. (3) PLC inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerin proliferasyonundaki değişimin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. (4) PKC α , β I, BII, γ , ϵ inhibitörü Ro 320432 ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerin proliferasyonundaki değişim kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. (5) PKC δ inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan düz kas hücrelerinin proliferasyonundaki değişim kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. (6) PKC α , γ inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerde, proliferasyon değişimi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. (7) NADPH oksiaz inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerin proliferasyonundaki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir. (8) P44/42 MAPK inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerin proliferasyonundaki değişim kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. (9) p38 MAPK inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerde ölçülen proliferasyon değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı dercede yüksek bulunmuştur. *: p<0,05.

4.2. Resistin Uyarımı Sonrasında Vasküler Düz Kas Hücrelerinde PKC Fosforilasyonu

Vasküler düz kas hücrelerinde, resistin ve inhibitör sonrasında resistin ile inkübasyon sonucunda gözlenen PKC fosforilasyonu, herhangi bir uyarıma maruz bırakılmayan kontrol grubuna karşı değerlendirildi.

Vasküler düz kas hücrelerinin resistin (100 ng/mL, 15 dakika [5, 64]) ile uyarımı sonrasında PKC fosforilasyonundaki artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

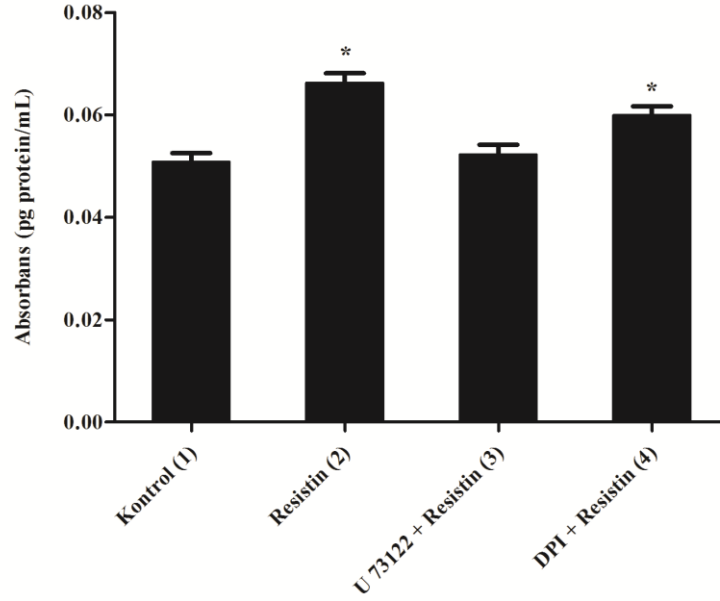
PLC inhibitörü U 73122 (5 µM, 30 dakika; [73]) ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan düz kas hücrelerinde PKC fosforilasyonunun kontrol seviyelerinde kaldığı tespit edilmiştir.

Düz kas hücrelerinin NADPH oksidaz inhibitörü DPI (10 µM, 30 dakika; [12, 80]) ile inkübasyonu sonrasında resistin (100 ng/mL, 15 dakika) ile uyarımı sonucunda ölçülen PKC fosforilasyonunun, tek başına resistin uyarımında olduğu gibi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmış olduğu bulunmuştur.

Vasküler düz kas hücrelerinde gerçekleşen PKC fosforilasyonlarına ait absorbans değerleri Tablo 4.2’de, tabloya ilişkin bar grafiği Şekil 4.2’de sunulmuştur.

Tablo 4.2. Resistin uyarımı sonrasında PKC fosforilasyonuna ait absorbans değerleri. Veriler, ortalama ± standart sapma olarak verildi.

Grup	n	Ortalama ± S.D.	F	P	post hoc
Kontrol (1)	10	0,0508 ± 0,00175	146,72	0,01	2, 4 > 1, 3
Resistin (2)	10	0,0662 ± 0,00193			
U 73122 + Resistin (3)	10	0,05224 ± 0,00199			
DPI + Resistin (4)	10	0,0599 ± 0,00179			



Şekil 4.2. PKC fosforilasyonu ölçüm sonuçları. (1) Kontrol grubundaki hücreler herhangi bir aktivatör ve inhibitörle inkübasyona bırakılmamıştır. (2) Resistin ile inkübasyon sonrasında kontrol grubuna göre PKC fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmuştur. (3) PLC inhibitörü U 73122 ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerde PKC fosforilasyonundaki değişiklik kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. (4) NADPH oksidaz inhibitörü DPI ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerde PKC fosforilasyonundaki artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır. *: $p < 0,05$

4.3. Resistin Uyarımı Sonrasında Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Oluşan Süperoksit Anyonu

Kültür ortamındaki düz kas hücrelerinde, resistin ve inhibitör ile resistin inkübasyon neticesinde, oluşan süperoksit anyonu miktarları, herhangi bir uyarıya maruz bırakılmayan kontrol grubunun süperoksit anyonu miktarlarıyla karşılaştırıldı.

Vasküler düz kas hücrelerinin resistin (100 ng/mL, 15 dakika [5, 64]) ile inkübasyonu sonrasında oluşan süperoksit anyonu miktarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tesbit edilmiştir.

PLC inhibitörü olan U 73122 (5 μ M, 30 dakika; [73]) ile inkübasyon sonrasında resistin uyarımına maruz bırakılan düz kas hücrelerinde oluşan süperoksit anyonundaki değişimin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Düz kas hücrelerinin PKC α , β I, β II, γ , ϵ inhibitörü olan Ro 320432 (3 μ M, 30 dakika; [77]) ile inkübasyonu sonrasında resistin ile uyarımı neticesinde oluşan süperoksit anyonu miktarının kontrol grubu seviyelerinde olduğu görülmüştür.

PKC δ inhibitörü olan Rottlerin (1 μ M, 30 dakika; [73]) ile inkübasyonun ardından resistin ile uyarılan VDKH'lerinde oluşan süperoksit anyonu miktarındaki artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır.

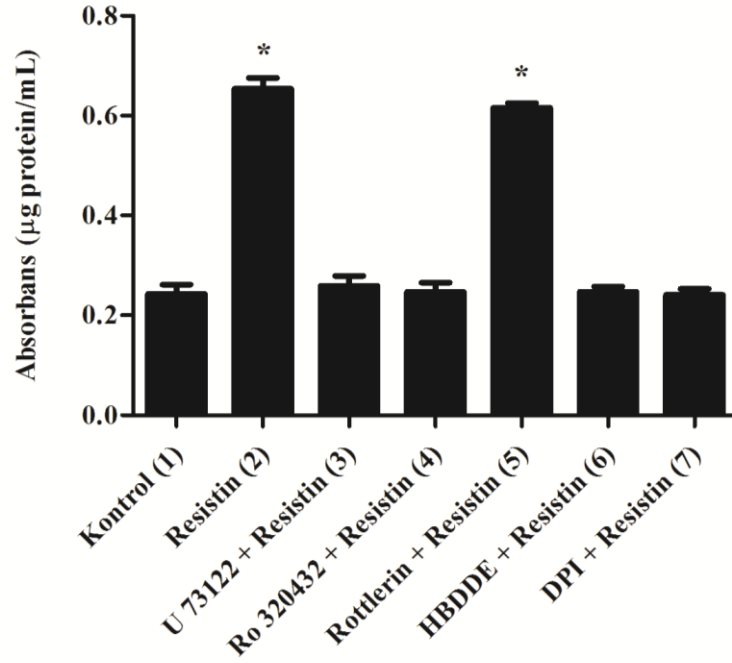
Vasküler düz kas hücrelerinin, PKC α , γ inhibitörü olan HBDDE (10 μ M, 30 dakika; [79]) ile inkübasyonunu takiben resistin ile inkübasyona bırakılması neticesinde oluşan süperoksit anyonu miktarındaki değişimin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

NADPH oksidaz inhibitörü olan DPI (10 μ M, 30 dakika; [12, 80]) ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan VDKH'lerinde oluşan süperoksit anyonu miktarının kontrol grubuyla benzer seviyelerde olduğu görülmüştür.

Vasküler düz kas hücrelerinde oluşan süperoksit anyonu ölçümlerine ait absorban değerleri Tablo 4.3'de, tabloya ilişkin bar grafiği Şekil 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinde oluşan süperoksit anyonu miktarlarına ait absorban değerleri. Veriler, ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

Gruplar	N	Ortalama \pm S.D.	F	p	Post hoc
Kontrol (1)	10	0,243 \pm 0,0189	1161,17	0,01	2, 5 > 1, 3, 4, 6, 7
Resistin (2)	10	0,654 \pm 0,0217			
U 73122 + Resistin (3)	10	0,259 \pm 0,0203			
Ro 320432 + Resistin (4)	10	0,247 \pm 0,0189			
Rottlerin + Resistin (5)	10	0,616 \pm 0,0092			
HBDDE + Resistin (6)	10	0,247 \pm 0,0106			
DPI + Resistin (7)	10	0,241 \pm 0,0119			



Şekil 4.3. Resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinde oluşan süperoksit anyonu ölçüm sonuçları. (1) Kontrol grubundaki hücreler herhangi bir aktivatör ve inhibitörle inkübasyona bırakılmamıştır. (2) Resistin ile inkübasyona bırakılan VDKH'nde kontrol grubuna göre süperoksit anyonu oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardır. (3) PLC inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerde oluşan süperoksit anyonu miktarlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır. (4) PKC α , β I, β II, γ , ϵ inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerde oluşan süperoksit anyonu miktarlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır. (5) PKC δ inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücre grubunda oluşan süperoksit anyonu miktarları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. (6) PKC α , γ inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücre grubunda oluşan süperoksit anyonu miktarlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. (7) NADPH oksidaz inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücre grubunda oluşan süperoksit anyonu miktarlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. *: $p < 0,05$

4.4. Resistin Uyarımı Sonrasında Vasküler Düz Kas Hücrelerinde p44/42 MAPK Fosforilasyonu

Kültür ortamındaki vasküler düz kas hücrelerinde, resistin ve inhibitör uyarımını takiben resistin ile inkübasyon sonrasında, p44/42 MAPK fosforilasyonundaki değişim, herhangi bir uyarıma maruz bırakılmayan kontrol grubunun p44/42 MAPK fosforilasyonu göre değerlendirildi.

Vasküler düz kas hücrelerinin resistin (100 ng/mL, 15 dakika [5, 64]) ile inkübasyonu sonrasında p44/42 MAPK fosforilasyonundaki artışın, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tesbit edilmiştir.

Düz kas hücrelerinin PKC α , β I, β II, γ , ϵ inhibitörü olan Ro 320432 (3 μ M, 30 dakika; [77]) ile inkübasyonu sonrasında resistin ile uyarımı neticesinde oluşan p44/42 MAPK fosforilasyonunun kontrol grubu seviyelerinde olduğu görülmüştür.

PKC δ inhibitörü olan Rottlerin (1 μ M, 30 dakika; [73]) ile inkübasyonun ardından resistin ile uyarılan VDKH'lerinde oluşan p44/42 MAPK fosforilasyonundaki değişimin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

Vasküler düz kas hücrelerinin, PKC α , γ inhibitörü olan HBDDE (10 μ M, 30 dakika; [79]) ile inkübasyonunu takiben resistin ile inkübasyona bırakılması neticesinde ölçülen p44/42 MAPK fosforilasyonundaki değişimin kontrol grubuna kıyasla anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

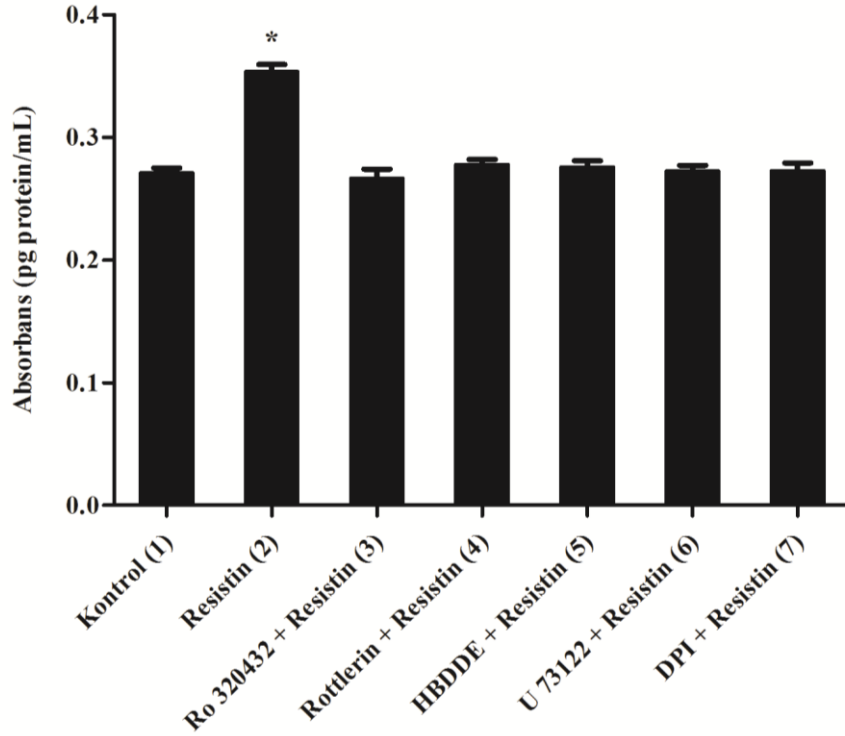
PLC inhibitörü olan U 73122 (5 μ M, 30 dakika; [73]) ile inkübasyon sonrasında resistin uyarımına maruz bırakılan düz kas hücrelerinde, p44/42 MAPK fosforilasyonundaki değişimin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

NADPH oksidaz inhibitörü olan DPI (10 μ M, 30 dakika; [12, 80]) ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan VDKH'lerinde gerçekleşen p44/42 MAPK fosforilasyonunun kontrol grubuyla benzer seviyelerde olduğu görülmüştür.

Resistin uyarımı sonrasında düz kas hücrelerinde ölçülen p44/42 MAPK fosforilasyonlarına ait absorbans değerleri Tablo 4.4'de, tabloya ilişkin bar grafiği Şekil 4.4'de sunulmuştur.

Tablo 4.4. Resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinde p44/42 MAPK fosforilasyonuna ait absorbans değerleri. Veriler, ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

Gruplar	N	Ortalama \pm S.D.	F	P	Post hoc
Kontrol (1)	10	0,2710 \pm 0,0041	318,34	0,01	2 > 1, 3, 4, 5, 6, 7
Resistin (2)	10	0,3536 \pm 0,0060			
Ro 320432 + Resistin (3)	10	0,2668 \pm 0,0074			
Rottlerin + Resistin (4)	10	0,2780 \pm 0,0041			
HBDDE + Resistin (5)	10	0,2760 \pm 0,0049			
U 73122 + Resistin (6)	10	0,2726 \pm 0,0046			
DPI + Resistin (7)	10	0,2730 \pm 0,0063			



Şekil 4.4. Resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinde p44/42 MAPK fosforilasyonu ölçüm sonuçları. (1) Kontrol grubundaki hücreler herhangi bir aktivatör ve inhibitörle inkübasyona bırakılmamıştır. (2) Resistin ile inkübasyon sonrasında kontrol grubuna göre p44/42 MAPK fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmuştur. (3) PKC α , β I, β II, γ , ϵ inhibitörü Ro 320432 ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerde kontrol grubuna göre p44/42 MAPK fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır. (4) PKC δ inhibitörü Rottlerin ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerde kontrol grubuna göre p44/42 MAPK fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır. (5) PKC α ve PKC γ inhibitörü HBDDE ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerde kontrol grubuna göre p44/42 MAPK fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır. (6) PLC inhibitörü U 73122 ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerde kontrol grubuna göre p44/42 MAPK fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır. (7) NADPH oksidaz inhibitörü DPI ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerde kontrol grubuna göre p44/42 MAPK fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır. *: p<0,05

4.5. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde p38 MAPK Fosforilasyonu

Vasküler düz kas hücrelerinde, resistin ve inhibitör artı resistin ile inkübasyon sonrasında, p38 MAPK fosforilasyonundaki değişim, herhangi bir uyarıma maruz bırakılmayan kontrol grubunda gerçekleşen p38 MAPK fosforilasyonuna karşı değerlendirildi.

Vasküler düz kas hücrelerinin resistin (100 ng/mL, 15 dakika [5, 64]) ile inkübasyonu sonrasında p38 MAPK fosforilasyonundaki artışın, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tesbit edilmiştir.

PLC inhibitörü olan U 73122 (5 μ M, 30 dakika; [73]) ile inkübasyon sonrasında resistin uyarımına maruz bırakılan düz kas hücrelerinde, p38 MAPK fosforilasyonundaki değişimin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Düz kas hücrelerinin PKC α , β I, β II, γ , ϵ inhibitörü olan Ro 320432 (3 μ M, 30 dakika; [77]) ile inkübasyonu sonrasında resistin ile uyarımı neticesinde oluşan p38 MAPK fosforilasyonunun kontrol grubu seviyelerinde olduğu görülmüştür.

PKC δ inhibitörü olan Rottlerin (1 μ M, 30 dakika; [73]) ile inkübasyonun ardından resistin ile uyarılan VDKH'lerinde oluşan p38 MAPK fosforilasyonundaki artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır.

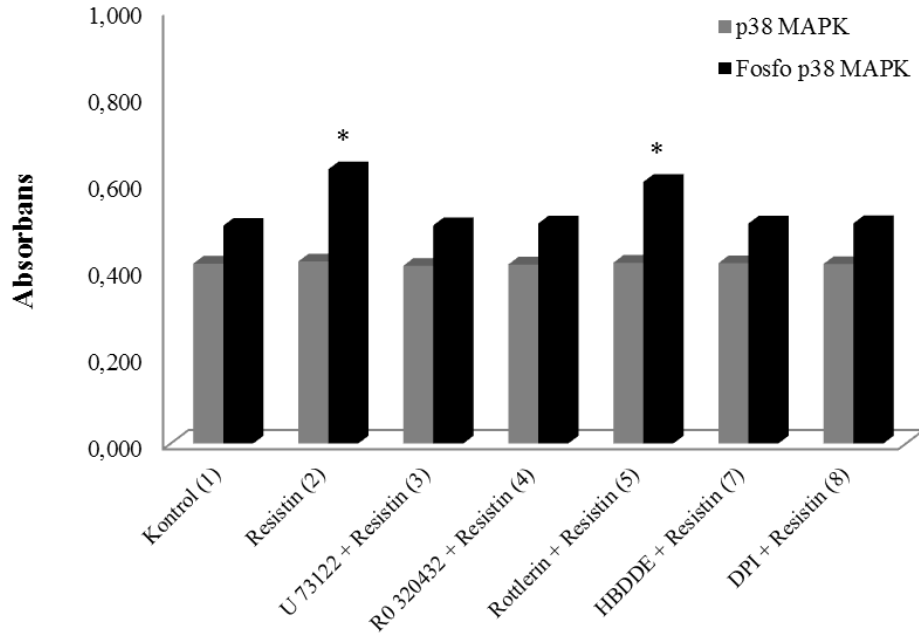
Vasküler düz kas hücrelerinin, PKC α , γ inhibitörü olan HBDDE (10 μ M, 30 dakika; [79]) ile inkübasyonunu takiben resistin ile inkübasyona bırakılması neticesinde ölçülen p38 MAPK fosforilasyonundaki değişimin kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

NADPH oksidaz inhibitörü olan DPI (10 μ M, 30 dakika; [12, 80]) ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan VDKH'lerinde gerçekleşen p38 MAPK fosforilasyonunun kontrol grubuyla benzer seviyelerde olduğu görülmüştür.

Vasküler düz kas hücrelerinde resistin uyarımı sonrasında oluşan p38 MAPK fosforilasyonu ölçümlerine ait absorbans değerleri Tablo 4.4'de, bu tabloya ait bar grafiği Şekil 4.5'de sunulmuştur.

Tablo 4.5. p38 MAPK fosforilasyonuna ait absorbans değerleri. Veriler, ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

Gruplar	n	Ortalama \pm S.D.	F	P	Post hoc
Kontrol (1)	10	0,5025 \pm 0,007	744,33	0,01	2, 5 > 1, 3, 4, 6, 7
Resistin (2)	10	0,6326 \pm 0,007			
U 73122 + Resistin (3)	10	0,5030 \pm 0,006			
RO 320432 + Resistin (4)	10	0,5078 \pm 0,006			
Rottlerin + Resistin (5)	10	0,6036 \pm 0,007			
HBDDE + Resistin (6)	10	0,5075 \pm 0,006			
DPI + Resistin (7)	10	0,5080 \pm 0,006			



Şekil 4.5. p38 MAPK fosforilasyonu ölçüm sonuçları. (1) Kontrol grubundaki hücreler herhangi bir aktivatör ve inhibitörle inkübasyona bırakılmamıştır. (2) Resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerdeki p38 MAPK fosforilasyonundaki artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır. (3) PLC inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerde p38 MAPK fosforilasyonundaki değişim kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. (4) PKC α , β I, β II, γ , ϵ inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerde p38 MAPK fosforilasyonundaki değişim kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. (5) PKC δ inhibitörü Rottlerin ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerde p38 MAPK fosforilasyonundaki artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır. (6) PKC α , γ inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerde p38 MAPK fosforilasyonundaki değişim kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. (7) NADPH oksidaz inhibitörü DPI ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerde p38 MAPK fosforilasyonundaki değişim kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir. *: p<0,05

TARTIŞMA

Önlenmesi ve tedavisi için önemli efor ve kaynak harcanmasına rağmen kardiyovasküler hastalıklar hala yer yüzündeki ölümlerin birincil sebebidir [86]. Tüm dünyada epidemik hale gelen kardiyovasküler hastalıkların en sık nedeni aterogenez ve buna eklenen trombozdur. Ateroskleroza genetik yatkınlık olmasına karşılık aterosklerozla ilişkili hiperlipidemi, hipertansiyon ve diyabetes mellitus (DM) çoğunlukla sonradan edinilir ve aterosklerozun genellikle hayatın ilerleyen dönemlerinde açığa çıkan patolojik süreçleri, kişinin beslenme ve yaşam standardına bağlı olarak önlenir [3]. Endotelial disfonksiyon ile birlikte vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu ile karakterize patolojik bir süreç olan ateroskleroz [1, 87], arter intimasında plazmadan kaynaklanan aterojenik lipoprotein birikmesine karşı gelişen karmaşık bir inflamatuvar - fibroproliferatif yanıt olup aortadan epikardiyal koroner arterlere kadar farklı büyüklükteki sistemik arterleri etkileyebilir [3].

Obezite ve diyabet kardiyovasküler hastalıklar için iki önemli risk faktörüdür. Obezite üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda keşfedilen adipokinlerin tanımlanmasından beri adipoz doku endokrin bir organ olarak kabul edilmektedir. Keşfedilen bu adipokinler arasında son dönemlerde tespit edilen resistin proteini üzerinde farklı araştırma gruplarının yapmış olduğu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda molekülün, endotelial disfonksiyon, vasküler disfonksiyon, kardiyak hipertrofi ve vasküler düz kas hücrelerinin migrasyonunu ve proliferasyonunu arttırmak suretiyle ateroskleroz gibi çeşitli patofizyolojik süreçlerde rol aldığı ortaya koyulmuştur [2].

Calabro ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, resistin'in insan arteriyel düz kas hücrelerinde p44/42 MAPK fosforilasyonu ve fosfatidilinositol 3-kinaz yolağının aktivasyonu ile düz kas hücrelerinin proliferasyonunda artış olduğu gösterilmiş, p38 MAPK fosforilasyonunun proliferasyonla bir ilişkisi olmadığı belirtilmiştir [5]. Zhang ve arkadaşları, resistin-benzeri molekül α uyarımının vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyonu anlamlı derecede arttırdığını göstermişlerdir [88]. Hirai ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları araştırmalar neticesinde resistin uyarımının rat vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyonu uyardığını söylemişlerdir [89]. Park ve arkadaşlarının farklı bir uyarı kullanarak vasküler düz kas hücrelerinde yaptıkları çalışmada, EPO gene ekspresyonunun VDKH'lerinde proliferasyonu uyardığını ve bu uyarımın p44/42 MAPK ve p38 MAPK fosforilasyonu ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [90].

Çalışmamızda, resistin uyarımına bağlı olarak vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyon seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Bu sonuç, Calabro [5], Zhang [88] ve Hirai ve arkadaşlarının [89] bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

PLC ve PKC izoenzimlerinin (α , β I, β II, γ , ϵ , δ) inhibitörleri ile inkübasyon sonrasında resistin uyarımına maruz bırakılan hücrelerde, proliferasyon seviyelerinin kontrol grubu seviyelerine kadar baskılandığı ve aralarında anlamlı bir fark olmadığı anlaşılmıştır.

PLC ve PKC izoenzimlerinin inhibitörlerinin düz kas hücre proliferasyonunu baskılamasına dayanarak, PLC ve PKC'nin proliferasyon yolağıyla ilişkili olduğunu söyleyebiliriz.

Bir NADPH oksidaz inhibitörü olan DPI ile inkübasyon sonrasında resistin'e maruz bırakılan hücrelerin proliferasyonundaki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir. NADPH oksidaz inhibisyonu sonrasında süperoksit anyonu oluşumunun baskılanması proliferasyon yolağının baskılanmasında etkili gibi görülmektedir.

Vasküler düz kas hücrelerinin p44/42 MAPK inhibitörü olan PD 98059 ile inkübasyonunu takiben resistin ile uyarılması neticesinde proliferasyondaki değişimin kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı bulunmuştur. Calabro ve arkadaşları [5] araştırmalarında farklı MAPK inhibitörü (U0126) ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan VDKH'lerinde proliferasyonun baskılandığını bulmuşlardır. Hirai ve arkadaşlarının çalışmasında da resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunda p44/42 MAPK fosforilasyonunun rolü olabileceğini söylemişlerdir [89]. Bizim bulgularımıza göre de VDKH'lerinin proliferasyonunda p44/42 MAPK fosforilasyonunun bir rolü olduğu söylenebilir.

Düz kas hücrelerinin p38 MAPK inhibitörü SB 203580 inkübasyonu sonrasında resistin ile uyarılması sonucunda düz kas hücre proliferasyonunun kontrole göre anlamlı derecede yükseldiği görülmektedir (Şekil 4.1). p38 MAPK, mitojen aktive edici bir protein kinaz olmasına rağmen inhibisyonu sonrasında proliferasyonun baskılanmaması düşündürücüdür. Calabro ve arkadaşlarının bulgularında da VDKH'lerinde p38 MAPK fosforilasyonunun baskılanmasının hücre proliferasyonunda anlamlı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Serin-treonin kinazlar enzim ailesinin bir üyesi olan PKC, spesifik yapısal özellikleri ve aktivasyonu için ihtiyaç duyduğu gereksinimler sebebiyle, geleneksel PKC (cPKC), yeni PKC (nPKC) ve atipik PKC (aPKC) olmak üzere üç alt gruba ayrılır [91]. cPKC'nin aktivasyonu için diaçilgliserol (DAG), Ca²⁺ iyonu ve fosfolipidlere gereksinim vardır. nPKC'nin aktivasyonu için DAG'e gereksinim vardır fakat Ca²⁺ iyonuna ihtiyaç yoktur. aPKC aktivasyonu için ise sadece fosfatidil serine gereksinim vardır [92, 93].

PKC aktivasyonunun gerçekleşmesi için gerekli olan DAG ve Ca²⁺ iyonu, PLC aktivasyonu sonrasında sağlanır. Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP₂) PLC tarafından DAG ve inositol 1,4,5-trifosfat (IP₃)'a ayrılır. IP₃ hücre içi Ca²⁺ iyonu konsantrasyonunu artırarak PKC aktivasyonu için ihtiyaç duyulan gereksinimleri karşılamış olur [94].

Çalışmamızda, VDKH'nin resistin ile uyarımı sonrasında PKC fosforilasyonunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. PLC inhibitörü olan U 73122 ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarım yapılan hücrelerdeki PKC fosforilasyonunun kontrol seviyelerinde olduğu gözlenmiştir. Son olarak NADPH oksidaz inhibitörü DPI ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerde PKC fosforilasyonunun yine kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 4.2).

Bu veriler bize PKC fosforilasyonunun gerçekleşmesi için PLC aktivasyonuna ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir ayrıca NADPH oksidaz enzim kompleksini inhibisyonu

sonucunda süperoksit anyonu miktarında bir düşme olacağı düşünülürse PKC fosforilasyonun ROS ile bir ilişkisi olmadığı söylenebilir.

Reaktif oksijen türleri, vücut savunması, hormon biyosentezi ve hücrel sinyallerinden içinde bulunduğu çeşitli fizyolojik süreçlere etki eder. Fakat artan ROS üretimi (oksidatif stress olarak da adlandırılır) hipertansiyon, ateroskleroz ve diyabet gibi çeşitli patolojilerin oluşmasından sorumlu tutulur. Süperoksit anyonundaki artışa bağlı olarak endotelial disfonksiyon gelişir [95]. Endotel hücrelerindeki ROS üretiminin major kaynağı NADPH oksidaz enzim kompleksi olarak kabul edilmiştir [12, 14]. Farklı bir deney modelinde, NADPH oksidaz aktivasyonuna bağlı olarak ROS oluşumunun PKC α üzerinden gerçekleştiği Hong ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir [15]. Palmitat uyarımına bağlı C reaktif protein ekspresyonunun insan aortik endotel hücrelerinde, adenosin monofosfat-aktive kinaz'ın PKC'yi baskılamasıyla NADPH oksidaz üzerinden ROS oluşumunu inhibe ettiği Mugabo ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir [16]. Ou ve arkadaşlarının insan umbilikal ven endotel hücrelerinde yapmış olduğu çalışmada, resistin'in, AMPK'nın fosforilasyonunu baskılayarak, PKC α üzerinden NADPH oksidaz aktivasyonu ile ROS oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir [12]. Chemaly ve arkadaşlarının deneyleri sonucunda, resistin'in *in vivo* uzun süre artmış ekspresyonunun NADPH oksidaz üzerinden oluşan ROS seviyesindeki artışın sıçanlarda miyokardiyal disfonksiyon ve yeniden düzenlenmeyle ilişkili olduğu belirtilmiştir [6]

Çalışmamızda, VDKH'lerinin resistin ile inkübasyonu sonrasında süperoksit anyonu miktarlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. NADPH oksidaz inhibitörü DPI ile inkübasyon sonrasında resistin uyarımının düz kas hücrelerinde süperoksit anyonu oluşumu üzerine olan etkisi incelendiğinde, oluşan süperoksit anyonu miktarının kontrol grubuyla birbirine yakın seviyelerde olduğu ve aralarında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuca göre resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerindeki süperoksit anyonu artışında, NADPH oksidaz enzim kompleksinin bir rolü olabileceğini düşünebiliriz (Şekil 4.3).

PLC inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarıma bırakılan hücre grubunda oluşan süperoksit anyonu miktarlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Bu durum bize resistin uyarımı ile NADPH oksidaz aktivitesinin gerçekleşmesi için öncesinde PLC aktivasyonunun gerçekleşmesi gerektiğini düşündürmektedir.

PKC α , β I, β II, γ , ϵ inhibitörü ve PKC α , γ inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücre grubunda oluşan süperoksit anyonu miktarlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Resistin uyarımı sonrasında NADPH oksidaz enzim kompleksi üzerinden süperoksit anyonu oluşumunun artması için PLC aktivitesine bağlı olarak fosforile olup aktifleşen PKC α , β I, β II, γ , ϵ izoenzimlerinden bir veya birkaçına ihtiyaç olduğunu söyleyebiliriz. Hong ve arkadaşları da farklı bir deney modelinde NADPH oksidaz aktivitesine bağlı artan süperoksit anyonunun PKC α fosforilasyonu üzerinden gerçekleştiğini söylemişlerdir [15].

PKC δ inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin uyarımına bırakılan hücre grubunda oluşan süperoksit anyonu miktarları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Şekil 4.3). Bu sonuca göre resistin uyarımı sonrasında

NADPH oksidaz enzim kompleksinin aktifleşmesinde PKC δ 'nın bir rolü olmadığını düşünebiliriz.

Calabro ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmanın sonuçlarına göre resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunun kontrolünde p44/42 MAPK fosforilasyonu önemli bir rol oynamaktadır [5]. Van der Merwe ve arkadaşlarının intestinal epitel hücrelerinde yapmış olduğu çalışma sonucunda elde ettikleri verilere göre, proteaz-aktive reseptör-2 (PAR₂) uyarımı sonrasında p44/42 MAPK fosforilasyonunda PLC aktivitesine bağlı olarak fosforile olan PKC izoenzimlerinin rol aldığını ileri sürmüşlerdir [74]. Hamilton ve arkadaşlarının fare fibroblasts hücrelerinde yaptıkları çalışma sonucundaki bulgulara göre de p44/42 MAPK fosforilasyonunda PKC izoenzimlerinin rol aldığı bildirilmiştir [96]. Ginnan ve arkadaşları, vasküler düz kas hücrelerinde yapmış oldukları çalışmalar sonucunda interlökin1 β ile uyarılan hücrelerde p44/42 MAPK fosforilasyonunun PLC inhibisyonuna bağlı olarak baskılandığını ve p44/42 MAPK fosforilasyonunda PKC δ 'nın etkili olduğunu tespit etmişlerdir [73].

Çalışmamız sonucunda, VDKH'lerinin resistin ile inkübasyonu sonrasında p44/42 MAPK fosforilasyonunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Çalışma sonucunda elde ettiğimiz veri, Calabro ve arkadaşlarının verileri ile uyumludur [5]. Buna göre resistin uyarımının vasküler düz kas hücrelerinde p44/42 MAPK fosforilasyonunu arttırdığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda, PLC ve PKC izoenzimlerinin (α , β I, β II, γ , ϵ , δ) inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerde gözlenen p44/42 MAPK fosforilasyonlarının kontrol grubuyla benzer olduğu ve fosforilasyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

Van der Merwe ve arkadaşları, farklı bir deney modelinde, p44/42 MAPK fosforilasyonunun PLC aktivitesine bağlı olarak fosforile olan PKC izoenzimleriyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [74]. Yine farklı bir deney modeli kullanan, Hamilton ve arkadaşlarının verilerine göre de p44/42 MAPK fosforilasyonunda PKC izoenzimlerinin rol aldığı bildirilmiştir [96]. Vasküler düz kas hücrelerinde farklı bir uyarı ile çalışan Ginnan ve arkadaşları da p44/42 MAPK fosforilasyonunun PLC inhibisyonuna bağlı olarak baskılandığını ve p44/42 MAPK fosforilasyonunda PKC δ 'nın etkili olduğunu tespit etmişlerdir [73].

Elimizdeki veriler doğrultusunda, vasküler düz kas hücrelerinde resistin uyarımı sonrasında p44/42 MAPK fosforilasyonunun gerçekleşebilmesi için PLC'nin aktive olması ve PKC izoenzimlerinin fosforile olması gerektiğini düşünebiliriz.

NADPH oksidaz inhibitörü DPI ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücre grubunda p44/42 MAPK fosforilasyonunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç bize NADPH oksidaz üzerinden oluşan süperoksit anyonunun resistin uyarımı sonrasında VDKH'lerinde p44/42 MAPK fosforilasyonunun gerçekleşmesinde bir etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Bao ve arkadaşları, düz kas hücrelerinde NADPH oksidaz enzim kompleksi üzerinden oluşan ROS'ların p38 MAPK fosforilasyonuna sebep olduğunu bildirmiş ve p38 MAPK

fosforilasyonunun düz kas hücrelerinde migrasyona sebep olduğunu belirtmişlerdir [97]. Park ve arkadaşlarının vasküler düz kas hücrelerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda, p38 MAPK fosforilasyonu sonrasında matris metalloproteinaz-9 (MMP-9) aktivasyonuna bağlı olarak düz kas hücre migrasyonunun gerçekleşebileceği belirtilmiştir [90].

Çalışmamızda vasküler düz kas hücrelerinde p38 MAPK fosforilasyonunun ölçümü sonucunda, resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerdeki p38 MAPK fosforilasyonundaki artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Resistin uyarımının p38 MAPK fosforilasyonunu arttırdığını söyleyebiliriz.

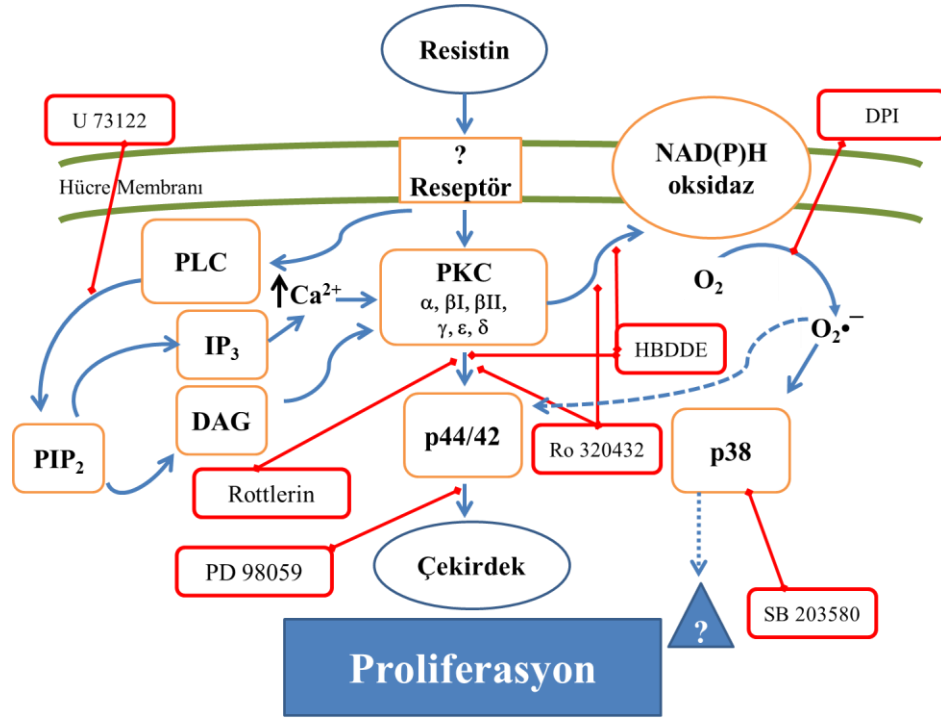
PLC inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerdeki p38 MAPK fosforilasyonundaki değişim kontrol grubuna göre anlamlı bulunmamıştır. Bu da bizlere, p38 MAPK fosforilasyonunun gerçekleşmesinde PLC aktivasyonunun bir payı olduğunu düşündürmektedir.

PKC α , β I, β II, γ , ϵ inhibitörü ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerdeki p38 MAPK fosforilasyonundaki değişimin kontrol grubu seviyelerinde kalması, bizlerde bu PKC izoenzimlerinin p38 MAPK fosforilasyonunun kontrolünde bir role sahip oldukları kanısını doğurmuştur.

PKC δ inhibitörü Rottlerin ile inkübasyon sonrasında resistin ile inkübasyona bırakılan hücrelerdeki p38 MAPK fosforilasyonundaki değişimin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç bize vasküler düz kas hücrelerinde, resistin uyarımı sonrasında PKC δ izoenziminin p38 MAPK fosforilasyonunda herhangi bir rolü olmadığını düşündürmektedir.

NADPH oksidaz inhibitörü DPI ile inkübasyon sonrasında resistin ile uyarılan hücrelerdeki p38 MAPK fosforilasyonundaki değişim kontrol grubuna göre anlamlı değildir. Bu durum p38 MAPK fosforilasyonunun NADPH oksidaz enzim kompleksi üzerinden oluşan süperoksit anyonu ile ilişkili olduğunun bir kanıtı olabilir.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz tüm veriler doğrultusunda, resistin uyarımının VDKH'lerinin proliferasyonunu uyardığını, vasküler düz kas hücrelerinde resistin uyarımına bağlı PKC izoenzimlerinin fosforilasyonlarının ve proliferasyonun gerçekleşebilmesi için PLC'nin aktivite göstermesi gerektiğini, PKC izoenzimlerinin inhibisyonunun da düz kas hücrelerinin proliferasyon yolağının çalışmasını baskılayabileceğini, p44/42 MAPK fosforilasyonunun PLC aktivasyonu sonrasında fosforile olan PKC izoenzimleri üzerinden olduğunu, düz kas hücre proliferasyonunun p44/42 MAPK üzerinden gerçekleştiğini, resistin uyarımı sonrasında artan süperoksit anyonunun p44/42 MAPK fosforilasyonu üzerinden de proliferasyonu uyardığını söyleyebiliriz (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Resistin uyarımı sonrasında proliferasyona giden hücre içi sinyal yolağı.

Bizim amacımız, resistin uyarımı sonrasında vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu yolağında PLC ve/veya PKC'nin, Mitojen-aktive edici protein kinaz (MAPK: Mitogen-activated protein kinase) ailesinin aktivasyonu ve ROS üretimi üzerine olan etkilerini ortaya çıkarmaya çalışmaktır. Bu amaç doğrultusunda ileri sürdüğümüz hipotez: Resistin ile muamele edilen vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonuna, MAPK ailesinin aktivasyonunu ve NADPH oksidaz üzerinden oluşan süperoksit anyonunu arttıran, PKC ve PLC aktivasyonu sebep olmaktadır.

Hipotezimiz doğrultusunda yaptığımız deneyler sonucunda, resistin uyarımı sonrasında, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonuna, PLC aktivitesi sonrasında fosforile olan çeşitli PKC izoenzimleri üzerinden uyarılan p44/42 MAPK fosforilasyonunun ve NADPH oksidaz aracılığıyla oluşan süperoksit anyonunun sebep olduğunu söyleyebiliriz.

Resistin molekülünün hücre içi sinyal yolları üzerine olan etkilerinin daha ileri düzeyde yapılacak araştırmalar ile açığa çıkarılması, resistin'i kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yeni bir hedef molekül haline getirebilir. Ayrıca resistin yakın gelecekte vasküler hastalıkların ayırıcı tanısında yeni bir biyobelirteç olarak kullanılmaya başlanabilir.

SONUÇLAR

- 1) Resitin vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyonu uyardığı tespit edilmiştir.
- 2) Vasküler düz kas hücrelerinin resistin ile uyarımı sonrasında proliferasyon yolağında PLC üzerinden PKC fosforilasyonunun gerçekleştiği görülmüştür.
- 3) Vasküler düz kas hücrelerinin resistin ile uyarımının NADPH oksidaz enzim kompleksi üzerinden süperoksit anyonu oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir.
- 4) Vasküler düz kas hücrelerinin resistin ile uyarımı sonrasında p44/42 MAPK fosforilasyonunun gerçekleştiği tespit edilmiştir.
- 5) Vasküler düz kas hücrelerinin resistin ile uyarımı sonrasında p38 MAPK fosforilasyonunun arttığı sonucuna varılmıştır.
- 6) Vasküler düz kas hücrelerinin resistin ile uyarımı sonrasında, PLC aktivasyonunu takiben meydana gelen PKC α , β I, β II, γ , ϵ , izoenzimlerinin fosforilasyonu sonrasında hem p44/42 MAPK aktivasyonunun hem de NADPH oksidaz enzim kompleksi üzerinden oluşan süperoksit anyonunun proliferasyon yolağında rolünün olduğu gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Jung HS, Park KH, Cho YM, Chung SS, Cho HJ, Cho SY, Kim SJ, Kim SY, Lee HK, Park KS: Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovascular research* 2006, 69(1):76-85.
2. Ding Q, White SP, Ling C, Zhou W: Resistin and cardiovascular disease. *Trends in cardiovascular medicine* 2011, 21(1):20-27.
3. Kılıçlı Çamur N: Koroner ateroskleroz ve miyokard infarktüsünde ortalama trombosit hacminin öngörüsöl değeri. *Uzmanlık Tezi*. İstanbul: Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2004.
4. Gao J, Chang Chua C, Chen Z, Wang H, Xu X, R CH, McMullen JR, Shioi T, Izumo S, Chua BH: Resistin, an adipocytokine, offers protection against acute myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2007, 43(5):601-609.
5. Calabro P, Samudio I, Willerson JT, Yeh ET: Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation* 2004, 110(21):3335-3340.
6. Chemaly ER, Hadri L, Zhang S, Kim M, Kohlbrenner E, Sheng J, Liang L, Chen J, P KR, Hajjar RJ *et al*: Long-term in vivo resistin overexpression induces myocardial dysfunction and remodeling in rats. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2011, 51(2):144-155.
7. Ding Q, Chai H, Mahmood N, Tsao J, Mochly-Rosen D, Zhou W: Matrix metalloproteinases modulated by protein kinase Cepsilon mediate resistin-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Journal of vascular surgery* 2011, 53(4):1044-1051.
8. Jiang C, Zhang H, Zhang W, Kong W, Zhu Y, Xu Q, Li Y, Wang X: Homocysteine promotes vascular smooth muscle cell migration by induction of the adipokine resistin. *American journal of physiology Cell physiology* 2009, 297(6):C1466-1476.
9. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C: Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *British journal of pharmacology* 2012, 165(3):622-632.
10. Kang S, Chemaly ER, Hajjar RJ, Lebeche D: Resistin promotes cardiac hypertrophy via the AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin

(AMPK/mTOR) and c-Jun N-terminal kinase/insulin receptor substrate 1 (JNK/IRS1) pathways. *The Journal of biological chemistry* 2011, 286(21):18465-18473.

11. Kunnari A: Genetic, Epidemiological And Cell Culture Studies On Human Resistin. Oulu University Press: Oulu University 2008.
12. Ou HC, Lee WJ, Wu CM, Chen JF, Sheu WH: Aspirin prevents resistin-induced endothelial dysfunction by modulating AMPK, ROS, and Akt/eNOS signaling. *Journal of vascular surgery* 2012, 55(4):1104-1115.
13. Manduteanu I, Pirvulescu M, Gan AM, Stan D, Simion V, Dragomir E, Calin M, Manea A, Simionescu M: Similar effects of resistin and high glucose on P-selectin and fractalkine expression and monocyte adhesion in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2010, 391(3):1443-1448.
14. Pirvulescu MM, Gan AM, Stan D, Simion V, Calin M, Butoi E, Tirgoviste CI, Manduteanu I: Curcumin and a Morus alba extract reduce pro-inflammatory effects of resistin in human endothelial cells. *Phytotherapy research : PTR* 2011, 25(12):1737-1742.
15. Hong NJ, Silva GB, Garvin JL: PKC-alpha mediates flow-stimulated superoxide production in thick ascending limbs. *American journal of physiology Renal physiology* 2010, 298(4):F885-891.
16. Mugabo Y, Mukaneza Y, Renier G: Palmitate induces C-reactive protein expression in human aortic endothelial cells. Relevance to fatty acid-induced endothelial dysfunction. *Metabolism: clinical and experimental* 2011, 60(5):640-648.
17. Koerner A, Kratzsch J, Kiess W: Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2005, 19(4):525-546.
18. Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ *et al*: FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *The EMBO journal* 2000, 19(15):4046-4055.
19. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001, 409(6818):307-312.
20. Rajala MW, Lin Y, Ranalletta M, Yang XM, Qian H, Gingerich R, Barzilai N, Scherer PE: Cell type-specific expression and coregulation of murine resistin and resistin-like molecule-alpha in adipose tissue. *Mol Endocrinol* 2002, 16(8):1920-1930.

21. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS: A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry* 2001, 276(14):11252-11256.
22. Gerstmayer B, Kusters D, Gebel S, Muller T, Van Miert E, Hofmann K, Bosio A: Identification of RELMgamma, a novel resistin-like molecule with a distinct expression pattern. *Genomics* 2003, 81(6):588-595.
23. Chumakov AM, Kubota T, Walter S, Koeffler HP: Identification of murine and human XCP1 genes as C/EBP-epsilon-dependent members of FIZZ/Resistin gene family. *Oncogene* 2004, 23(19):3414-3425.
24. Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD *et al*: A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, 98(2):502-506.
25. Ghosh S, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ehtesham NZ: The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications. *Gene* 2003, 305(1):27-34.
26. Yang RZ, Huang Q, Xu A, McLenithan JC, Eisen JA, Shuldiner AR, Alkan S, Gong DW: Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in human and mouse. *Biochemical and biophysical research communications* 2003, 310(3):927-935.
27. Filkova M, Haluzik M, Gay S, Senolt L: The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol* 2009, 133(2):157-170.
28. Morash BA, Wilkinson D, Ur E, Wilkinson M: Resistin expression and regulation in mouse pituitary. *FEBS letters* 2002, 526(1-3):26-30.
29. Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G, Vettor R: Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obesity research* 2002, 10(11):1095-1103.
30. Minn AH, Patterson NB, Pack S, Hoffmann SC, Gavrilova O, Vinson C, Harlan DM, Shalev A: Resistin is expressed in pancreatic islets. *Biochemical and biophysical research communications* 2003, 310(2):641-645.
31. Nogueiras R, Gallego R, Gualillo O, Caminos JE, Garcia-Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C: Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS letters* 2003, 548(1-3):21-27.
32. McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S: Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet* 2002, 359(9300):46-47.

33. McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, Crocker J, Barnett AH, Kumar S: Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2002, 87(5):2407.
34. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S: Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 2001, 50(10):2199-2202.
35. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM: Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obesity research* 2002, 10(1):1-5.
36. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA: Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochemical and biophysical research communications* 2003, 300(2):472-476.
37. Lu SC, Shieh WY, Chen CY, Hsu SC, Chen HL: Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro. *FEBS letters* 2002, 530(1-3):158-162.
38. Schaffler A, Ehling A, Neumann E, Herfarth H, Tarner I, Scholmerich J, Muller-Ladner U, Gay S: Adipocytokines in synovial fluid. *Jama* 2003, 290(13):1709-1710.
39. Senolt L, Housa D, Vernerova Z, Jirasek T, Svobodova R, Veigl D, Anderlova K, Muller-Ladner U, Pavelka K, Haluzik M: Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum. *Annals of the rheumatic diseases* 2007, 66(4):458-463.
40. Stejskal D, Proskova J, Adamovska S, Jurakova R, Bartek J: Preliminary experience with resistin assessment in common population. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 2002, 146(2):47-49.
41. Yura S, Sagawa N, Itoh H, Kakui K, Nuamah MA, Korita D, Takemura M, Fujii S: Resistin is expressed in the human placenta. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2003, 88(3):1394-1397.
42. Bo S, Gambino R, Pagani A, Guidi S, Gentile L, Cassader M, Pagano GF: Relationships between human serum resistin, inflammatory markers and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2005, 29(11):1315-1320.
43. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A: Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 2005, 174(9):5789-5795.
44. Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, Hinkle CC, Pruscino L, Comiskey LL, Tabita-Martinez J, Sellers KF, Rickels MR, Ahima RS *et al*: Innate immunity modulates

- adipokines in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2007, 92(6):2272-2279.
45. Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR: Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* 2003, 309(2):286-290.
 46. Lehrke M, Reilly MP, Millington SC, Iqbal N, Rader DJ, Lazar MA: An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS medicine* 2004, 1(2):e45.
 47. Hu WL, Qiao SB, Li JJ: Decreased C-reactive protein-induced resistin production in human monocytes by simvastatin. *Cytokine* 2007, 40(3):201-206.
 48. Silswal N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ: Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 2005, 334(4):1092-1101.
 49. Bertolani C, Sancho-Bru P, Failli P, Bataller R, Aleffi S, DeFranco R, Mazzinghi B, Romagnani P, Milani S, Gines P *et al*: Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *The American journal of pathology* 2006, 169(6):2042-2053.
 50. Nagaev I, Bokarewa M, Tarkowski A, Smith U: Human resistin is a systemic immune-derived proinflammatory cytokine targeting both leukocytes and adipocytes. *PloS one* 2006, 1:e31.
 51. Kushiyama A, Shojima N, Ogihara T, Inukai K, Sakoda H, Fujishiro M, Fukushima Y, Anai M, Ono H, Horike N *et al*: Resistin-like molecule beta activates MAPKs, suppresses insulin signaling in hepatocytes, and induces diabetes, hyperlipidemia, and fatty liver in transgenic mice on a high fat diet. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280(51):42016-42025.
 52. Mu H, Ohashi R, Yan S, Chai H, Yang H, Lin P, Yao Q, Chen C: Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells. *Cardiovascular research* 2006, 70(1):146-157.
 53. Shyu KG, Lien LM, Wang BW, Kuan P, Chang H: Resistin contributes to neointimal formation via oxidative stress after vascular injury. *Clin Sci (Lond)* 2011, 120(3):121-129.
 54. Fan C, Su Q, Li Y, Liang L, Angelini DJ, Guggino WB, Johns RA: Hypoxia-induced mitogenic factor/FIZZ1 induces intracellular calcium release through the PLC-IP(3) pathway. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2009, 297(2):L263-270.

55. Guzik TJ, Mangalat D, Korbust R: Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 2006, 57(4):505-528.
56. Lazar MA: Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2007, 39(10):710-716.
57. Berg AH, Scherer PE: Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research* 2005, 96(9):939-949.
58. Burnett MS, Lee CW, Kinnaird TD, Stabile E, Durrani S, Dullum MK, Devaney JM, Fishman C, Stamou S, Canos D *et al*: The potential role of resistin in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2005, 182(2):241-248.
59. Yaturu S, Daberry RP, Rains J, Jain S: Resistin and adiponectin levels in subjects with coronary artery disease and type 2 diabetes. *Cytokine* 2006, 34(3-4):219-223.
60. Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ: Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 2005, 111(7):932-939.
61. Chu S, Ding W, Li K, Pang Y, Tang C: Plasma resistin associated with myocardium injury in patients with acute coronary syndrome. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2008, 72(8):1249-1253.
62. Rae C, Graham A: Human resistin promotes macrophage lipid accumulation. *Diabetologia* 2006, 49(5):1112-1114.
63. Lee TS, Lin CY, Tsai JY, Wu YL, Su KH, Lu KY, Hsiao SH, Pan CC, Kou YR, Hsu YP *et al*: Resistin increases lipid accumulation by affecting class A scavenger receptor, CD36 and ATP-binding cassette transporter-A1 in macrophages. *Life sciences* 2009, 84(3-4):97-104.
64. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, Mickle DA: Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003, 108(6):736-740.
65. Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R: Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochemical and biophysical research communications* 2004, 314(2):415-419.
66. Robertson SA, Rae CJ, Graham A: Resistin: TWEAKing angiogenesis. *Atherosclerosis* 2009, 203(1):34-37.

67. Rothwell SE, Richards AM, Pemberton CJ: Resistin worsens cardiac ischaemia-reperfusion injury. *Biochemical and biophysical research communications* 2006, 349(1):400-407.
68. Robertson SA, Rae CJ, Graham A: Induction of angiogenesis by murine resistin: putative role of PI3-kinase and NO-dependent pathways. *Regulatory peptides* 2009, 152(1-3):41-47.
69. Sluimer JC, Daemen MJ: Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. *The Journal of pathology* 2009, 218(1):7-29.
70. Simons M, Ware JA: Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nature reviews Drug discovery* 2003, 2(11):863-871.
71. Sun L, Bai Y, Du G: Endothelial dysfunction--an obstacle of therapeutic angiogenesis. *Ageing research reviews* 2009, 8(4):306-313.
72. Graveleau C, Zaha VG, Mohajer A, Banerjee RR, Dudley-Rucker N, Stepan CM, Rajala MW, Scherer PE, Ahima RS, Lazar MA *et al*: Mouse and human resistins impair glucose transport in primary mouse cardiomyocytes, and oligomerization is required for this biological action. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280(36):31679-31685.
73. Ginnan R, Singer HA: PKC-delta-dependent pathways contribute to PDGF-stimulated ERK1/2 activation in vascular smooth muscle. *American journal of physiology Cell physiology* 2005, 288(6):C1193-1201.
74. van der Merwe JQ, Moreau F, MacNaughton WK: Protease-activated receptor-2 stimulates intestinal epithelial chloride transport through activation of PLC and selective PKC isoforms. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2009, 296(6):G1258-1266.
75. Lv P, Miao SB, Shu YN, Dong LH, Liu G, Xie XL, Gao M, Wang YC, Yin YJ, Wang XJ *et al*: Phosphorylation of smooth muscle $\alpha 22$ facilitates angiotensin II-induced ROS production via activation of the PKCdelta-P47phox axis through release of PKCdelta and actin dynamics and is associated with hypertrophy and hyperplasia of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Circulation research* 2012, 111(6):697-707.
76. Ren J, Wang Q, Morgan S, Si Y, Ravichander A, Dou C, Kent KC, Liu B: Protein kinase C-delta (PKCdelta) regulates proinflammatory chemokine expression through cytosolic interaction with the NF-kappaB subunit p65 in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 2014, 289(13):9013-9026.
77. Soeda J, Morgan M, McKee C, Mouralidarane A, Lin C, Roskams T, Oben JA: Nicotine induces fibrogenic changes in human liver via nicotinic acetylcholine

- receptors expressed on hepatic stellate cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2012, 417(1):17-22.
78. Mathur A, Vallano ML: 2,2',3,3',4,4'-Hexahydroxy-1,1'-biphenyl-6,6'-dimethanol dimethyl ether (HBDDE)-induced neuronal apoptosis independent of classical protein kinase C alpha or gamma inhibition. *Biochemical pharmacology* 2000, 60(6):809-815.
 79. Kholodenko R, Kholodenko I, Sorokin V, Tolmazova A, Sazonova O, Buzdin A: Anti-apoptotic effect of retinoic acid on retinal progenitor cells mediated by a protein kinase A-dependent mechanism. *Cell research* 2007, 17(2):151-162.
 80. Venugopal SK, Devaraj S, Yang T, Jialal I: Alpha-tocopherol decreases superoxide anion release in human monocytes under hyperglycemic conditions via inhibition of protein kinase C-alpha. *Diabetes* 2002, 51(10):3049-3054.
 81. Choe Y, Lee BJ, Kim K: Participation of protein kinase C alpha isoform and extracellular signal-regulated kinase in neurite outgrowth of GT1 hypothalamic neurons. *Journal of neurochemistry* 2002, 83(6):1412-1422.
 82. Tsao HK, Chiu PH, Sun SH: PKC-dependent ERK phosphorylation is essential for P2X7 receptor-mediated neuronal differentiation of neural progenitor cells. *Cell death & disease* 2013, 4:e751.
 83. UZUNER F: Spontan Hipertansif ve Normotansif Rat Aortası Vasküler Düz Kas Hücrelerinden Yapılan Primer Hücre Kültüründe ANG II Uyarımının NAD(P)H Oksidaz Enzim Kompleksi Üzerinden Süperoksit Anyonu Üretimine Etkisi ve Bu Metabolik Yolda SRC'nin Rolü. *Yüksek Lisans Tezi*. Antalya: Akdeniz Üniversitesi; 2009.
 84. Gorlach A, Brandes RP, Bassus S, Kronemann N, Kirchmaier CM, Busse R, Schini-Kerth VB: Oxidative stress and expression of p22phox are involved in the up-regulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2000, 14(11):1518-1528.
 85. Subramanian V, Golledge J, Heywood EB, Bruemmer D, Daugherty A: Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by angiotensin II via transforming growth factor-beta1-activated p38 mitogen-activated protein kinase in aortic smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2012, 32(2):397-405.
 86. Nabel EG, Braunwald E: A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 2012, 366(1):54-63.
 87. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P *et al*: From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmunity reviews* 2010, 9(12):830-834.

88. Zhang HM, Li XY, He ZY, Xu LZ, Jin Q, Tan H: Resistin-like molecule alpha enhances the proliferation and migration of aortic vascular smooth muscle cells. *Cardiology* 2013, 126(2):91-95.
89. Hirai H, Satoh H, Kudoh A, Watanabe T: Interaction between resistin and adiponectin in the proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Molecular and cellular endocrinology* 2013, 366(1):108-116.
90. Park SL, Won SY, Song JH, Kambe T, Nagao M, Kim WJ, Moon SK: EPO gene expression promotes proliferation, migration and invasion via the p38MAPK/AP-1/MMP-9 pathway by p21WAF1 expression in vascular smooth muscle cells. *Cellular signalling* 2015, 27(3):470-478.
91. Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO: Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2000, 279(3):L429-438.
92. Newton AC: Regulation of protein kinase C. *Current opinion in cell biology* 1997, 9(2):161-167.
93. Hug H, Sarre TF: Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *The Biochemical journal* 1993, 291 (Pt 2):329-343.
94. Touyz RM, Schiffrin EL: Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews* 2000, 52(4):639-672.
95. Paravicini TM, Touyz RM: NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes care* 2008, 31 Suppl 2:S170-180.
96. Hamilton M, Liao J, Cathcart MK, Wolfman A: Constitutive association of c-N-Ras with c-Raf-1 and protein kinase C epsilon in latent signaling modules. *The Journal of biological chemistry* 2001, 276(31):29079-29090.
97. Bao XM, Zheng H: Atorvastatin attenuates homocysteine-induced migration of smooth muscle cells through mevalonate pathway involving reactive oxygen species and p38 MAPK. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2015, 42(8):865-873.

ÖZGEÇMİŞ

Fatih UZUNER, 11.02.1979 tarihinde Antalya’da doğdu. İlkokulu 1990 yılında Antalya Gazi Mustafa Kemal İlkokulu’nda, ortaokulu 1993 yılında Antalya Atatürk Ortaokulu’nda, liseyi 1996 yılında Antalya Lisesi’nde, lisans öğrenimini 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde ve Yüksek lisans öğrenimini de 2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda tamamladı. 2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda doktora öğrenimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde doktora öğrenimine devam etmektedir. Yabancı dili İngilizcedir.