

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

**HİPERGLİSEMİNİN, KÜLTÜRE EDİLMİŞ RAT
AORTİK DÜZ KAS HÜCRELERİNDE
ANJİOTENSİN II UYARIMLI JAK2 VE STAT 1
FOSFORİLASYON YOLUNA ETKİSİ VE BU
YOLDA PDGF- β RESEPTÖRÜNÜN ROLÜ**

Oktay Hasan ÖZTÜRK

Doktora Tezi

Antalya, 2006

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

**HİPERGLİSEMİNİN, KÜLTÜRE EDİLMİŞ RAT
AORTİK DÜZ KAS HÜCRELERİNDE
ANJİOTENSİN II UYARIMLI JAK2 VE STAT 1
FOSFORİLASYON YOLUNA ETKİSİ VE BU
YOLDA PDGF- β RESEPTÖRÜNÜN ROLÜ**

Oktay Hasan ÖZTÜRK

Doktora Tezi

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

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No. 2003.03.122.002)

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

Antalya, 2006

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

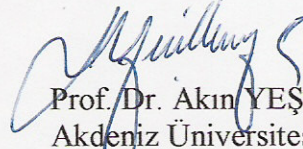
Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (orjinalleri ekte sunulmuştur).

1-Ozturk OH, Cetin A, Ozdem SS, Uysal N, Kayıslı UA, Sentürk UK, Yesilkaya A. Changes in nitrite, prostaglandin $F_{1\alpha}$ and nitrotyrosine levels in lipopolysaccharide-stimulated rats: functional and histochemical implications in aorta. J Physiol Biochem. Received 05 December 2005; accepted 30 January 2006.

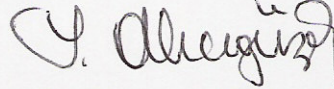
Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir./...../.....

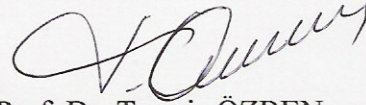
Tez danışmanı:


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

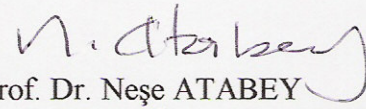
Üye


Prof. Dr. Yakup ALICIGÜZEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

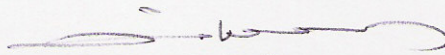
Üye


Prof. Dr. Tomris ÖZBEN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Üye


Prof. Dr. Neşe ATABEY
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye


Doç. Dr. Sibel KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ONAY: Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/..../2006 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurettin OĞUZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Diyabetik aterosklerozisin altında yatan temel nedenlerden biri hipergliseminin indüklediği vasküler düz kas hücre (VDKH) proliferasyonudur. Ang II ve Jak/STAT yolu, VDKH proliferasyonuna katkıda bulunmaktadır. Bu çalışmamızda VDKH'lerinde özellikle yüksek glukoz koşulları altında Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT1 fosforilasyonu gözlemlemek istedik. Bununla beraber VDKH'de Ang II uyarımlı Jak/STAT aktivasyonunda PDGF- β reseptör transaktivasyonun ve PKC'nin rolünü araştırmak istedik.

Yapılan çalışmalar sonucunda verilerimiz, aortik rat dokusunda elde edilen primer hücre kültürlerin düz kas α -aktin antikoru ile immünohistokimyasal olarak vasküler düz kas oldukları gösterildi. Jak2 ve STAT1 fosforilasyonu Ang II'nin 100 nM konsantrasyonu ve 5. dakikasında maksimum olduğu tespit edildi. Ang II uyarımlı gözlenen Jak2 ve STAT1 fosforilasyonunun AT1 reseptör aracılı olduğunu AT1 reseptör inhibitörü losartan kullanılarak gösterildi. 48 saat yüksek glukoz ile inkübe edilen hücrelerde hem Ang II uyarımlı hem de bazal Jak2-STAT1 fosforilasyonu; normal glukoz koşullarına göre artmış olarak bulunmuştur. Ayrıca PDGF- β reseptör inhibitörü AG1295 ve PKC inhibitörü GF109203X kullanılarak yapılan deneylerde, yüksek glukoz aracılı Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT1 sinyalizasyon artışın, PDGF- β reseptör ve PKC'den bağımsız gerçekleştiği gösterildi. Bu bulgulardan yola çıkarak Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT1 fosforilasyonu PDGF reseptörü üzerinden meydana gelmemektedir. PKC'nin de Jak2 ve STAT1 fosforilasyonunda etkili olmadığı yaptığımız çalışmada gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Anjiotensin II, yüksek glukoz, vasküler düz kas hücreler, Jak2, STAT1, PDGF- β reseptör, Protein kinaz C.

ABSTRACT

One of the basic underlying causes of diabetic atherosclerosis appears to be hyperglycemia-(HG) induced vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation. Jak/STAT pathway and Ang II contribute the VSMC proliferation. In this study, we aimed to observe Ang II induced Jak2 and STAT1 activation under hyperglycemic conditions. In addition we aimed to observe the PDGF receptor activation and effects of PKC on Ang II induced Jak/STAT phosphorylation.

In the end of the study, the presence of cultured rat aortic VSMCs were confirmed immunohistochemically with smooth muscle alpha-actin antibodies. Ang II stimulated Jak2 and STAT1 phosphorylation in 100 nM concentrations of Ang II in 5 minutes is maximum and the observed phosphorylation through AT1 reseptor was demonstrated using AT1 receptor inhibitor losartan. We observed that, VSMCs cultured in a high glucose environment for 48 hours increases both basal and Ang II induced Jak2 and STAT1 proteins than low glucose environment. We used in our experiments spesific PDGF- β receptor inhibitor AG1295 and PKC inhibitor GF109203X and found that high glucose levels increased Ang II stimulated Jak2 and STAT1 phosphorylations independent of PDGF- β receptor and PKC. According to our findings Ang II stimulated Jak2 ve STAT1 phosphorylation does not proceed via PDGF receptor. It is also demonstrated in this study that PKC does not effect Jak2 and STAT1 phosphorylation.

Key Words: Angiotensin II, high glucose, vascular smooth cells, Jak2, STAT1, PDGF- β receptor, Protein kinase C.

TEŞEKKÜR

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

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Sonsuz desteği için eşime ve aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Oktay Hasan ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Vasküler Duvar	4
2.1.1. Endotel Hücreleri	5
2.1.2. Vasküler Düz Kas Hücreleri	6
2.1.3. Adventisya	7
2.1.4. Ekstraselüler Matriks	7
2.2. Anjiyotensin II	7
2.2.1. Anjiyotensin II Reseptörleri	9
2.2.2. AT1 Reseptörü	9
2.2.3. AT2 Reseptörü	10
2.3. Ang II'nin Hücre İçi Sinyalleri AT1 Reseptörleri Aracılı İndüklenmektedir	11
2.3.1. Fosfolipidler Aracılı AT1 Sinyalizasyonu	11
2.3.2. AT1-Aracılı Tirozin Fosforilasyonu	13
2.3.3. Non-Reseptör Tirozin Kinaz Aktivasyonu	14
2.3.4. Reseptör Tirozin Kinazlar	20
2.3.5. Mitojen Aktive Edici Kinaz Sinyal İletim Yolu	21
2.3.6. Küçük G Proteinleri	23
2.3.7. Reaktif Oksijen Türlerin Oluşumu	24
2.3.8. Ang II, Proto-onkogen ve Büyüme Faktörlerin Ekspresyonun Artırmaktadır	24
2.4. Hiperglisemi ve Ang II Uyarımlı Sinyalizasyon	25

MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal ve Kimyasal Malzemeler	27
3.2. Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler	28
3.3. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu	28
3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar	28
3.3.2. Metod	29
3.4. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin Kültürü	30
3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar	30
3.4.2. Metod	30
3.5. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu	32
3.5.1. Hücrelerin İmmünohistokimya Preparatları Haline Getirilmesi	32
3.5.2. Kullanılan Solüsyonlar	32
3.5.3. Metod	33
3.6. VDKH Kültürlerinin Western Blot Analizi için Lizatlarının Hazırlanması	33
3.6.1. Kullanılan Solüsyonlar	33
3.6.2. Kullanılan Aktivatörler	33
3.6.3. Kullanılan İnhibitörler	33
3.6.4. Metod	34
3.7. Protein Miktarının Tayin Edilmesi	34
3.7.1. Protein Ölçüm Kitinin Prensibi	34
3.7.2. Kullanılan Malzemeler	34
3.7.3. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafiğin Hazırlanması	35
3.7.4. Numunelerin Protein Miktar Tayini	35
3.8. Jak2/STAT1 Fosforilasyonunun SDS-PAGE ve Western İmmüno blot Analizi	36
3.8.1. Elektroforez Jelinin Hazırlanması	36
3.8.2. Jelin Hazırlanması ve Gerekli Kimyasalların Miktarı	36
3.8.3. Jelin Dökülmesi İşlemi	37
3.8.4. Elektroforez İşlemi	38
3.8.5. Elektroforez Jelinin Membrana Aktarılması	39
3.8.6. Membranların Antikor ile İşaretlenmesi	39
3.8.7. Membrandaki Sinyallerin Filme Aktarılması	41
3.8.8. Sinyallerin Grafik Haline Dönüştürülmesi	41

BULGULAR

- 4.1.** Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu **42**
- 4.2.** Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımıyla Jak2/STAT1 Aktivasyonu **43**
- 4.2.1.** VDKH'lerinde Ang II'nin Jak2 Fosforilasyonu Üzerine Doz ve Zaman Bağımlı Etkileri **43**
- 4.2.2.** VDKH'lerinde Ang II'nin Stat1 Fosforilasyonu Üzerine Doz ve Zaman ve Bağımlı Etkiler **45**
- 4.2.3.** VDK Hücrelerinde Ang II'nin AT1 Reseptörü Üzerinden Jak2 Fosforilasyonu **47**
- 4.2.4.** VDKH'lerinde Ang II'nin AT1 Reseptörü Üzerinden Stat1 Fosforilasyonu **48**
- 4.2.5.** VDKH'lerinde Yüksek Glukozun Ang II uyarımlı Jak2 Fosforilasyonuna Etkisi **49**
- 4.2.6.** VDKH'lerinde Yüksek Glukozun Ang II uyarımlı Stat1 Fosforilasyonuna Etkisi **50**
- 4.2.7.** VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Jak2 Fosforilasyonunda PKC ve PDGF- β Reseptörünün Rolü **51**
- 4.2.8.** VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Stat1 Fosforilasyonunda PKC ve PDGF- β Reseptörünün Rolü **53**

TARTIŞMA **56**

SONUÇLAR **61**

KAYNAKLAR **62**

ÖZGEÇMİŞ **73**

EKLER **74**

Ek 1: Kabul Mektubu, Journal of PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY

Ek 2: **Ozturk OH**, Cetin A, Ozdem SS, Uysal N, Kayıslı UA, Sentürk UK, Yesilkaya A. Changes in nitrite, prostaglandin F_{1 α} and nitrotyrosine levels in lipopolysaccharide-stimulated rats: functional and histochemical implications in aorta. J Physiol Biochem.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (Angiotensin Converting Enzyme)
AEC	: Amino Etil Karbizol
Ang I	: Anjiyotensin I
Ang II	: Anjiyotensin II
Ang IV	: Anjiyotensin IV
APS	: Amonyum Persülfat
AT1R	: AT1 Reseptörü
AT2R	: AT2 Reseptörü
BMK	: Büyük MAP kinaz (Big MAP kinase)
BSA	: Bovine Serum Albumin
Ca⁺²	: Kalsiyum
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
DAG	: Diaçil Gliserol
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EAS	: Enzim Ayrışma Solüsyonu
ECL	: Enhanced Kemilüminesans
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EGTA	: Etilenbis-(oksietilennitrilo)-tetraasetikası
ERK 1/2	: Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz 1/2 (Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2)
ET-1	: Endotelin 1
FAK	: Fokal Adhezyon Kinazlar
GAS	: Gama Aktive Bölge (Gama-Activated Site)
GDP	: Guanozin difosfat

GRK	: G protein Reseptör Tirozin Kinaz
GTP	: Guanozin Trifosfat
HBSS	: Hank'in Dengeli Tuz Solüsyonu (Hank's Balanced Salt Solution)
HRP	: Horse - Radish Peroksidaz
IFN-α	: İnterferon- α
IGFR	: İnsülin-benzeri büyüme faktör Reseptörü (Insulin-like Growth Factor-Receptor)
IL-1	: İnterlökin 1 (interleukin 1)
IP3	: İnositol Trifosfat
Jak	: Janus Kinaz
JNK	: c- Jun N-terminal Kinazlar
MAPK	: Mitojen Aktive edici Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)
MCP-1	: Makrofaj Kemoatraktant Protein 1 (Macrophage Chemoattractant Protein 1)
MKK	: MAPK Kinazlar, MEK
MKKK	: MAPK Kinaz Kinaz, MEKK
MKP-1	: MAPK Fosfataz-1 (MAP Kinase Phosphatase-1)
NaF	: Sodyum Florid
Na-O-Va	: Sodyum orto-Vanadat
NEP	: Nötral eEndopeptidaz
NO	: Nitrik Oksit
PDGFR	: Trombosit-türevli büyüme faktör Receptor (Platelet-Derived Growth Factor Receptor)
PG	: Prostaglandin
PGI₂	: Prostatiklin
PI3K	: Fosfotidilinositol 3-kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
PKD	: Protein Kinaz D
PLA₂	: Fosfolipaz A ₂
PLC	: Fosfolipaz C
PLD	: Fosfolipaz D

PMSF	: Fenilmetansulfonilflorid
PtdIns	: Fosfotidil İnozitol
PTPaz	: Protein Tirozin Fosfotaz
PYK2	: Prolinden zengin tirozin kinaz 2
RAS	: Renin Anjiyotensin Sistemi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
SAPK	: Stres Aktive edici Protein Kinazlar (Stress- Activated Protein Kinase)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
Sos	: Son-of-sevenless
STAT	: Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü (Signal Transducers and Activators of Transcription)
STİ	: Soya Tripsin İnhibitör
TBS	: Tris Buffer Salin
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü β (Transforming Growth Factor β)
TNF-α	: Tümör Nekrozan Faktör- α
tPA	: Doku Plazminojen Aktivatör
VDKH	: Vasküler Düz Kas Hücresi

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1.1. Vasküler hastalıklarda endotel fonksiyon bozukluğu	6
2.2.1. AT1 ve AT2 Reseptör Alt Tiplerinin Karakterizasyonu	11
3.3.1. Enzim Ayrışma Solüsyonu Bileşenleri ve Miktarları	29
3.8.1. Ayrışma Jeli Tamponu ve Miktarları	36
3.8.2. Yükleme Jeli Tamponu ve Miktarları	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1.1. Arteriyal Duvarın Segmentleri	5
2.2.1. Klasik Renin-Anjiyotensin Sistem Şeması	8
2.3.1. Fosfolipid Türevi İkinci Mesajcılar	13
2.3.3. Jak-STAT Sinyal Yolu	17
2.3.2. Tirozin kinaz Yolları Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Tarafından Uyarılır	19
2.3.4. VDKH'lerinde Ang II Uyarımıyla p42/p44 MAPK Bağımlı Sinyal Yollarının Üst Basamak Düzenlenmesi	23
2.4.1. Diyabet İlişkili Vasküler Hastalıklara Neden Olabilecek Ana Basamaklar	26
3.7.1. Protein Standart Grafiği	35
4.1.1. Vasküler Düz Kas Hücre Kültürlerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu	43
4.2.1. VDKH'lerinde Ang II'nin Farklı Konsantrasyonlarının Jak2 Aktivasyonu Üzerine Etkisi	44
4.2.2. VDKH Kültürlerinde Ang II'nin Jak2 Üzerine Farklı Sürelerde Aktivasyonları	45
4.2.3. VDKH'lerinde Ang II'nin Farklı Konsantrasyonlarının Stat1 Aktivasyonu Üzerine Etkisi	46
4.2.4. VDKH Kültürlerinde Ang II'nin STAT1 Üzerine Farklı Sürelerde Aktivasyonları	47
4.2.5. VDKH kültürlerinde Ang II'nin Jak2 fosforilasyonunda AT1 reseptörünün rolü	48
4.2.6. VDKH kültürlerinde Ang II'nin Stat1 fosforilasyonunda AT1 reseptörünün rolü	49
4.2.7. VDKH'lerinde Yüksek Glukozun Ang II uyarımlı Jak2 Fosforilasyonuna Etkisi	50

4.2.8. VDKH'lerinde Yüksek Glukozun Ang II uyarımlı Stat1 Fosforilasyonuna Etkisi	51
4.2.9. VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Jak2 Fosforilasyonunda PKC ve PDGF- β Reseptörünün Rolü	52
4.2.10. VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Jak2 Fosforilasyonunda PKC ve PDGF- β Reseptörünün Rolü	53
4.2.11. VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Stat1 Fosforilasyonunda PKC ve PDGF- β Reseptörünün Rolü	54
4.2.12. VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Stat1 Fosforilasyonunda PKC ve PDGF- β Reseptörünün Rolü	55

GİRİŞ ve AMAÇ

Diyabetes mellitus, pankreasın insülin salgısının veya etkisinin yetersizliği ile oluşan endokrin ve metabolik bir hastalıktır (1). Diyabetin en önemli mortalite ve morbidite sebebi vasküler komplikasyonlardır (2). Diyabet ile ilişkili bu komplikasyonlardan en sık görülenleri, vasküler fonksiyon bozukluğu ve aterosklerozisdir (3,4).

Anjiyotensin II (Ang II), renin-angiotensin sisteminin bir major efektör peptididir. Ang II renin ile birlikte çalışan, kan basıncının kontrolünde önemli rolü olan bir maddedir. Ayrıca Ang II, damar düz kaslarına çeşitli etkiler gösteren çok fonksiyonel bir peptiddir; vazomotor tonusu düzenler, hücre büyümesi ve apoptozisi regüle eder, hücre göçü ve ekstraselüler matriks değişimini etkiler, proinflamasyonu, diğer büyüme faktörlerini (örneğin, Platelet türevli büyüme faktörü, PDGF) ve endotelin 1 gibi vazokonstriktörleri stimüle eder (5).

Ang II, AT1 ve AT2 olarak adlandırılan iki reseptörüne yüksek afinite ile bağlanır (5). Yapısı ve fonksiyonu iyi anlaşılmış olan AT1 reseptörü, G proteinine bağlı reseptörler arasında olup 7 transmembran heliksdan oluşur. Ang II'nin AT1 reseptörleri üzerinden bir çok sinyal iletim yolunu uyararak vasküler fonksiyonların kontrolünde önemli rol oynadığı bilinmektedir (5,6,7).

Vasküler düz kas hücre (VDKH) proliferasyonu, Ang II'yi içeren bir çok hormon ve büyüme faktörleri tarafından stimüle edilmektedir (8, 9). Yüksek glukoz koşullarda üretilen VDKH kültürleri normol glukoz koşullardaki kültürlere göre daha hızlı proliferasyon gösterdikleri gözlenmiştir (9). Ang II uyarımlı mitojen uyarımlı protein kinaz (MAPK; Mitogen-activated protein kinases) aktivasyonu, hiperglisemik koşullar altında yapılan düz kas hücre kültürlerinde artmış olarak bulunmuştur (10). Yüksek glukozu cevaben MAPK yolunun aktivasyonu VDKH'lerin proliferasyonunu, gen ekspresyonunu ve büyümesini arttırabilir (10, 11). Diyabetik aterosklerozisin altında yatan temel nedenlerden biri hipergliseminin indüklediği vasküler düz kas hücre (VDKH) proliferasyonudur (3, 10). Vasküler düz kas hücre proliferasyonunun Ang II ile indüksiyonunu içeren diğer bir yol, Jak-STAT (Janus kinases-Signal transducers and activators of transcription)'dır (9).

İnterferon- α (IFN- α)'nın genleri hızlıca indüklenme özelliği Jak-STAT yolunun keşfine yol açmıştır (11). Ligandlar (Örneğin hematopoietinler, Ang II,

interferonlar), dimerik reseptörlerine bağlandığı zaman reseptörler ilişkili Jak'lara uygun konformasyonel değişikliğe uğrarlar. Takiben Jak'lar spesifik tirozin motiflerinden fosforlanarak aktive olurlar. Bu motifleri tanıyan STAT'lar, Jak-bağımlı tirozin fosforilasyonu ile aktive olurlar (11). STAT'lar aktive oldukları zaman reseptörlerinden ayrılırlar ve karşılıklı olarak etkileşerek dimerize olurlar. Klasik olarak sadece aktive ve dimerize STAT'lar DNA'ya bağlanabilme ve hızlı nükleer transkripsiyona neden olabilmektedir. Nukleusda bir çok STAT dimeri, artırıcı DNA bölgelerinden (enhancer) GAS (gama-activated site) ailesi üyelerini tanıyarak ve onlara bağlanırlar (12,13). Saatler içinde ligandların stimüle ettiği sinyaller azalır ve STAT'lar tekrar sitoplazmaya döner (14).

Diyabette uzamış hiperglisemi, diyabetin indüklediği vasküler hastalıkların komplikasyonlarının gelişmesinde anahtar rolü oynayabilmektedir. Kronik hiperglisemi, protein kinaz C (PKC)'nin kronik aktivasyonu, ileri düzeyde glikasyon olmuş son ürün (AGE; advanced glycation end products)'lerin oluşumunun artması, poliyol yolunun uyarımı, reaktif oksijen ürünleri (ROS)'lerin artmış üretimi gibi birçok mekanizma ile vasküler inflamasyonu düzenleyerek, büyüme faktörleri ve sitokinlerin gen ekspresyonlarını değiştirerek, trombosit ve makrofaj aktive ederek diyabetik vasküler komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır (15). Bu konuda yapılan deneysel çalışmalar içerisinde Natarajan ve arkadaşları tarafından 1992'de yapılan bir çalışmada, hiperglisemik koşullar altında vasküler düz kas hücre kültürlerinin, normoglisemik koşullara göre hızlı proliferasyona girdikleri gösterilmiştir (16). Vazoaktif bir peptid olan Ang II'nin, vasküler fonksiyon bozukluğunda vasküler düz kas hücrelerinde hücre büyümesi, migrasyon ve hipertrofiyi içeren birçok etkileri bulunmaktadır (17). Ayrıca hipergliseminin Ang II ile uyarımlı vasküler düz kas hücre proliferasyonuna katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir (9). Bu bağlamda hiperglisemi ve Ang II'nin indüklediği sinyalizasyonunun ilişkisi gösterilmiştir (10). Yine Natarajan ve arkadaşlarının 1999'da domuz aortik vasküler düz kas hücrelerinde yapılan çalışmada, kısa etkili (0,5 saat) hiperglisemik kültürlerde normoglisemiye göre Ang II'nin stimüle ettiği ERK 1/2 ve p38 MAPK fosforilasyonunu yaklaşık iki kat fazla bulunmuştur (10). Benzer şekilde Marrero ve arkadaşlarının 1999'da rat aortik düz kas hücrelerinde yaptıkları çalışmada, hipergliseminin Ang II ile indüklenmiş Jak-STAT sinyalizasyonu üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Yüksek glukoz konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen hücre kültürlerinde, normoglisemik kültürlerle göre, Ang II uyarımlı Jak ve STAT fosforilasyonunun artışı görülmüştür. Hiperglisemik koşullarda özellikle Jak2'nin, hem fosforilasyonunda hem de AT1 reseptörü ile kompleks oluşumunda artış gözlenmiştir (18). Araştırmalarda hipergliseminin potansiyel etkileri sonucu tespit edilen bu artışların mekanizmasından bahsedilmemiştir. 1992'de Williams ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, vasküler düz kas hücrelerinin 20 mM glukoz

konsantrasyonunda Ang II'nin reseptörüne bağlanmada down regülasyona uğradığı gözlenmiştir (19). Ayrıca bazı çalışmalarda vasküler düz kas hücrelerinde hipergliseminin artan PDGF- β reseptör ekspresyonu ile ilişkili olduğunu ve PDGF-BB aracılı vasküler düz kas hücrelerinin göçünü, büyümesini ve DNA sentezini artırdığını göstermişlerdir (20, 22). Bununla birlikte Ang II, doğrudan reseptör tirozin kinazlardan (RTK) PDGF reseptörüne bağlanmamasına rağmen aktive edebilmektedir (5). Vignais ve arkadaşlarının 1996'da çeşitli hücre dizisi kültürlerinde yaptığı çalışmalarda, PDGF reseptörlerinin aktivasyonu bir çok Jak-STAT ailesinin fosforilasyonunu aktive etmektedir (21).

Diyabetik hayvanların birçok dokularında artan PKC aktivitesi ve diasilgliserol (DAG) seviyeleri gösterilmiştir (23). Aortik ve vasküler hücrelerde diyabetik ratlarda hiperglisemiye cevap olarak PKC- β II ve PKC- ζ izoformlarının aktive oldukları gösterilmiştir. Tavşan aortik VDKH'in 27,5 mM glukoz ile 5 gün inkübasyonu sonrası total PKC aktivitesinde artış görülmüş ve bu artış PKC genel inhibitörü ile baskılanmıştır. Ancak hipergliseminin PKC üzerine akut etkileri oldukça farklıdır. Çünkü VDKH dizilerinin 25 mM glukoz ile 6 saat inkübasyon sonrası PKC- β II'nin mRNA seviyeleri ve protein ekspresyonu azalmış, PKC- β I seviyeleri değişmemiştir (6). VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Jak-STAT aktivasyonunda PKC'nin rolü hakkında bulgular yetersizdir.

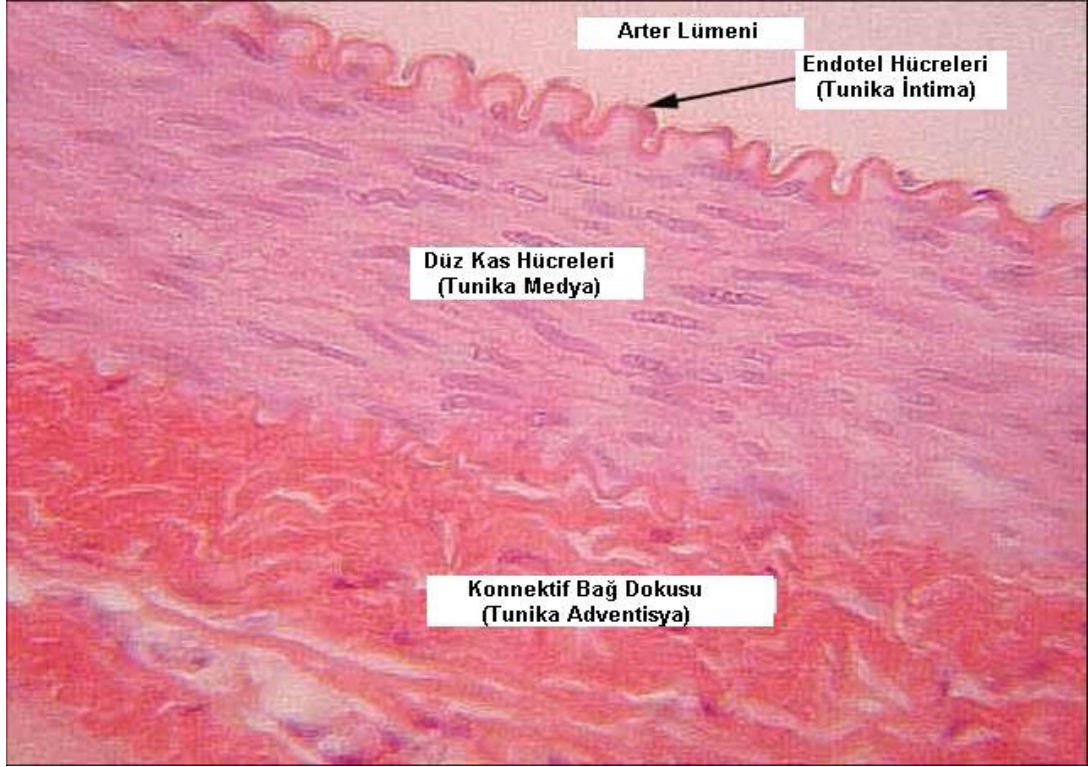
Hiperglisemi ve Jak-STAT yolunun her ikisinde vasküler düz kas hücrelerin proliferasyonuna önemli katkıları bulunduğu bildirilmektedir (18). Ancak VDKH'lerinde hiperglisemi ile artan Ang II uyarımlı Jak-STAT sinyalizasyonun hangi mekanizma üzerinden gerçekleştiği konusunda bulgular yetersizdir. Yüksek glukoz ile artan Ang II uyarımlı Jak-STAT sinyalizasyonu için muhtemel mekanizmanın PDGF reseptörleri üzerinden sağladığı Srivastata tarafından öne sürülmektedir (23). Bunu ortaya koymak için bu çalışmada rat aortik VDKH'leri, hiperglisemik ortamda Ang II uyarımlı Jak-STAT yolağında PDGF- β reseptörünün rolü araştırıldı. İlk aşamada hiperglisemik ve normoglisemik ortamlarda inkübe edilen vasküler düz kas hücrelerinde, Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT1 fosforilasyonunu gözlendi. Hiperglisemik ve normoglisemik koşullarda Ang II uyarımı ile PDGF- β reseptörün etkisi, spesifik reseptör inhibitörünü kullanarak (AG1295) sinyal iletiminde Jak2 ve ve STAT1 fosforilasyonuna bakıldı. Ayrıca bu yol üzerinde PKC fonksiyonunu göstermek için genel PKC inhibitörü olan GF109203X ilave edilerek Jak2 ve STAT1 fosforilasyonu gözlendi. Elde edilen bulgular değerlendirilip literatür bilgileri doğrultusunda yorumlandı.

GENEL BİLGİLER

Diyabetes mellitus, pankreasın insülin salgısının mutlak veya kısmi yetersizliği veya insülin etkisinin yetersizliği ile oluşan, karbohidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ile karakterize, endokrin ve metabolik bir hastalıktır (1). Diyabetin en önemli mortalite ve morbidite sebebi vasküler komplikasyonlardır (2). Diyabet ile ilişkili bu komplikasyonlardan vasküler fonksiyon bozukluğu ve aterosklerozis en sık görülenleridir (3,4). İlerlemiş glikolize son ürün oluşumu ile ortaya çıkan makromoleküllerin non-enzimatik modifikasyonu, glikosorbitol ve miyo-inozitol metabolizmasındaki değişiklikler, oksidan oluşumunda artış ve bu oksidatif stresin birçok sinyal yollarını aktive etmesi, ekstraselüler matriks molekül üretimindeki artış ve endotel hücreleri tarafından intima tabakasına yerleşen lipoprotein moleküllerinin oksidasyonu ile oluşan okside LDL' nin bir dizi zincirleme olayı tetiklemesi gibi birçok mekanizmaların diyabetik vasküler komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Diyabetik aterosklerozisin altında yatan temel nedenlerden bir diğeri hipergliseminin indüklediği vasküler düz kas hücre proliferasyonudur (23).

2.1. Vasküler Duvar

Vasküler duvar, histolojik olarak üç farklı katdan (tunika) oluşmaktadır. En içteki tabaka damarın iç yüzeyini döşeyen bazal membranın üzerinde tek sıralı endotelial hücrelerin oluşturduğu intima tabakasıdır. Bazal membranın altında seyrek düz kas hücreleri içerebilen gevşek bağ dokunun oluşturduğu subendotelial tabaka ile endotelial hücrelere esneklik ve sağlamlık sağlayan internal elastik lamina bulunur. Bu lamina, damar duvarının derinlerinde yer alan hücreleri besleyecek ve çeşitli maddelerin diffüzyonunu sağlayacak biçimde aralıklı bir yapı (fenestrae) gösterir. Orta tabakada (tunika medya) başlıca heliks biçiminde dizilmiş düz kas hücrelerin konsantrik tabakalarından ve hemostatik vasküler tonusa önemli katkısı olan elastin fiberlerden oluşmaktadır. En dış katman ise (tunika adventisya) longitudinal dizilimli kollagen ve elastik liflerden oluşan damarların etrafını saran fibro-elastik bir bağ dokusudur. Ayrıca adventisya tabakasının etrafını saran özellikle büyük damarların innervasyonunu sağlayan vasomotor sinirler ve damarların beslenmesini sağlayan vaso vasorumlar (damarın damarı) bulunmaktadır (24) (Şekil 2.1.1.).



Şekil 2.1.1.: Arteriyal Duvarın Segmentleri. Arterial segmentler içten dışa doğru tek katlı endotel hücreleri (intima), düz kas hücre tabakası (media), fibroblast ve elastik fiberlerin (adventisya) oluşturduğu yapılardan meydana gelmiştir (25).

2.1.1. Endotel Hücreleri

Vasküler endotel, arter duvarı ile kan elemanları arasında tek sıra dizilmiş hücrelerden oluşan, vücudun en önemli sekretuar organlarından biridir. Endotel hücre tabakasının bütünlüğü normal vasküler fizyolojisi için önemlidir, çünkü endotel fonksiyon bozukluğu vasküler patolojilerde kritik bir faktördür (26). Endotel hücreler yüksek bir sentez kapasitesine sahiptir. Normal hemostatik koşullarda endotel hücreleri yalnızca fonksiyonel bir bariyer değil aynı zamanda tromboresistan bir yüzey sağlayarak koagülasyon kaskadında major rol oynayan pek çok vazoaktif madde ile bağ dokusu yapılarının sentezinden sorumlu metabolik olarak aktif bir dokudur. Hasarlanmamış endotel yüzeyi heparan sülfatla kaplı olmasına ve salgıladığı prostasiklin (PGI_2), nitrik oksit (NO), doku plazminojen aktivatör (tPA) gibi anti-trombotik ve fibrinolitik faktörleri ile bu fizyolojik fonksiyonlarını meydana getirmektedir (27). Endotel fonksiyon bozukluğu, plazma lipoproteinlerin subendotele geçişinin ve kan kaynaklı lökositlerin adhezyonun artışı ile sonuçlanmaktadır. Bunlara ilaveten lokal pro- ile anti-trombotik faktörlerin, büyüme faktörleri ile inhibitörlerin ve vazoaktif (dilatatör ve konstriktör) maddelerin aralarındaki dengesizlikte söz konusudur (Şekil 2). Ayrıca endotel hücreleri aterogeneizde rol oynayan çok sayıda maddenin ve bağ dokusu elemanlarının sentezinden sorumludur. Bunların arasında endotelin, anjiyotensin dönüştürücü

enzim gibi vazoaktif aminler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri ve tümör nekrozan faktör- α (TNF- α) ve interlökin-1 (IL-1) gibi endotel proliferasyonunu inhibe eden maddeler de vardır (27).

Tablo 2.1.1.: Vasküler hastalıklarda endotel fonksiyon bozukluğu: VDKH'lerin proliferasyon ve migrasyonunu stimüle eden büyüme faktörlerin, prokoagulan faktörlerin ve inflamatuvar hücrelerin komotaksisine katkıda bulunan inflamatuvar faktörlerin salınımı ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte endotel hücrelerin normal hemostatik koşullarda sentezlediği prostasiklin ve tPA gibi anti-trombotik faktörlerin ve vasküler tonusun devamlılığını sağlayan NO gibi vazo-relaksanların sekresyonu da azalmaktadır.

Artan Faktörler	Azalan Faktörler
<ul style="list-style-type: none"> - Prokoagulan Faktörler (vWF, TXA₂, PAF, PAI-1, 2) - Kontraksiyon (ACE, TXA₂, Lökotrienler, Radikaller, Endotelin) - Büyüme Faktörleri (PDGF, EGF, IGF, TGF-β, GM-CSF) - İnflamasyon Medyatörleri (IL-1, 6, 8, MCP-1 ve 2, MCH) 	<ul style="list-style-type: none"> - Anti-trombotik Faktörler (PGI₂, Trombomodulin, tPA, Heparan Sülfat) - Relaksasyon (NO, PGI₂/E₂, EDHF)

2.1.2. Vasküler Düz Kas Hücreleri (VDKH)

VDKH'leri vasküler duvarda en çok bulunan hücre tipidir. VDKH'leri, vasküler tonusun ve arteriyal kontraksiyonun devamlılığını sağlamada en önemli rolü üstlenmektedir. Ancak bu hücreler *in vivo* ve *in vitro* değişik fenotiplerde eksprese edilebilmektedir. Normal arter duvarında bulunan VDKH'leri total sitoplazmasının %70-80 oranında kontraktil filamentlere sahip olduğundan kontraktil fenotip olarak tanımlanmıştır. Bu hücreler dinlenme halindeki arterlerin tonusunun devamlılığını sağlamaktadır. Kontraktil tip VDKH'leri golgi cisimciği, serbest ribozomlar ve ribozomal endoplazmik retikulum gibi birkaç organelle sahiptir (28). Bu hücreler, endotelin, katekolamin, anjiyotensin II gibi vazokonstriktörlere ve prostaglandin E, PGI₂, NO, nöropeptitler, lökotrienler gibi vazodilatatörlere yanıt verirler. Bununla beraber, PDGF gibi mitojenlere kayıtsızdır (30).

Bununla beraber balon kateterizasyon sonrası arteriyal hasar gibi çevresel etkenlere cevaben kontraktil tip VDKH'leri fenotip değişikliğe uğramakta, medya tabakasından internal elastik laminaya ve sonrasında intima tabakasına doğru prolifere olmaktadır. Sentez fonksiyonu olan bu hücreler sentetik tip olarak adlandırılır. Sentetik tip VDKH'leri az miktarda miyofilamentler içermesine rağmen büyük oranlarda golgi cisimciği, serbest ribozomlar ve ribozomal endoplazmik retikulum

içerdiklerinden dolayı ekstraselüler matriks üretiminde aktif görev almaktadırlar. Bu fenotip aterosklerotik lezyonlarda bulunan gruptur ve kontraktıl fenotipin aksine vazoaktif maddelere yanıtız kalırken, PDGF gibi mitojenler tarafından uyarılarak lezyonun proliferatif aşamasında aktif rol alırlar. Bu yüzden, düz kas hücrelerinin intimada birikmesi, ilerlemiş lezyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir (30).

2.1.3. Adventisya

Adventisya büyük oranda fibroblastlardan oluşmasına rağmen basit yapısal bir tabaka değildir. Adventisya damarın sempatik ve parasempatik innervasyonunu içeren bölgedir. Bu sinirlerden salınan nörotransmitterler vazomotor tonusun düzenlemeye yardımcı olmakta ve damarın endotel disfonksiyon periyodunda kompensatuvar bir vazodilatasyonu sağlamaktadır. Adventisya mast hücrelerini de içeren bölge olup akut koroner sendromunda plak rüptürü ile bu hücrelerin açığa çıktığı gösterilmiştir. Bununla birlikte adventisyal fibroblastların lümene doğru migrasyon özelliğinin olduğu, mitogenleri ve serbest radikalleri salgıladığı dolayısı ile ateroskleroz patogeneze katkıda bulunduğı bildirilmiştir (31).

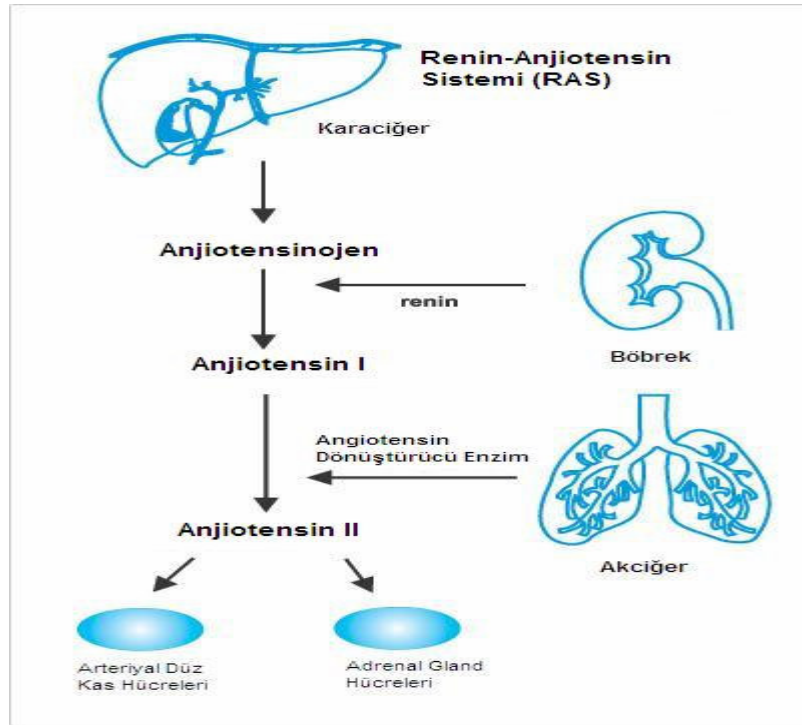
2.1.4. Ekstraselüler Matriks

Normal damar duvarının hücreleri proteoglikanlar, hiyaluronan, kollagen ve elastik elementlerden oluşan ekstraselüler matriks (ECM) içinde gömülüdürler. VDKH'leri tarafından sentezlenen elastin fiberleri damar duvarlarının birçok tabakalarını ayırmakta ve pulsatil kan akımına uyum için gerekli olan arteriyal esnekliğı sağlamaktadır. Subendotelyal boşlukta yer alan proteoglikanlar, bir veya daha fazla polisakkaritlere bağlanmış bir çekirdek proteini içeren hidrofilik moleküllerdir. Bunlar doku yapısının korunması ve geçirgenliğın sağlanmasında rol almaktadırlar (32). Hiyaluronanlar ECM içinde yüksek ağırlıklı polisakkaritler olup yüksek miktarda suya bağlanarak viskoz gel halindedirler. Bu sayede ECM dışardan basınçlara karşı direnç gösterebilmektedir. Heparan sülfat proteoglikanlar, ECM'in bir parçasıdır ve glikozil fosfotidil inositol çapaları aracılığı ile hücre membranlarına gömülüdürler. Böylelikle hücreler arasında yakın ilişki kurmaktadır. Heparan sülfat yapı olarak heparinlere benzemektedir. Bunlar VDKH'lerin proliferasyonunu hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda inhibe ettiği bilinmektedir. Genel olarak ECM, vasküler doku hücrelerine yapı iskeleti sağlamaktadır. Ayrıca ECM, VDKH'lerinin proliferasyon ve migrasyonunu engelleyici sakin bir durumun devamına katkıda bulunmaktadır.

2.2. Anjiyotensin II (Ang II)

Bir oktapeptid olan Ang II, renin anjiyotensin sisteminin (RAS) aktif bir bileşenidir. Ang II sistemik olarak klasik RAS ve lokal olarak ta doku RAS aracılı üretilmektedir. Klasik RAS'ta kan basıncının azalması sonucu böbreklerden

sentezlenen renin, dekapeptid olan anjiyotensin I (Ang I)'ı oluşturmak için hepatik kaynaklı anjiyotensinojeni (Renin substratı) N- terminalinden keser. Anjiyotensin I, akciğerde dipeptidil karboksipeptidaz olan anjiyotensin dönüştürücü enzim (Angiotensin-converting Enzyme, ACE) tarafından aktif olan Ang II'ye dönüştürülür. Bu dönüşüm vücudun birçok bölümlerinde görülmekte birlikte büyük oranda kanın akciğerlerden geçişi sırasında gerçekleşir (Şekil 2). Ayrıca Ang I, üç doku nötral endopeptidaz (NEP 24.11, NEP 24.15, NEP 24.26) tarafından heptapeptid olan Ang-(1-7)'ye çevrilebilir. Ang II aminopeptidazlar tarafından Ang III ve Ang IV'e yıkılır (33, 34). Ang II, arteriyal düz kas hücrelerinde vazokonstriksiyon, adrenal gland hücrelerinden aldosteron salgılatarak kan basıncını yükseltmek için kan basıncını düzenler.



Şekil 2.2.1: Klasik Renin-Anjiyotensin Sistem Şeması. Dolaşımdaki renal kökenli renin, hepatik kökenli anjiyotensinojeni parçalar ve bir dekapeptid olan anjiyotensin I (AngI)'i oluşturur. Akciğerdeki ve dokulardaki ACE, Ang I'i Ang II'ye dönüştürür (33).

RAS ilk keşfedildiği dönemlerde dolaşım sisteminin bir komponenti olarak düşünülmüş, ancak RAS'ın birçok bileşeninin dokularda da (lokal doku RAS) varlığı gösterilmiştir. Örneğin plazmada bulunan ACE aynı zamanda intertisyum ve intraselülerde de bulunmaktadır. Doku ACE, bütün major organlarda (kalp, beyin, adrenal bez, böbrekler, karaciğer, üreme organları ve kan damarlarında) bulunmaktadır (35). Renin hariç, RAS'ın tüm bileşenlerinin damarsal yapılarda üretildiği gösterilmiştir. Vasküler renin olmamasına rağmen, intertisyumda Ang II'nin lokal üretimi doku ACE tarafından düzenlenmektedir.

Ang II oluşumunun ACE bağımlı yollarına ek olarak ACE bağımsız yolların da patolojik durumlarda önemli katkılarının olabileceği gösterilmiştir. Serin proteazlara benzer kimotripsinin (kimaz), insan kalbinde Ang I'in Ang II'ye dönüşümü için önemli bir yol olabileceği gösterilmiştir (36, 37). Kimaz ve ACE bağımsız yol insan damar dokusunda ve doku karotid arterinde de gösterilmiştir (38).

Ang II, fizyolojik koşullarda kan basıncı ve sıvı hemostazını düzenleyen potent bir vazokonstriktör olarak tanımlanmış, fakat şimdilerde Ang II, hücre büyümesi, apoptoz, migrasyon, inflamasyon ve fibrosizi içeren vasküler fonksiyonların düzenlenmesinde rol alan birçok hücrenel olayı etkileyen multifonksiyonel bir hormon olduğunun farkına varılmıştır (39).

2.2.1. Anjiyotensin II Reseptörleri

“İntraselüler sinyalizasyon yolu” terimi, birbiri ile ilişkili moleküller kaskadları ile proteinlere bilgi transferini içermektedir. Böylelikle membran reseptörlerinden intraselüler proteine bilgi transferi sağlanmakta, hücre aktiviteleri düzenlemektedir. Ang II, memeli hücrelerinde yüksek afiniteli plazma membran reseptörleri AT1 ve AT2 aracılığı ile etkilerini göstermektedir. AT1 ve AT2 reseptör tipleri klonlanmış ve farmakolojik olarak karakterize edilmiştir. Bu reseptörlerin her ikisinde G proteinine bağlı reseptörler arasında olup 7 transmembran heliksinden oluşur. AT1 ve AT2 reseptörleri farmakolojik olarak spesifik antagonistleri ile inhibisyonuna göre ayırt edilmiştir (Tablo 2.2.1). Diğer iki Ang reseptörleri AT3 ve AT4 alt tipleri de tanımlanmıştır. Ancak bu reseptörler farmakolojik olarak tam karakterize edilememiştir. Bu reseptör alt tipleri (AT3 ve AT4) sadece hücre dizilerinde gözlemlendiğinden dolayı memeli Ang II reseptörlerinin sınıflandırmasına girmemiştir (40).

2.2.2. AT1 Reseptörü

İnsanlarda sadece bir tip AT1 reseptörü tanımlanmış iken kemirgenlerde iki alt tip AT1 reseptörü (AT1a ve AT1b) tanımlanmıştır. Bu zamana kadar AT1 reseptörünün Ang II'nin birçok fizyolojik etkilerine aracılık ettiği ve bu alt tipin Ang II uyarımlı vasküler fonksiyonların kontrolünde baskın rol oynadığı gösterilmiştir (41). Vasküler yapılarda AT1 reseptörü başlıca düz kas hücrelerinde sentez edilmektedir. Adventisyada düz kasa oranla düşük seviyede ve endotelde saptanamayacak oranda eksprese edilmektedir. Kalpte kardiyomiyositlerde ve fibroblastlarda AT1 reseptörleri bulunmaktadır (42). G proteinleri, GDP'nin GTP ile yer değiştirmesi ile α ve $\beta\gamma$ alt üniteleri serbestleşmekte ve bu sayede alt iletim yollarına etkilerini göstermektedir. AT1 reseptörleri, Gq/11, G_i, G_{α12}, G_{α13}'ü içeren çeşitli heterotrimerik G proteinleri ile etkileşim içerisindedir. AT1 reseptörünün

transmembran biriminin amino terminal uzantısı ile birinci ve üçüncü ekstraselüler halka segmentleri, reseptör ile G proteinin ilişkilerinden sorumlu bölgelerdir. Örneğin G_q aktivasyonu fosfolipaz C (PLC) aktivasyonu ile sonuçlanmakta iken G_{α_i} , cGMP oluşumu ile sonuçlanmaktadır. G protein bağımlı reseptörlerin intrinsek tirozin kinaz aktiviteleri olmamasına rağmen serin ve treonin birimlerinden G protein reseptör kinaz (GRK) ailesi aracılığı ile fosforillenmektedir. AT1 reseptörleri hem bazal koşullarda hem de Ang II stimülasyona cevaben fosforillenmektedir. Janus kinazlar (Jak ve TYK2), Src ailesi kinazlar ve fokal adhezyon kinazlar'ı (FAK) içeren çeşitli tirozin kinazlar AT1 reseptörlerini fosforile etmektedir (43).

2.2.3. AT2 Reseptörü

Ang reseptörünün ikinci major izoformu olan AT2, fetal dokularda fizyolojik olarak yüksek seviyelerde eksprese edilmekte ve doğum sonrası bu ekspresyon hızla azalmaktadır (44). AT2 reseptör geni tek X kromozomu üzerine lokalizedir. AT2 reseptörü 7 transmembran tipinde, G protein bağımlı ve 363 aminoasitten oluşan bir reseptördür. AT2 reseptörü AT1A veya AT1B reseptörleri ile aminoasit dizilimi bakımından düşük oranda (%32) benzerlik göstermektedir (45). AT2 reseptörü vasküler yapıların adventisya tabakasında baskın olarak bulunmakta iken media tabakasında saptanabilir orandadır (46). Yetişkinlerde AT2 reseptör ekspresyonu pankreas, kalp, böbrek, böbreküstü bezleri, beyin, ovaryum ve vasküler yapılarda saptanabilir (44). AT2 reseptörleri, yetişkinlerde vasküler ve kardiyak hasar sonrası, yara iyileşmesi sırasında ve renal obstrüksiyon gibi patolojik durumlarda yeniden sentezlenmesi, AT2 reseptörünün dokuların yeniden şekillenmesinde büyüme ve veya gelişimde rol aldığını desteklemektedir. AT2 reseptörün fonksiyonel rolleri tam olarak bilinmemesine rağmen fizyolojik koşullarda hücre büyümesini inhibisyonu, apoptoz ve vazodilatasyonun uyarımı ile AT1 aracılı etkilerini antagonize edebileceği bildirilmiştir (47). Ayrıca diğer bir çalışmada AT2 reseptörlerinin kardiyak hipertrofi ve inflamasyon ile ilişkili olarak patolojik olaylara katkıda bulunduğunu ortaya koymuşlardır (48). AT2 reseptörleri, protein fosfotazların aktivasyonu ve proteinlerin defosforilasyonu, nitrik oksit-cGMP sisteminin düzenlenmesi, fosfolipaz A2 nin (PLA2) stimülasyonu ve araşidonik asit salınımı, sfingolipid kaynaklı seramidler gibi dört major yolda görev almaktadır (49).

Tablo 2.2.1. : AT1 ve AT2 Reseptör Alt Tiplerinin Karakterizasyonu (1).

Anjiyotensin Reseptör Alt Tiplerinin (AT₁ ve AT₂) Karakterizasyonu		
	AT1	AT2
Geni	at ₁	at ₂
Kromozomu	kromozom 3	kromozom X
Yapısı	350 aminoasit 7 transmembran heliksinden (rat, insan)	363 aminoasit oluşun 7 transmembran heliks (rat, insan)
Ang II' nin bağlandığı aminoasit bölgesi	N terminal bölgesinin ekstraselüler halkası 1, ekstraselüler halkası 3	
Moleküler ağırlığı	~50 kDa	~ 44 kDa
Etki sırası	Ang II > Ang III	Ang II = Ang III
Agonistleri	Bilinmiyor	CGP42112A (yüksek konsantrasyon)
Antagonistleri	Losartan, irbesartan, valsartan, candesartan, tasosartan, telmisartan, eprosartan	PD123319, PD123177
Effektör	G _{q/11}	G protein
Sinyali ileten araçları	PLC, Ca ⁺² kanalları, tirozin kinazlar, MAP kinazlar, PLD, PLA ₂	cGMP, fosfatazlar
Yerleri	VDKH, akciğer, karaciğer, beyin, böbrek	Fetal dokular, beyin, kendini yenileyebilen dokular

2.3. Ang II'nin Hücre İçi Sinyalleri AT1 Reseptörleri Aracılı İndüklenmektedir

Ang II, doğrudan etkilerini Ang II reseptörleri üzerinden göstermekte iken, indirek etkilerini diğer faktörlerin salınımı (vazoaktif ajanların ve büyüme faktörleri) ile sağlamaktadır. AT1 reseptörü bir çok spesifik sinyal kaskadları ile ilişki halindedir. Ang II çeşitli biyolojik etkilerini bu sinyal yolları ile göstermektedir.

2.3.1. Fosfolipidler Aracılı AT1 Sinyalizasyonu (Şekil 2.3.1)

Fosfolipaz C'nin Ang II Sinyal İletimindeki Rolü: Ang II stimülasyonu ile en hızlı bir şekilde belirlenebilen olaylardan biri fosfotidilinositol-4,5-bifosfatın (PtdInsP2) PLC'ye bağımlı hidrolizidir (50). PLC ile ilişkili en az 3 izoform vardır: PLC-β, PLC-γ, PLC-δ. PLC-β izoformları G proteinlerinin α ve βγ alt üniteleri ile düzenlenirken (51), PLC- γ izoformları tirozin fosforilasyonları ile düzenlenir (52). PLC-δ'nın düzenlenmesi ise hücre içi Ca⁺² ile sağlanmaktadır. Klasik olarak AT1 reseptörünün uyarımı ile PLC bağımlı fosfotidilinositol-4,5-bifosfat hidrolizi hızlı bir

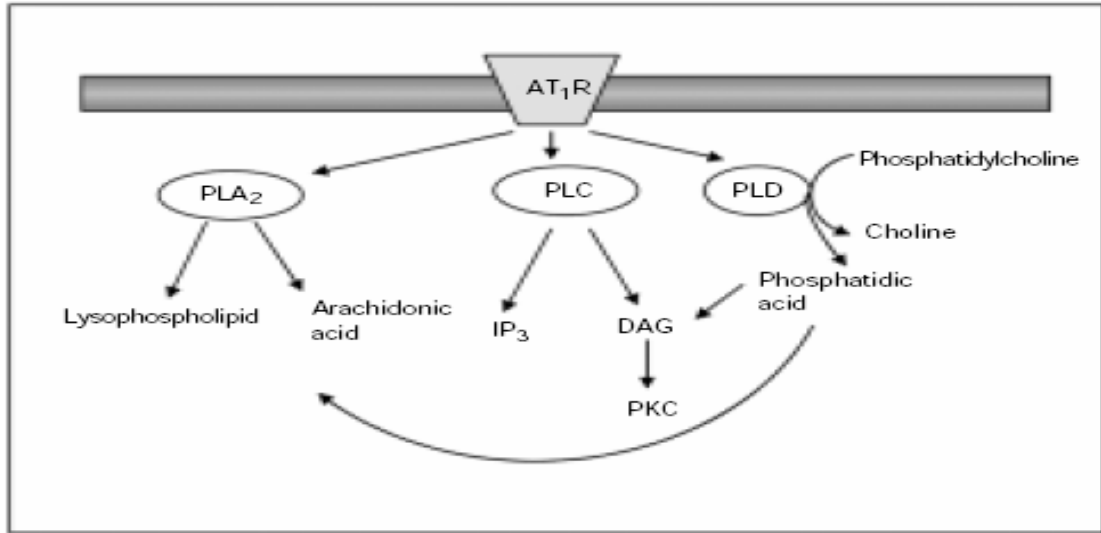
şekilde salınan inositol trifosfat (IP3) ve daha uzun süreli salınan membrana bağımlı DAG oluşumu ile sonuçlanmaktadır. DAG, PKC'nin stimülasyonuna, IP3 ise sarkoplazmik retikulumdan Ca^{2+} un serbestlenmesine neden olmaktadır (53). Ang II uyarımı ile IP3 oluşumunun bir kısmı tirozin kinaz bağımlı yollar ile de oluşmaktadır. VDKH'lerinde artmış intraselüler Ca^{2+} kontraksiyona neden olmakta iken PKC aktivasyonu Na^+/H^+ değiştirici ile hücre içi pH'yı düzenlemektedir (50, 54). İzole VDKH'lerinin kontraksiyonu küçük resistan arterlerde de olduğu gibi PLC aktivasyonu ile koreledir. AT1 reseptörleri üzerinden fosfolipaz C (PLC)'nin aktivasyonu ve ardından hücre içi Ca^{+2} seviyelerinin artması ile kalmodulin aktifleşir ve ardından miyozin hafif zincir kinaz aktifleşerek kontraksiyonu gerçekleştirirler (50, 55).

Fosfolipaz D'nin Ang II Sinyal İletimindeki Rolü: PLD, fosfoinositol içeren fosfolipidleri örneğin fosfotidilkolinleri hidroliz etmektedir. VDKH'ler ve kardiyomyositlerde PLD'nin uzun süreli aktivasyonu, uzamış ikincil mesajların oluşumu için en önemli kaynaklardan biridir. PLD ile fosfotidilkolinin hidrolizi, fosfotidik asit oluşumuna takiben fosfotidik asit fosfohidrolaz ile DAG'un üretimine neden olmaktadır (56). DAG, PKC'nin fizyolojik aktivatörü olup aynı zamanda araşidonik asitin kaynağıdır. PLD ile AT1 reseptörünün bağlantısının moleküler mekanizması $G_{\beta\gamma}$ ve bunlarla ilişkili $G_{\alpha 12}$ alt üniteleri, Src ve RhoA'yı içermektedir (57). VDKH'lerinde PLD'nin Ang II sinyalizasyonu VDKH'lerin proliferasyonu, kardiyak hipertrofi ve vasküler kontraksiyonu ile ilişkilidir. Bu etkiler NAD(P)H oksidazın stimülasyonu ile süperoksit anyonun vasküler oluşumunu artıran fosfatidik asit ve diğer PLD metabolitleri aracılı meydana gelmektedir. NAD(P)H oksidaz, tirozin kinazların, Raf'ın ve hücre içi kalsiyumun düzenlenmesini aktive etmektedir. Kardiyovasküler sistemde, Ang II uyarımlı büyüme ve yeniden yapılanma (remodeling) ile ilişkili uzun süreli sinyalizasyon olayları büyük bir kısmı PLD aracılı cevaplara bağımlıdır (39).

Fosfolipaz A₂'nin Ang II Sinyal İletimindeki Rolü: Ang II uyarımı ile PLA₂ aktivasyonu hücre membran fosfolipidlerinden araşidonik asitin serbestleşmesinden sorumludur. Serbestlenen araşidonik asit siklooksijenaz, lipooksijenaz ve sitokrom P450 oksijenazlar tarafından vasküler ve renal dokularda bir çok farklı eikozanoidlere metabolize olmaktadır. Siklooksijenazlar prostaglandin (PG) PGH₂ oluşumunu katalize etmektedir. PGH₂'den tromboksan sentaz ile de tromboksan, prostasiklin sentaz ile PGI₂ (yada prostasiklin) veya değişik enzimler ile PGE₂, PGD₂ veya PGF_{2 α} meydana gelmektedir (58). Lipooksijenazlar 5-, 12-, 15-HPETE'lerin oluşumunu katalize etmektedir. HPETE'lerden nonenzimik ve peroksidaz katalizi ile HETE'ler oluşmakta, HETE'lerden de lökotrienler meydana gelmektedir. Sitokrom P450 oksijenazlar, araşidonik asiti epoksidasyon reaksiyonu

ile epoksieikozatrienoik asitlere katalize etmektedir. Yine P450 oksijenazlar, ω ve ω -1 hidroksilasyonu ile 20- ve 19-HETE, alilik oksidasyon ile de diğer HETE'leri oluşturmaktadır (39).

PLA₂ kaynaklı eikozonoidler, kan basıncının düzenlenmesinde önemli olan renal ve vasküler mekanizmaları etkilemektedir. VDKH'leri ve endotel hücrelerinde bu etkiler AT₁ reseptörleri aracılı olmakta iken neonatal rat kardiyak miyositler, nöronal hücrelerde ve proksimal renal tübül epitel hücrelerde Ang II uyarımlı PLA₂ aktivasyonu AT₂ reseptörü aracılıdır. Vasküler PLA₂'nin Ang II aracılı aktivasyonu hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonuna, Ca²⁺-kalmodulin bağımlı protein kinaz II ve mitojen aktiviteli protein kinazlara (MAPK) bağımlıdır (58, 59). PLA₂ ve metabolitleri Ras-MAPK-bağımlı sinyal yollarını aktive etmesi pozitif geribildirim mekanizma ile PLA₂'nin aktivitesinin artırmakta, böylece ilave araşidonik asit salınmaktadır. Ang II kaynaklı eikozonoidler, vasküler kontraksiyonu ve büyümeyi muhtemelen MAPK ve redoks sensitiv yollar ile düzenlemektedir. Bazı damar yataklarında PGE₂ ve PGI₂ gibi vazorelaksan PG'ler, Ang II aracılı kontraksiyonu azaltmaktadırlar. VDKH'lerinin Ang II aracılı etkilerini lipooksijenaz kaynaklı eikozonoidler de etkilemektedir. Kültüre hücrelerde 12-HETE, Ang II'nin Ca²⁺ üzerine geçişi stimulan etkisini kolaylaştırmaktadır. Lipooksijenaz inhibitörleri Ang II'nin vazokonstriktör etkilerini zayıflatmakta ve hipertansif ratlarda kan basıncını azaltmaktadır (60).



Şekil 2.3.1.: Fosfolipid türevi ikinci mesajcılar: Ang II tarafından aktive edilen fosfolipazlardan kaynaklanır. Fosfolipaz A (PLA), Fosfolipaz C (PLC) ve Fosfolipaz D (PLD) tarafından katalizlenen reaksiyonların ürünleri gösterildiği gibi ana fosfolipid türevi ikinci mesajcılardır (39).

2.3.2. AT1-Aracılı Tirozin Fosforilasyonu

Ang II sinyalizasyondaki son gelişmeler, AT1 reseptör aktivasyonunun artmış protein tirozin fosforilasyonu ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu yollar, karakteristik olarak büyüme faktörleri ve sitokinler ile ilişkilidir. Ang II'nin potent vazokonstriktör etkilerinin yanı sıra mitojenik ve inflamatuvar benzeri etkilerine sahip bir hormondur. Ang II, PLC- γ , Src-ailesi kinazlar, JAK, FAK, Ca²⁺-bağımlı tirozin kinazlar (örn; Pyk2), p130Cas ve fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3K) gibi bir çok non-reseptör (intrinsek tirozin kinaz aktivesi olmayan) tirozin kinazları aktive etmektedir. Ayrıca Ang II, EGFR, PDGFR ve IGFR gibi reseptör (intrinsek tirozin kinaz aktivesi olan) tirozin kinazların aktivitelerini de etkilemektedir (39).

2.3.3. Non-Reseptör Tirozin Kinaz Aktivasyonu (Şekil 2.3.2)

Non-reseptör tirozin kinazların, G-protein-bağımlı reseptörler (GPCRs, G-protein-coupled receptors) tarafından aktive edildiğini gösteren birkaç mekanizma bulunmuştur:

Birincil olarak, heterotrimerik G-protein α subuniti (G_α) veya β/γ subunit dimeri ($G_{\beta\gamma}$) tirozin kinaz aktivasyonuna aracılık etmektedir. AT1R tarafından $G_{\alpha q}$ 'nin aktivasyonu intraselüler Ca²⁺ artışına ve PKC aktivasyonuna yol açarak Src, fokal adhezyon kinaz (FAK), prolinden zengin tirozin kinaz 2 (Pyk2) gibi tirozin kinazların aktivasyonunu düzenlemektedir (61). $G_{\beta\gamma}$, PI3K- γ gibi alt iletim yolu olan efektörlerini aktive ederek tirozin kinazları aktive etmektedir (62). Yapılan son araştırmalar heterotrimerik G-protein β altbiriminin (G_β) p184 neu ve EGF reseptör gibi tirozin fosforile proteinlerle etkileşebilmekle alt iletim sinyal yollarının aktivasyonuna neden olabileceğini göstermiştir (63). AT1R'nin Ang II tarafından aktivasyonu JAK2, SHC ve Src'nin $G_{\beta\gamma}$ altbirimine bağlanarak alt iletim yollarının aktivasyonu ile sonuçlanır (64).

İkincil olarak, AT1R ve diğer sinyal moleküllerinin doğrudan etkileşimi tirozin kinaz aktivitesini düzenler. Örneğin, SHP2, AT1R'nin C terminaline bağlanarak JAK2 ve AT1R arasındaki ilişkiyi düzenleyerek JAK2-aracılı tirozin fosforilasyonunu etkilemektedir.

Üçüncül olarak, Src'nin AT1R uyarımıyla aktivasyonu henüz tam olarak açıklanamamış bir mekanizmayla meydana gelmektedir (63).

Src Ailesi Kinazlar: Bu zamana kadar en az 14 Src ilişkili kinaz tanımlanmıştır. Src ailesi kinazlardan 60 kD'luk c-Src prototip olup VDKH'lerinde yoğun bir şekilde eksprese edilmektedir. c-Src VDKH'lerinde Ang II ile hızlıca aktive olmakta ve Ang II'nin indüklediği PLC- γ ve IP3 oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Src, hücre içi kalsiyum ve PKC, integrin aracılı hücre adhezyonunda bir sinyal molekül olan p130Cas'ın Ang II aracılı fosforilasyonunu düzenlemektedir. Ayrıca Src diğer alt basamak proteinlerde (pp120, p125Fak, paksilin, JAK2, STAT1,

G_{α} , kaveolin ve Shc) olduğu gibi Pyk2'nin ve ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazların (ERK) Ang II aracılı aktivasyonu ile de ilişkilidir (26). İnsan resistan arterlerden izole edilen VDKH'lerinde yapılan bir çalışmada c-Src Ang II uyarımlı Ca^{2+} mobilizasyonun düzenlenmesinde önemli olabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte c-Src, sığır endotel hücrelerinde plazminojen aktivasyonun Ang II aracılı düzenlemesine aracılık etmektedir (53). c-Src'nin aktivasyonu hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde, fokal adhezyon oluşumunda, hücre büyümesi ve migrasyonunda gereklidir (65).

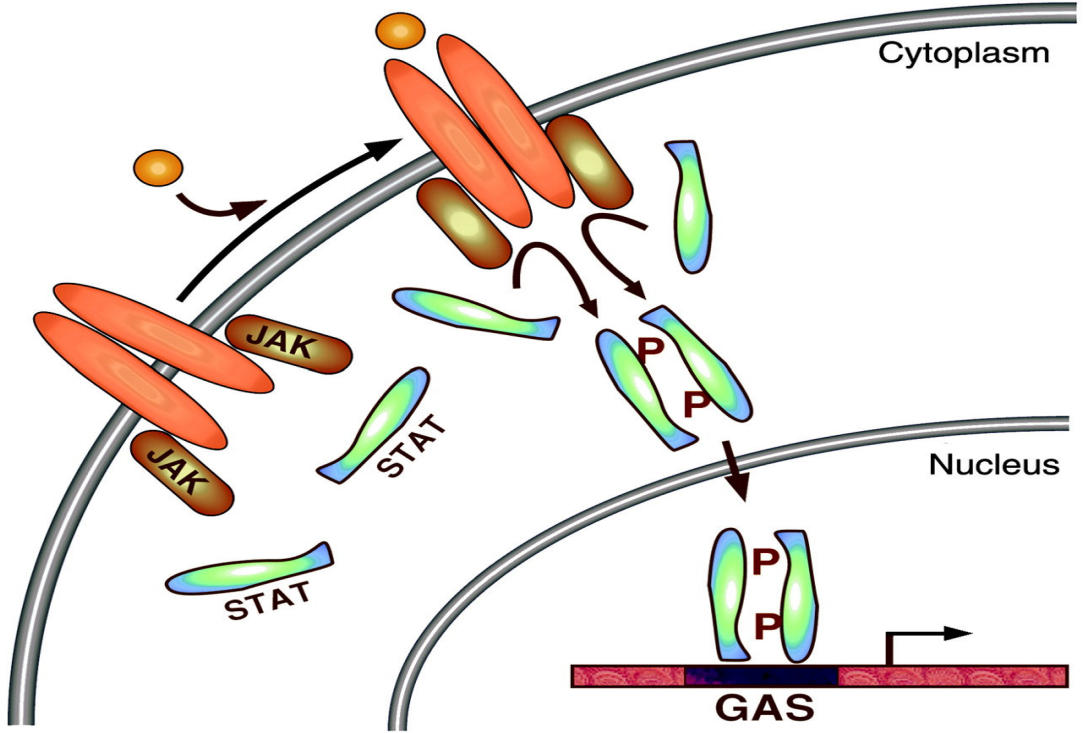
Src, Ang II'nin MAPK aktivasyonuna aracılık etmesinde önemli bir rol oynar çünkü Src kinaz aktivasyonunun inhibe edilmesi Ang II aracılı ERK1/2 fosforilasyonunun birçok hücre tipinde tama yakın durmasına neden olmaktadır. PLC- γ 1, VDKH'de AT1R aktivasyonuna cevaben tirozin fosforile hale geçer. Bu aktivasyon, Src aktivasyonunun alt iletim yolu olarak ortaya çıkar. c-Src ve PLC- γ arasındaki ilişki Src bağımlı bir mekanizmayla Ang II uyarımıyla tirozin fosforile hale geçen bir protein olan p97 tarafından düzenlenir (66). Hücre iskeleti üzerinde Ang II aracılı etkilerde de c-Src'nin rolü olduğu bulunmuştur.

Janus Ailesi Kinazlar ve STAT Aktivasyonu (Şekil 2.3.3.): IFN- α 'nın genleri hızlıca indüklemeye özelliği Jak-STAT (Janus kinases-Signal transducers and activators of transcription) yolunun keşfine yol açmıştır. Sitozolik tirozin kinazların janus kinaz (JAK) ailesi, ki bunlar geleneksel olarak interlökinler ve interferonlar için sitokin reseptörleri ile eşleşmiş oldukları düşünülmektedir, 120-130 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip dört üyeden oluşmaktadır; JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2 (67). JAK proteinleri mRNA ekspresyonunun anahtar mediyatörleridir ve "erken büyüme cevap genleri" olarak karakterize edilmiştir. Ligandlar (Örneğin hematopoetinler, Ang II, interferonlar), dimerik reseptörlerine bağlandığı zaman reseptörler ilişkili Jak'lara uygun konformasyonel değişikliğe uğrarlar. Takiben Jak'lar spesifik tirozin motiflerinden fosforlanarak aktive olurlar. Bu motifleri tipik SH2 birimlerinden tanıyan STAT'lar ve diğer sinyal iletim proteinler, reseptörleri tarafından tanınırlar ve Jak-bağımlı tirozin fosforilasyonu ile aktive olurlar. Herbir reseptör alt ailesi tarafından tanınan STAT grubu, spesifik biyolojik cevabın belirlenmesinde kritik basamağı oluşturur. STAT'lar aktive oldukları zaman reseptörlerinden ayrılırlar ve karşılıklı olarak SH2 birimlerinin fosfotirozini ile etkileşerek dimerize olurlar. Klasik olarak sadece aktive ve dimerize STAT'lar DNA'ya bağlanabilme ve hızlı nükleer transkripsiyona neden olabilmektedir (12, 68). Nükleusda bir çok STAT dimeri, artırıcı gen bölgesi (enhancer) olan GAS (gama-activated site) ailesi üyelerini tanıyarak onlara bağlanır (11). Yani, Jak-STAT yolağı hücre yüzey reseptörleri ile hücre büyümesine yol açan nükleer transkripsiyonel olaylar arasında önemli bir bağlantıdır. Saatler içinde ligandların

stimüle ettiği sinyaller azalır ve STAT'lar tekrar sitoplazmaya döner. Bu taşıma crm1/ran-GTPaz'ın aracılığı ile ve STAT defosforilasyonunu gerektiren bir mekanizma ile gerçekleştirilir (69).

Klasik sitokin reseptörlerinde olduğu gibi AT1 reseptörü, JAK ailesi üyelerinden JAK2 ve TYK2'yi stimüle etmektedir (70). AT1 reseptörü aracılı JAK aktivasyonu, STAT proteinleri p91/p84 (STAT1 α/β), p113 (STAT2) ve p92 (STAT3)'ün fosforilasyonunu stimüle etmektedir. Ang II uyarımı ile STAT1'in nükleer translokasyonu ve tirozin fosforilasyonu için JAK2 ve Src ailesi kinazlardan p59Fyn gereklidir. p59Fyn hem JAK2 hem de STAT1 için bir liman (docking) protein olarak görev yaparak JAK2 aracılı STAT1 fosforilasyonunu kolaylaştırmaktadır. STAT1 ve STAT3'lere karşı antikörlerin elektroporasyonu ile VDKH'lerin Ang II'ye cevaben gelişen proliferasyonunu azaltmış iken diğer büyüme faktörlerine karşı proliferasyon azalışı görülmemiştir. Bu durum STAT proteinlerin Ang II indüklü hücre proliferasyonunda temel bir rol oynayabileceğini desteklemektedir (71). Jak-STAT sinyalizasyon yolunun erken büyüme cevap genlerini aktive etme özelliği Ang II'nin vasküler ve kardiyak büyüme, yeniden yapılanma ve tamir etkileri için muhtemel bir mekanizma olabileceğini akla getirmektedir (72).

Ang II stimülasyonuna cevaben aktive olan STAT ve aktivatörlerini de içeren çoklu sinyalleşme yollarının harekete geçmesinde JAK aktivasyonu gereklidir. Jak-STAT yolağının Ang II tarafından aktive edilmesi akut miyokard enfarktüsü sonrası iskemik miyokarda kardiyak hipertrofi için önemlidir (73). Ang II, JAK2'nin AT1R ile olan ilişkisini stimüle etmektedir. AT1R'nin karboksil ucu bölgesindeki YIPP motifi Ang II'nin JAK2 ile fiziksel etkileşimini düzenler. Son veriler, Ang II tarafından indüklenen Tyr1007/1008'deki JAK2 fosforilasyonu Ang II tarafından stimüle edilen Ca²⁺ ve PKC- δ aktivite artışına bağımlı olduğunu göstermiştir (74).



Şekil 2.3.3: Jak-STAT sinyal yolu: Ligandlar, dimerik reseptörlerine bağlandığı zaman ilişkili Jak'lar uygun konformasyonel değişikliğe uğrarlar. Takiben Jak'lar spesifik tirozin motiflerinden fosforlanarak aktive olurlar. Bu motifleri tanıyan STAT'lar, Jak-bağımlı tirozin fosforilasyonu ile aktive olurlar. STAT'lar aktive oldukları zaman reseptörlerinden ayrılırlar ve karşılıklı olarak etkileşerek dimerize olurlar.. Nukleusta bir çok STAT dimeri, artırıcı DNA bölgelerinden (enhancer) GAS (gama-activated site) ailesi üyelerini tanır ve onlara bağlanır (68).

Fokal Adhezyon Kinaz (FAK) ve Prolinden Zengin Tirozin Kinaz 2: Ang II, FAK bağımlı sinyal yolları ile hücre migrasyonunu, hücre şeklinde ve hacminde değişiklikleri uyarmaktadır (75). Hücre adhezyonunda özelleşmiş FAK komplekslerinin, sinyal transdüksiyon mediyatörlerinin bir araya toplanmasında görev aldığı aydınlatılmıştır. FAK komplekslerine lokalize olan en iyi tanımlanmış tirozin kinaz, 125 kD'luk FAK' dır. Bir diğer FAK üyesi hücre adhezyon kinaz-b olarak adlandırılan, kalsiyum bağımlı bir tirozin kinaz olan Pyk2'dir. FAK, ekstraselüler matriks bağımlı tirozin otoposforilasyon göstermekte ve SH2 birimleriyle iki non-RTK olan c-Src ve p59 Fyn (pp59) ile fiziksel olarak ilişkilidir (76). FAK'ın c-Src ile ilişkisi FAK'ın tirozin fosforilasyonuna neden olmakta, bu da FAK'ın GTP-GDP değiştirici protein, Sos ve Ras ile ilişkili olan Grb2'ye bağlanmasına neden olmaktadır. Bu durum da ERK 1/2 aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. VDKH'lerinde Ang II'ye cevaben FAK fosfotirozin içeriğindeki artış hızlı bir reaksiyon şeklindedir. Ang II uyarımı ile FAK'ın aktivasyonu, ekstraselüler matriks, talin ve paksilinin (hücre morfolojisi ve hareketinin düzenlenmesinde rol alan) fosforilasyonu ile fokal adhezyon bölgelerine

translokasyonuna neden olmaktadır (76). VDKH'lerinde AT1 uyarımlı FAK aktivasyonu ayrıca Ang aracılı hipertrofik cevaplarda da rol almaktadır. AT1 reseptörü ile FAK arasındaki bağlantı bilinmemektedir, fakat GTPazların Rho ailesi bu ilişkide önemli olabilir (39).

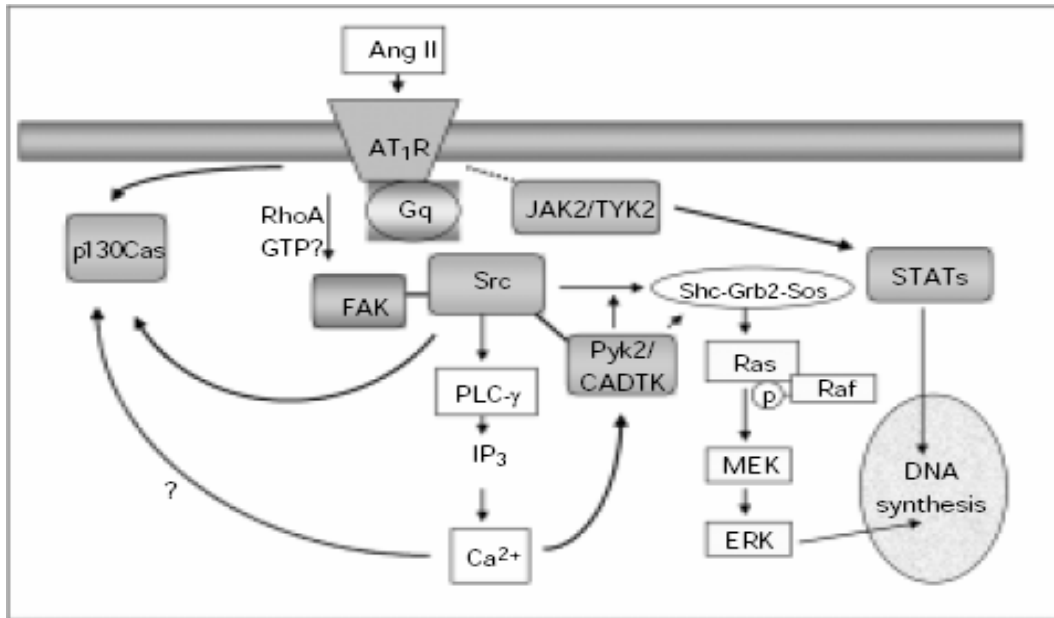
FAK, bir multiprotein kompleks içerisinde paxillin, tensin ve p130Cas'a bağlı olarak bulunur (77). Ang II ile uyarım, bu proteinlerin tirozin fosforilasyonunu hızlı bir şekilde arttırarak hücre iskeletinde değişikliklere yol açar. Bu bulgular Ang II aracılı hücre şekli değişikliğinde FAK'ın gerekli olduğunu düşündürmektedir. Ang II, FAK ve Src arasındaki ilişkiyi arttırır. Src, Ang II aracılı FAK tirozin fosforilasyonu'nun üst iletim yolu düzenleyicisi olarak fonksiyon görüyor olabilir (78).

Adhezyon kinaz- β olarakta adlandırılan diğer bir FAK aile üyesi Pyk2, hücre adhezyon fokal tirozin kinaz ve kalsiyum bağımlı tirozin kinazlar ile ilişkilidir. AT1 reseptörü ile aktive olan Pyk2, artmış hücre içi Ca^{2+} 'a bağımlıdır. Pyk2, FAK ailesinden Ca^{2+} duyarlı bir tirozin kinazdır. Pyk2, MAPK aktivasyonu ile uyarılan G-protein-bağımlı reseptörün üst iletim mediyatorü olarak tanımlanmıştır (79). Aktive c-Src ve Yes doğrudan Pyk2'yi Tyr579, Tyr580 ve Tyr881 noktalarından fosforilleyerek, Grb2'nin Pyk2'ye bağlanmasını sağlayarak Pyk2 kinaz aktivitesini arttırır (80). FAK ve Pyk2'nin Src'den bağımsız aktive oldukları da rapor edilmiştir. Örneğin, integrinler, multiprotein sinyal kompleksini oluşturmak için Pyk2 ve FAK gibi non-reseptör tirozin kinazları bir araya getirerek işlev görmektedirler. VDKH'de Ang II uyarımı sonucu oluşan kemotaktik cevap Pyk2 ve ERK1/2'nin fosforilasyonu ile ilişkilidir (81). Bu gözlemler hücre göçünde ve büyümesinde Ang II sinyal yollarında Pyk2 ve FAK'ın önemli rollerinin olduğuna işaret etmektedir (39).

p130Cas: p130Cas Ang II ile aktive olan ve hücre iskeletinin yeniden yapılanmasında rol alan bir tirozin kinazdır (82). Bu protein, prolinden zengin birimleri, SH3 birimi ve Src ve Crk'nın SH2 birimleri için bağlanma motiflerini içerdiği için bir adaptör molekül olarak görev yapmaktadır. İntegrin aracılı hücre adhezyonu için p130Cas, FAK, paksilin, tensin gibi sinyal moleküllerin bir araya gelmesi gerekmektedir. Kültüre VDKH'lerinde Ang II, p130Cas fosforilasyonda geçici bir artışı uyarmaktadır. Bazı araştırmacılar bu fosforilasyonun c-Src, PKC ve Ca^{2+} 'a bağımlı olduğunu ve normal hücre iskeleti şebekesi için gerekli olduğunu bulmuşlardır (65). Ang II uyarımlı p130Cas aktivasyonunun fonksiyonel önemi tam olarak bilinmemesine rağmen, p130Cas α -aktinin ekspresyonu, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve adhezyonunu düzenleyebilmektedir.

Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K): PI3K, p85 adaptör ve p110 katalitik alt ünitelerden oluşan heterodimerik bir enzimdir. PI3K, inositol lipidlerinin D-3

pozisyonundan fosforillemektedir. PI3K'in major ürünleri apoptozisin regülasyonunu, farklılaşmayı, membran değişimlerini ve hücre iskeletinin organizasyonunu etkilemektedir. Ayrıca PI3K, VDKH'lerin büyümesinin düzenlenmesinde de önemli rol oynamaktadır. Karakteristik olarak reseptör tirozin kinazlarla ilişkili olan PI3K, aynı zamanda AT1 reseptörü ile de aktive olabilmektedir (83. 84). VDKH'lerinde Ang II, PI3K'in aktivitesini, fosforilasyonunu ve migrasyonunu stimüle etmektedir. Ayrıca Ang II, PI3K'in p85 alt ünitesini, perinükleer alandan sitoplazma ve hücre iskeletine doğru translokasyonunu da uyarmaktadır. Kültüre edilmiş rat hücrelerinde PI3K'in inhibitörleri, Ang II'nin uyardığı hiperplaziyi engellemiştir (83). Bu durum PI3K'in VDKH büyümesinde non-RTK'ları düzenlenmesinde önemli rolü olduğunu desteklemektedir. PI3K için bir çok moleküler hedef bulunmuştur, bunlardan en önemlisi Akt/PKB'dir. PI3K'in VDKH'lerinde Ang II'nin aktive ettiği en önemli aşağı iletim yolu Akt/PKB'dir. Akt p70-s6 kinazı aktive ederek protein sentezini düzenlemektedir. Aortik hücrelerde Akt, Ca²⁺ kanal akımlarını uyararak Ang II aracılı Ca²⁺ cevaplarını düzenlemektedir. Ayrıca Akt, Bcl-2 ile c-Myc'nin ekspresyonu ve kaspazların inhibisyonu ile VDKH'ler apoptozisten koruyarak hücrelerin hayatta kalımını (survival) artırmaktadır (84). VDKH'lerinin Ang II sinyalizasyonda PI3K'in gerçek rolü tam anlaşılmasına rağmen PI3K, mitogenez ve apoptozis dengesinin kontrolünde önemli kompleks bir yoldur.



Şekil 2.3.2: Tirozin kinaz yolları vasküler düz kas hücrelerinde Ang II tarafından uyarılır: Ang II'nin aktive ettiği Src, ERK bağımlı sinyal yolları ve PLC-γ tarafından düzenlenir. AT1R bağlanan Ang II, JAK2/TYK2'yi aktive eder. JAK2/TYK2, STAT proteinlerini fosforiller ve bu proteinler nükleusa transloke olarak gen transkripsiyonunu başlatır. Ang II ayrıca fokal adhezyon kinazı (FAK) aktive eder ve FAK'ın fosforilasyonu Src ile

ilişkilidir. FAK ve AT1R arasındaki ilişki tam olarak bilinmemekle birlikte RhoA ve GTP ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Pyk2 ve CADTK (Ca^{2+} bağımlı tirozin kinaz) kalsiyum bağımlı yollar üzerinden Ang II ile aktive edilir. Aktive edilmiş Pyk2, Src ve Erk-bağımlı sinyal kaskadlarını düzenler. p130Cas muhtemelen Ca^{2+} bağımlı yollar aracılığıyla, Ang II tarafından hızlıca aktive edilir. Fosforile olmuş p130Cas belkide α -aktin ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Ang II tarafından aktive olan PI3K, Akt/Protein kinaz B aktivasyonuna neden olur ki bu durum hücrenin yaşamsal olaylarını ve p70 S6- kinaz aktivasyonunu uyarır (39).

2.3.4. Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK)

Artan son kanıtlar AT1 reseptör aktivasyona cevaben gelişen mitojenik cevapların RTK aktivasyonu ile gelişebileceğini desteklemektedir. Ang II doğrudan RTK'lara bağlanmamasına rağmen aktive edebilmektedir. Bu transaktivasyon yolları epidermal büyüme faktör reseptör (Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR), PDGFR ve insülin büyüme faktör reseptör (Insulin Growth Factor Reseptor; IGF1R)'ler için gösterilmiştir. RTK'ların Ang II uyarımlı transaktivasyonların mekanizmaları, tirozin kinazların aktivasyonunu (Pyk2 ve Src) ve redoks sensitiv olayları içermektedir (72). EGFR'ün transaktivasyonu Ca^{2+} bağımlı gerçekleşirken, PDGFR transaktivasyonu Ca^{2+} 'dan bağımsız gerçekleşmektedir.

In vitro kanıtlar AT1 reseptörünün indüklediği PDGFR ve EGF reseptör transaktivasyonun, Ang II'nin bazı trofik etkileri için önemli olduğunu göstermektedir. Örneğin AT1 reseptörü aracılı EGFR aktivasyonu alt iletim yollarından ERK1/2'nin aktivasyonuna ve VDKH hiperplazisine neden olmaktadır Rat VDKH'lerinde EGFR kinaz inhibitörleri, hem Ang II uyarımlı nükleer protoonkogen ekspresyonunu hem de c-Fos proteinindeki artışı engellemiştir. Ang II aracılı EGFR transaktivasyonu aynı zamanda protein sentezini uyaran ribozomal protein p70 ile de ilişkilidir (85).

Ang II, EGF reseptörünün Ca^{2+} bağımlı transaktivasyonunu indükler ve VDKH'de MAPK aktivasyonuna yol açmak üzere pre-aktive c-Src ve alt iletim adaptörler için bir platform olarak işlev görür (85). Ang II tarafından indüklenen Ca^{2+} -bağımsız EGF reseptör transaktivasyon yollarının olduğu da varsayılmıştır (86). Reaktif oksijen türleri (ROS) Ang II aracılığıyla EGF'nin Ca^{2+} -bağlı transaktivasyonunu gerçekleştirir. Ca^{2+} artımıyla aktive olan Ca^{2+} /calmodulin kinase II'ye bağlı bir mekanizmayla Pyk2 ve Src kinaz ailesinin aktivasyonu gerçekleşir ve bu EGF reseptör transaktivasyonu için gereklidir (63). EGF reseptörünün karboksil ucu Ang II aracılı EGF transaktivasyonunda gereklidir. EGF reseptörünün PDGF β reseptörü tarafından da aktive edilebildiğini göstermiştir (87). PDGF β -EGF reseptör heterodimerlerinin dağılması hem EGF reseptör transaktivasyonunu hem de PDGF β aracılı ERK1/2 aktivasyonunu belirgin olarak inhibe etmiştir. Ang II tarafından transaktive edilen PDGF β reseptör transaktivasyonu Ca^{2+} 'dan bağımsızdır fakat

ROS'a ihtiyaç duymaktadır (88). Hepotositlerde Ang II tarafından PDGF- β reseptör transaktivasyonu, Src aktivasyonunu ve endojen PDGF- β reseptör aktivasyonunu içermektedir. Ca²⁺/kalmomodulin bağımlı tirozin kinaz ve PKC bağımlı yollar Ang II tarafından stimule edilen PDGF β reseptör transaktivasyonunu sağlar ve Src ve FAK aktivasyonu Ang II reseptörü ve ERK1/2 arasındaki bağlantının sağlayıcısı olarak işlev görür (89).

2.3.5. Mitojen Aktive Edici Kinaz Sinyal İletim Yolu (Şekil 2.3.4)

Mitojen aktive edici kinazlar (Mitogen- activated protein kinase; MAPK) serin/treonin protein kinazların bir ailesidir ve hücre içi protein fosforilasyonları ile hücre dışı sinyallerin nukleusa iletimine aracılık ederler. Bu yolla transkripsiyonel faktörler aktive olarak gen ekspresyonları artar ve hücrel cevap oluşur. Memeli MAP Kinazları 6 ana alt ailede toplanır;

- 1) ERK 1/2 (sırasıyla p42-kDa MAPK ve p44-kDa MAPK olarak da bilinir)
- 2) c- Jun N-terminal kinazlar (JNK) 1,2,3 ve Stres Aktive edici Protein Kinazlar (SAPK),
- 3) p38 MAPK,
- 4) ERK6, p38 benzeri MAPK,
- 5) ERK3 ve
- 6) ERK5 (Big MAPK 1 olarakta adlandırılır) (90).

MAPK bağımlı sinyal yolları hücre büyümesi, apoptosiz, hücrel farklılaşma, transformasyon ve vasküler kontraksiyondan sorumludur. ERK1/2 büyüme ve farklılaşmayı uyarılarına cevap verirken, JNK ve p38 MAPK genellikle sitokinlere ve hücrel strese cevap verir (90). Kültüre VDKH'lerinde Ang II, MAPK ailesinden ERK1/2, JNK'lar ve p38'i aktive etmektedir (91. 92). MAPK aktivasyonun uyarımı tipik olarak MAPK kinaz'ın (MEK olarak da bilinir) fosforilasyonunu içermektedir. MEK, Raf-1 içeren diğer MEK kinaz tarafından düzenlenir. Ang II ile aktive olan MAPK'ların sinyalizasyon yolları birbirinden farklıdır. En iyi karakterize edilen MAPK kaskadı Raf-Ras-MEK-ERK1/2'dir (39).

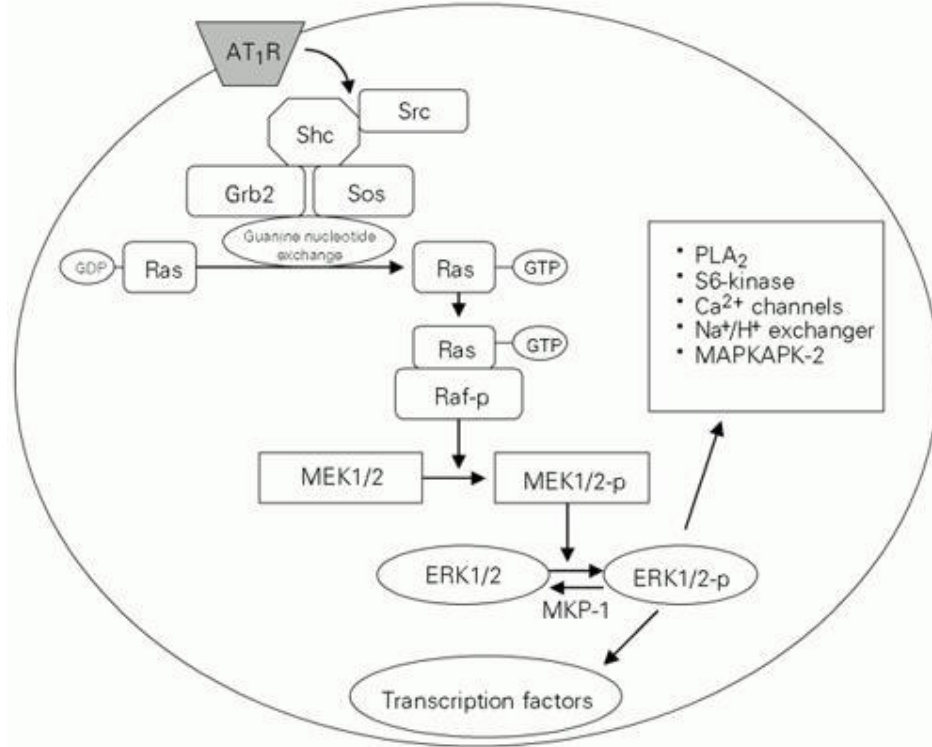
ERK'ler bir kez fosforile edildiğinde nukleusa transloke olurlar, transkripsiyon faktörleri fosforlanır ve gelen sinyalle, ilgili hücre döngüsüyle ilişkili proteinlerin gen ifadeleri düzenlenir (93). VDKH'lerinde ERK'lerin alt basamak hedefleri S6 ribozomal proteini fosforlayan serin/treonin protein kinaz pp90^{rsk} dır ve protein sentezini uyarır (43). ERK1/ERK2 aktivasyonu, temelde proto-onkogen ekspresyonun artışı ve AP-1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile sonuçlanır ki muhtemelen VDKH'lerinde protein sentezi kadar hücre siklusunun ilerlemesini de düzenler (94). Ang II uyarımlı MAPK'ın diğer alt basamak hedefleri, siklooksijenaz-2, kontraksiyon düzenleyici protein h-kaldesmon (kaldesmonun yüksek moleküler

ağırlıklı formu), miyelin temel protein, mikrotübül-ilişkili protein, Ca^{2+} kanalları ve Na^+/H^+ değiştiricileridir (95).

ERK'lere ek olarak Ang II, JNK/SAPK'leri aktive etmektedir. JNK/SAPK'lar VDKH'lerinin büyümesini ya büyümei inhibe ederek ya da apoptozu uyararak düzenlemektedir (96). VDKH'lerinde Ang II, ERK1/2 ve JNK/SAPK'leri farklı sinyalizasyon yollarından uarmaktadır. ERK fosforilasyonu hem Ca^{2+} bağımlı hem de c-Src'yi içeren Ca^{2+} bağımsız yollardan ve atipik PKC izoformu PKC- ξ tarafından aktive olmakta iken JNK/SAPK'lar klasik PKC izoformunu ve Src'den farklı tirozin kinazı içeren Ca^{++} bağımlı yollardan aktive olmaktadır (97). Ang II her iki yolda aktive etmektedir, ancak zıt büyüme etkilerine sahiptir. ERK'ler kolaylaştırıcı, JNK/SAPK'lar ise inhibe edici etkileri söz konusudur. Bu sinyal yolları ve ilişkili hücre fonksiyonlar, kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili vasküler hasarlarda önemlidir (39).

Ang II aynı zamanda vasküler p38 MAPK'da fosforile etmektedir. p38 MAPK, inflamatuvar cevapta, apoptozisde ve hücre büyümesinin inhibisyonunda önemli rol oynamaktadır (98). p38 MAPK, kardiyak hipertrofi, iskemi/reperfüzyon hasarı, ateroskleroz, hipertansiyonda arteriyal remodeling gibi bir çok patolojilerle ilişkilidir. VDKH'lerinde Ang II uyarımlı p38 MAPK, redoks duyarlı sinyalizasyon yollarının temel bir komponenti olarak ilişki halindedir (98).

Ang II uyarımlı MAPK inaktivasyonu MAPK fosfataz 1 (MKP-1) tarafından defosforile edilerek yapılmaktadır. Ang II, MPK-1'ı, tirozin fosfotazları AT2 reseptörü üzerinden aktive etmektedir. Bu reseptör alt tipi hücre büyümesinin inhibisyonu ve apoptozis ile yakından ilişkilidir. Buna göre AT1 reseptörü ERK bağımlı yollardan büyümei aktive etmekte iken, AT2 reseptörü bu etkiyi MPK-1 üzerinden engel olmaktadır.



Şekil 2.3.4: VDKH'lerinde Ang II Uyarımıyla p42/p44 MAPK Bağımlı Sinyal Yollarının Üst Basamak Düzenlenmesi. ERK fosforilasyon yolu Ang II'nin AT1 reseptörüne bağlanması ile başlar ve ardından Shc-Grb2-Sos (Shc'nin tirozin fosforilasyonu) oluşur. Küçük G protein Ras-GDP-/GTP guanin nükleotidi değişir. Aktive olan Ras-GTP Ser/Thr kinaz, Raf (MAPK kinaz kinaz; MAPKKK) ile interaksiyona girer ve hücre membranına transloke olur. Raf'ın aktivasyonu MEK (MAPK/ERK kinaz) üzerinde bulunan iki serin birimini fosforile eder ardından sırasıyla Thr/Tyr birimleri fosforillenir ve MAP kinazların 44-(ERK2) ve 42-(ERK1) izoformları aktive edilir. ERK'lerin fosforilasyonu farklı hücre içi protein hedeflerini fosforiller ve aktive eder. ERK'ler MKP-1'in aktivasyonu ile defosforile olurlar (39).

2.3.6. Küçük G Proteinleri (Rho Ailesi)

Son çalışmalarda VDKH'lerinde AT1 reseptörleri monomerik küçük (21 kDa) guanin-nükleotid bağlayan proteinleri (küçük G proteinleri) aktive ettiği gösterilmiştir. Küçük G protein ailesi 5 alt üyesinden (Ras, Rho, ADP ribozilasyon faktörleri, Rab ve Ran) oluşmaktadır. Bunlar hücrel cevapları düzenlemek için moleküler anahtarlar olarak görev yapmaktadırlar. Rho alt ailesi (RhoA, Rac1 ve Cdc42) Ang II sinyal iletim yolları ile ilişkilidir. RhoA'nın GDP bağlayan formu inaktif konumda ve genelde sitoplazmada lokalizedir. RhoA'nın aktive olabilmesi için post translasyonel modifikasyona yani GDP bağlayan bölgenin GTP ile yer değiştirmesi gerekmektedir (99). RhoA'nın en önemli alt iletim yolu Rho kinazdır. Rho kinaz, miyozin hafif zincir fosfotazın miyozin bağlayan alt ünitesinin fosforilasyonu aracılı VDKH'lerinin kontraksiyonunu artırmaktadır (100). G protein bağımlı reseptörler aracılı bir çok vazoaaktif ajanlar, RhoA/Rho kinaz üzerinden hücre

içi kalsiyumunda meydana getirdikleri değişikler ile kontraktil mekanizmanın duyarlılığını artırmaktadır. Bununla birlikte RhoA, ateroskleroz ile ilişkili AT1 uyarımlı büyüme sinyalizasyon yollarında rol oynamaktadır. Rat VDKH'lerinde Ang II, RhoA/Rho kinaz bağımlı mekanizmalarla protein sentezini ve c-fos ekspresyonunu Erk'ler veya p70S6 kinaz aktivasyonundan bağımsız olarak artırmaktadır. Ayrıca RhoA, AT1 aracılı PLD aktivasyonunda da önemli olduğu gösterilmiştir. Ang II'nin aktive ettiği diğer bir G protein Rac 1'dir.

VDKH'lerinde Rac1, p21 aktiviteli kinazın ve JNK'nın üst iletim yollarının düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. Ayrıca Rac1, Ang II aracılı gen ekspresyonunda ve NAD(P)H oksidaz aktivitesini düzenlenmesinde de görev almaktadır (99).

2.3.7. Reaktif Oksijen Türlerin Oluşumu

Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süper oksit anyonu ($.O_2^-$) gibi reaktif oksijen ürünleri, vasküler tonus, hipertansiyon, ateroskleroz, inflamasyon ve iskemi reperfüzyonda hücreler arası ve hücre içinde ikincil mesajcılar olarak görev yapmaktadır. Vasküler olmayan dokularda ksantin oksidaz, mitokondriyal oksidaz ve araşidonik asit, oksidatif moleküllerin ana kaynaklarıdır. Vasküler dokularda ise mitokondriyal olmayan membranla ilişkili NAD(P)H oksidaz $.O_2^-$ anyonun major kaynağıdır (101). Bu enzim NADH'dan veya NADPH'dan moleküler oksijene transfer etmekte ve süperoksit anyonu oluşmaktadır. ROS üretimi, Ang II içeren bir çok sitokin ve büyüme faktörü tarafından düzenlenmektedir. Kardiyak, vasküler düz kas, endotel, adventisyal ve mezenşimal hücrelerde Ang II, NAD(P)H oksidaz aktivitesini uyararak süperoksit anyonun üretimini artırmaktadır (39). Bu etki devamlıdır, dolayısıyla hücre büyümesi gibi uzun etkili sinyalizasyonuna katkıda bulunmaktadır. Ang II tarafından VDKH'lerin büyümesi, kısmen p38 MAPK ve JNK aktivasyonu aracılı temel bir redoks sensitiv komponenti içermektedir (98). Ang II aracılı inflamatuvar cevapta önemli diğer redoks sensitiv yolak, Akt/PKB ve Nf- κ B aktivasyonu aracılı olmaktadır (101).

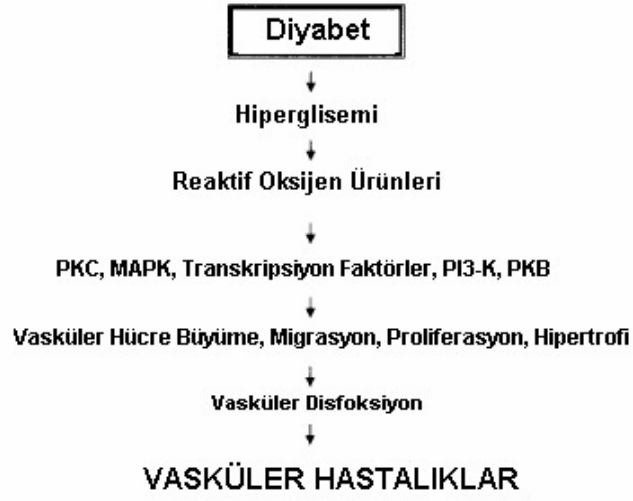
2.3.8. Ang II, Proto-onkogen ve Büyüme Faktörlerin Ekspresyonun Artırmaktadır

Ang II'nin uzun süreli etkisi ile düzenlenen hücresele büyüme, adhezyon, migrasyon, fibrosis ve kollajen değişimi protein sentezini içermektedir. İnsan ve rat kaynaklı VDKH'lerinde Ang II, c-fos, c-jun, c-myc, erg-1, VL-30 ve proto-onkogen/aktivasyon protein I kompleksi içeren bir çok proto-onkogenin ekspresyonunu uyarmaktadır (102). Erken cevap genlerinin Ang II tarafından stimülasyonu, PDGF, EGF, transformin büyüme faktörü- β , IGF-1 gibi büyüme faktörleri; ET-1 gibi vazokonstriktör ajanları, ICAM-1, VCAM-1, E-selektin ve integrinler gibi adhezyon molekülleri; TNF- α , monosit kemoatraktan protein-1 gibi

kemotaktik faktörlerinin artmış gen ekspresyonu ve üretimi ile ilişkilidir (102). Kardiyovasküler dokularda bu ajanlar indirek olarak Ang II'nin inflamatuvar ve trofik etkilerine katkıda bulunabilmektedir. Ang II, damar duvarlarının ekstraselüler matriksinin major elemanları olan fibronektin, kollajen tip 1, tenaskin, glukozaminoglikanlar, kondroitin/dermatan sülfatlar ve proteoglikanların ekspresyonunu artırmaktadır. VDK, mezenşimal ve endotel hücrelerinde Ang II, hücre migrasyonun düzenlenmesinde ve yıkımında ve ekstraselüler matriks dönüşümünü etkileyen plazminojen aktivatör-1'in aktivite ve seviyelerini artırmaktadır. Ang II aynı zamanda ekstraselüler matriksin yıkımından sorumlu matriks metalloproteazların aktivitesini de düzenlemektedir (102). Bundan dolayı Ang II ekstraselüler matriksin yapısal komponentlerini ve ekstraselüler matriksi yıkan diğer faktörlerin üretimini uyararak vasküler yapıyı etkilemektedir (39).

2.4. Hiperglisemi ve Ang II Uyarımlı Sinyalizasyon

Moleküler düzeyde bir çok sinyal iletim yolu oksidatif stres ile aktive olmakta, böylece hücre proliferasyona ve büyümesine katkıda bulunmaktadır (23, 104). Ayrıca VDKH'lerinde bu yolların bazıları hiperglisemiye cevaben uyarılmaktadır. Bazı çalışmalarda hiperlisemi ve Ang II uyarımlı sinyal yolları arasında ilişki bulunmuştur. VDKH'lerinde hiperglisemi, Ang II uyarımlı ERK1/2, p38 MAPK ve Jak/STAT aktivasyonu, normoglisemik hücrelere göre artmış olarak bulunmuştur. Hiperglisemiye cevaben ROS ürünlerinin oluşumu protein tirozin fosfotaz (PTPaz) aktivitesini inhibe ederek düzenlemektedir (103). HücreSEL PTPaz'ın inhibisyonu fosforilasyon defosforilasyon dengesini fosforilasyona doğru kaydırmaktadır. Bu durumda reseptör ve non-reseptör tirozin kinazların bazal aktivitelerinin artması, ilgili substrat proteinlerin tirozil fosforilasyonunu artırmaktadır. Dolayısı ile MAPK yolu ve transkripsiyon faktörlerin aktivasyonuna yol açmaktadır (23). Özetle, sinyal yolları hiperglisemiye cevaben aktive olmaktadır. Eğer bu yollar uygun bir şekilde düzenlenmezse VDKH'lerin anormal büyümesine, migrasyona ve proliferasyona neden olabilecek potansiyeldedir. Böylelikle diyabette vasküler disfonksiyona neden olabilmektedir (Şekil 2.4.1.).



Şekil 2.4.1.: Diyabet ilişkili vasküler hastalıklara neden olabilecek ana basamaklar (23).

MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal ve Kimyasal Malzemeler

Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS), kalsiyum klorid (CaCl₂), hepes, elastaz, kollejenaz, soya tripsin inhibitör, bovine serum albumin, fetal bovine serum, L-glutamin, penisilin-streptomisin ve DMEM Sigma'dan satın alındı.

Tripsin-EDTA, ICN'den satın alındı.

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

Hücre kültüründe aktivatör olarak kullanılan Anjiyotensin II Sigma'dan, inhibitör olarak kullanılan AG1295, GF109203X Calbiochem'den satın alındı. AT1 antagonistisi losartan, Merck Sharp&Dohme firması tarafından hediye edildi.

Hücre lizat tamponunda kullanılan proteaz inhibitör kokteyli Calbiochem'den satın alındı.

İmmünohistokimyasal analizler için Dako marka immünohistokimya kiti kullanıldı. İmmünohistokimya için kullanılan primer ve sekonder antikorlar Sigma'dan alındı.

Protein ölçümleri için Bio-Rad marka protein deney kiti kullanıldı.

Western blot için Bio-Rad marka Mini-Protean Western Blot seti kullanıldı.

Sinyallerin belirlenmesinde kemilüminesan olarak Bio-Rad kit kullanıldı.

Membran olarak 0,2 µm por genişliğindeki Bio-Rad marka nitroselüloz membran kullanıldı.

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

Metanol Merck'den alındı.

Western blot işleminde kullanılan diğer kimyasal malzemeler Sigma'dan satın alındı.

Primer ve sekonder antikorlar Cell Signalling Technology, Biosource International ve Upstate Biotechnology firmalarından satın alındı.

3.2. Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler

Spektrofotometre	: Thermo Labsystems Multiskan Spectrum, 1500
Santrifüj	: Heraeus Instruments Megefuge 1.0 R
Santrifüj	: Nüve NF 800
İnkübatör	: SL Shel Lab CO ₂ İncubator
Sonikatör	: Bandelin sonopuls UV 2070
Buzdolapları	: İndesit (+4, -20 °C)
Çalkalayıcı	: Stovall, The Belly Buttum
pH Metre	: Schott CG 840
Su Banyosu	: B. Braun Biotech International
Hassas Terazi	: Shimadzu AW 120
Güç Kaynağı	: Power Pack 300, Bio-Rad
İnverted mikroskop	: Zeiss, Olympus
Kültür Kabini	: Bilser Marka

Plastik ve cam malzemeler Akdeniz Üniversitesi Sterilizasyon Merkezinde steril edildi.

Deneyde kullanılan 250-350 g ağırlığındaki erkek wistar ratlar Akdeniz Üniversitesi deney hayvanlarından temin edildi.

Vasküler düz kas hücrelerinin izolasyon işlemleri, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminde yapıldı.

Primer hücre kültürü işlemleri ve protein ölçümleri Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda yapıldı.

İmmünohistokimya ve Western Blot teknikleri Biyokimya Anabilim Dalı'nda yürütüldü.

3.3. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu (105)

3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar

Transfer Ortamı: Solüsyon 0,2 mM olacak şekilde 2,94 mg CaCl₂ tartılıp 10 ml HBSS içinde çözüldü. Çözelti steril 0,22 µm'lik filtrelerden geçirildi ve 90 ml steril HBSS eklenip final hacim 100 ml'ye tamamlandı. Total hacimde % 2 oranında 2 ml penisilin-streptomisin (PS) antibiyotiği eklendi ve + 4 °C'de saklandı.

Enzim Ayrıştırma Solüsyonu (EAS): Final hacim 4 ml olacak şekilde steril HBSS solüsyonu içerisinde (Ca⁺²-Mg⁺² içermeyen) 0,2 mM Ca⁺² (CaCl₂), 15 mM HEPES (pH: 7,2-7,3), 0,0625 mg/ml elastaz, 0,25 mg/ml soya tripsin inhibitör (STİ), 0,5 mg/ml kollajenaz, 2,0 mg/ml bovine serum albumin (BSA) çözüldü. Bunun için aşağıdaki stok solüsyonlar hazırlandı.

CaCl₂: Solüsyon 0,2 mM olacak şekilde, 10 ml HBSS solüsyonu içerisinde 2,352 mg CaCl₂ çözüldü. Çözelti 0,22 µm'lik steril filtreden geçirildi ve steril olarak

+4 °C’de saklandı. Final hacim 4 ml olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 0,5 ml alınıp enzim ayrışma solüsyonuna eklendi.

Hepes: Solüsyon 15 mM olacak şekilde, 10 ml HBSS içerisinde 143,1 mg Hepes çözüldü. Çözelti 0,22 µm’lik steril filtreden geçirildi ve steril olarak +4 °C’de saklandı. Final hacim 4 ml olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 1 ml alınıp enzim ayrışma solüsyonuna eklendi.

Elastaz: Steril toz şeklinde bulunan 5 mg tip E pankreatik elastaz (90 U), 5 ml HBSS’de çözülür. Stok solüsyon, 10 adet 0,5 ml’lik steril plastik tüplere bölündü ve -20 °C’de saklandı. Her plastik tüp 2 kullanımlık olacak şekilde ayarlandı. Her tüpte 0,0625 mg/ml elastaz olacak şekilde, 250 µl stok solüsyon enzim ayrışma solüsyonu ile 4 ml’ye tamamlandı.

STİ : Solüsyon 0,25 mg/ml olacak şekilde, 5 ml HBSS solüsyonu içerisinde 5 mg STİ Tip I-S tartılıp çözüldü. Çözelti 0,22 µm’lik steril filtreden geçirildi ve +4 °C’de saklandı. Final hacim 4 ml olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 1 ml alınıp enzim ayrışma solüsyonuna eklendi.

Kollajenaz Tip I-A: Steril toz şeklinde bulunan 100 mg kollajenaz (125 U), 12,5 ml HBSS’de çözüldü. Stok solüsyon 25 adet 0,5 ml’lik steril plastik tüplere bölündü ve -20 °C’de saklandı. Her tüp 2 kullanımlık olarak ayarlandı. Her tüpte 0,5 mg/ml kollajenaz olacak şekilde, 250 µl stok solüsyon, enzim ayrışma solüsyonu ile 4 ml’ye tamamlandı.

Bovine Albumin : Solüsyon 2 mg/ml olacak şekilde, 5 ml HBSS solüsyonu içerisinde 80 mg albumin tartılıp çözüldü. Çözelti 0,22 µm’lik steril filtreden geçirildi ve +4 °C’de saklandı. Final hacim 4 ml olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 0,5 ml alınıp enzim ayrışma solüsyonuna eklendi.

Bu stoklardan alınan hacimler, final hacim 4 ml olacak şekilde Tablo 3.3.1.’deki gibidir.

Tablo 3.3.1.: Enzim Ayrışma Solüsyonu Bileşenleri ve Miktarları

STİ	Hepes	Ca ⁺²	BSA	Elastaz	Kollejenaz	HBSS	TOPLAM
1 ml	1 ml	0,5 ml	0,5 ml	250 µl	250 µl	0,5 ml	4 ml

3.3.2. Metod

Hücrelerin İzolasyonu: Ratlar, steril koşullar altında eter anestezisi uygulanarak torasik aorta ve abdominal aortanın üst kısmı disseke edildi. Aorta buz içindeki steril bir petri kabı içine alındı. Petriye transfer medyumu konuldu. Enjektöre çekilen 5 ml transfer medyumu ile aortanın iç çeperi yıkandı. Bu sayede kan ortamdan uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler UV ile steril edilmiş ayrı bir odada, buz içinde ve disseksiyon mikroskobu altında, steril mikro-cerrahi set yardımıyla yapıldı. Aorta segmenti transfer medyumu içeren temiz bir parafinli petri

kabına alındı. Aorta, boyuna olacak şekilde toplu iğneler yardımıyla parafin bloğa tutturuldu. Disseksiyon mikroskobu altında steril mikro doku makası ve ince uçlu pens yardımıyla aortanın dış kısmındaki yağlar ve venöz yapılar temizlendi. Aorta boyuna kesildi ve dikdörtgen şeklinde açılarak hafif gerilmiş vaziyette uçlarından toplu iğneler ile parafin bloğa tutturuldu. Aortanın dış kısmındaki kılcal damarlar kesilerek alındı. Kalan yağ parçaları tamamen temizlendikten sonra steril bir bistüri yardımıyla aortanın dışı kazındı. Yaklaşık olarak aortanın dıştaki 1/3'lük kısmı bu şekilde temizlendi. Bu sayede, dış damar duvarındaki adventisya dokusunu ortamdan uzaklaştırıldı. Disseksiyon mikroskobu altında adventisya dokusu ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra petri kabı içerisindeki aortun iç kısmı pamuklu bir çubuk ile hafifçe sıyrıldı. Bu işlem birkaç kez tekrarlandı. Bu sayede aortun lümenine bakan tek katlı epitel dokusu ortamdan uzaklaştırıldı. Adventisya ve endotel ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra aorta transfer medyumu ile yıkandı ve içinde steril transfer medyumu bulunan 1,5 ml'lik plastik tüpe alındı. Plastik tüp, buz içinde hücre kültürünün yapıldığı ortama taşındı.

3.4. Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin Kültürü (105)

3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Dengeli Tuz Solüsyonu): Kalsiyum ve magnezyum içermeyen HBSS solüsyonu 0,4 g/L potasyum klorid, 0,06 g/L potasyum fosfat, 8,0 g/L sodyum klorid, 0,04788 g/L sodyum fosfat, 1,0 g/L D-glukoz içermektedir.

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.

Kültür Ortamı (Besi Yeri) Hazırlanması: Besi yeri olarak Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kullanıldı. Solüsyon 425 ml medyum üzerine 50 ml fetal bovine serum (%10), 5 ml (%1 v/v) penisilin-streptomisin, L-glutamin 0,584 g/L olacak şekilde, 20 ml saf DMEM'de çözülerek hazırlandı. Solüsyon steril filtrelerden geçirildi ve her şişeye 10 ml konuldu. Konsantrasyonu 25 mM olacak şekilde 5,9625 g HEPES tartıldı ve 20 ml saf DMEM içinde çözülüp steril filtrelerden geçirildi. Her şişeye 20 ml konuldu. Sonuçta toplam 500 ml'lik besi yerleri hazırlandı.

3.4.2. Metod

Düz Kas Hücrelerinin Kültürü: Plastik tüp içindeki temiz aorta ve transfer medyumu steril kültür kabini içerisinde 15 ml'lik doku petrilere transfer edildi. Transfer medyumu otomatik pipet ile çekilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Aorta iki adet steril bistüri yardımıyla toplu iğne başı büyüklüğünde küçük parçalara ayrıldı. Bu sayede enzimle reaksiyona girecek olan dokunun yüzey alanı artırılmış oldu. Daha önceden hazırlanmış ve 37 °C sıcaklığa getirilmiş 4,0 ml EAS petriye eklendi. Petrinin etrafı parafilm ile sarıldı ve 37 °C'lik etüvde, 45 dakika hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Bu süre içerisinde düz kas dokusu, enzimler yardımıyla düz kas

hücrelerine ayrıştırılmaya çalışıldı. 45 dakika sonunda petri etüvden çıkarıldı ve steril kültür kabini içerisine alındıktan sonra 10 ml'lik plastik enjektöre çekilen doku süspansiyonu 5-6 kez 14 µm'lik çelik uçlu kanülden geçirilir. 14 µm'lik metal kanül düz kas hücrelerinin mekanik etkiyle birbirinden ayrılmasını kolaylaştırmak için kullanıldı. Petri kabına EAS'nin 2 katı (8 ml) medyum eklendi. Bu sayede enzim konsantrasyonu dilüe edilmiş oldu. Toplam hacmi 12 ml olan hücre süspansiyonu 15 ml'lik steril plastik tüplere alındı ve 200g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra steril ortamda süpernatant kısmı tamamen çekilerek atıldı. Dipteki pellet 10 ml medyum ile tekrar resüspanse edildi. 200g'de 5 dakika santrifüj edildi ve üstteki süpernatant atıldı. Bunun amacı ortamda dilüe halde kalan ve dokuyu yıkan enzimleri (elastaz, kollejenaz) tamamen ortamdaki uzaklaştırmaktır. Hücre pelletleri ısı ile inaktive edilmiş 3 ml DMEM ile resüspanse edildi. Bu hücre süspansiyonu 12,5 cm²'lik doku kültür flaskına transfer edildi. Bu flask 37 °C'de nemlendirilmiş %5 CO₂-% 95 atmosfer hava içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin tutunmalarını kolaylaştırmak için ilk 24 saat hücrelere dokunulmadı. Primer kültür 2. günden itibaren rutin olarak her gün invert kontras mikroskopi ile incelendi. İlk hücrelerin flaskta görünmesi için 3-5 gün beklendi. Bu zaman içerisinde hücrelerde herhangi bir enfeksiyonun olup olmadığı kontrol edildi. İlk hücreler tutunmuş olarak flaskta görüldüğü gün veya en geç 4-5. günün sonunda ortamdaki doku yıkıntıları ve hücre atıklarını ortamdaki uzaklaştırmak için bir defaya mahsus olmak üzere hücreler 3 ml medyum ile bir kez yıkandı. Daha sonra hücreleri taze medyum ile beslemek amacıyla 5 ml 37 °C sıcaklıkta medyum eklendi. Medyumlar 24-72 saat aralıklar ile rutin olarak değiştirildi.

Hücrelerin Pasajlanması (Tripsinizasyon): Hücreler 75 cm²'lik hücre kültürü flasklarında büyütüldü. Pasajlanacak olan hücrelerin bulunduğu kültür kabının medyumunu çekildi. Hücreler 37 °C'ye getirilmiş 10 ml steril PBS ile 1 kez yıkandı. Daha sonra PBS aspire edildi. 1 ml 1X tripsin-EDTA flaskta konuldu ve 37 °C'lik etüvde 2-3 dakika inkübe edildi. Üzerine 10 ml medyum eklendi ve 4-6 sefer 10 ml'lik steril pipetden geçirildi. Toplam 11 ml'de bulunan hücreler 1'er ml şeklinde 10 tane 60 mm'lik petrilere ve 1 tane 75 cm²'lik flaskta pasajlandı. 24 saat sonra medyumları değiştirildi.

Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığı Testi: Hücre kabı içerisindeki hücreler tripsinize edildi ve santrifüj sonrası dipte oluşan pellet 3 ml medyum ile süspanse edildi. 100 µl hücre süspansiyonu, 100 µl % 0,5'lik tripan blue ile süspanse edildi. Hücreler Thoma lamına alındı ve mikroskopta 20X'lik büyütmeyle incelendi. Membranı mavi boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak kabul edildi.

Hücre sayımı için dipte kalan pellet 1 ml medyum ile süspanse edildi. Resüspansiyondan Thoma lamına damlatıldı ve 5 farklı alan sayılıp toplandı. Toplam sayı 5'e bölündü ve çıkan değer 10⁶ ile çarpılıp 1 ml'deki hücre sayısı hesaplandı.

3.5. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu

3.5.1. Hücrelerin İmmünohistokimya Preparatları Haline Getirilmesi

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

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

İmmünohistokimyasal analizler için preparatlar 4 gruba ayrıldı.

1. Normal boyama kontrolü için PBS ile kontrol grubu çalışıldı.
2. İzotip kontrol için sekonder antikor olan fare kaynaklı IgG2a'nın 1/800 ve 1/1600 dilüsyonları çalışıldı.
3. Endotel hücrelerini göstermek için Von Willebrand faktör primer antikorunun 1/500 ve 1/1000 dilüsyonu çalışıldı.
4. Vasküler düz kas hücrelerini göstermek için düz kas α-aktin primer antikorun 1/800 ve 1/1600 dilüsyonu çalışıldı.

3.5.2. Kullanılan Solüsyonlar

İmmünohistokimya için hazır kit, düz kas boyamaları için fare kökenli α-düz kas spesifik aktin antikor, endotel boyamaları için fare kökenli Von Willebrand faktör antikor, antikor dilüsyonları için antibody dilüent, sekonder antikor olarak da fare kökenli horse radish peroksidaz enzimiyle işaretli IgG2a antikor kullanıldı.

TBS Stok Solüsyon (Tris Buffer salin, 10 X konsantre): TBS solüsyonu hazırlamak için 60,55 g Tris, 87,66 g NaCl 800 ml distile suda çözüldü. Solüsyonun pH'sı HCl ile 7,4'e ayarlanır. Final hacim 1000 ml olarak distile su ile tamamlandı.

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

3.5.3. Metod

İmmünohistokimyasal analiz için aşağıdaki protokol takip edildi.

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

3.6. VDKH Kültürlerinin Western Blot Analizi için Lizatlarının Hazırlanması

3.6.1. Kullanılan Solüsyonlar

Enzim Ayırma Tamponu: Enzim ayırma tamponu 25 mM Tris HCl, pH 7,4, %1 Triton X-100, %10 Gliserol, 10 mM sodyum pirofosfat, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM Fenilmetilsülfonil florid, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin içermektedir.

PBS (Fosfat Tamponlu Salin, 10X konsantre): 10 X konsantre PBS için 2 g KCl, 80 g NaCl, 14,4 g Na_2HPO_4 , 2 g KH_2PO_4 tartılıp 1L distile suya tamamlandı. pH'sı 7,4'e ayarlanır. Kullanım esnasında 1:10 oranında sulandırıldı.

3.6.2. Kullanılan Aktivatörler

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

3.6.3. Kullanılan İnhibitörler

Losartan: Toz halindeki losartan 4,6201 mg tartılıp 10 ml PBS içinde çözüldü (10^{-3} M). 500 μl 'lik alikatlara bölünüp -20°C 'de saklandı. İnhibisyon ortamında 10^{-5} M olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

AG1295: Toz halindeki 5 mg PDGF-Beta reseptör inhibitörü 4 ml DMSO içinde çözüldü (10 mM). 50 μl 'lik alikatlara bölünüp -20°C 'de saklandı. İnhibisyon ortamında 10 μM olacak şekilde dilüe edildi (87).

GF109203X: Toz halindeki 250 μg PKC inhibitörü 1 ml DMSO'da çözüldü (5 mM). 100 μl 'lik alikatlara bölünüp -20°C 'de saklandı. İnhibisyon ortamında 5 μM olacak şekilde dilüe edildi (106).

3.6.4. Metod

VDKH'leri 60 mm'lik petrilere pasajlandı. % 80-90 yoğunluğa gelinceye kadar normoglisemik hücreler normoglisemik (5 mM) medyumda, hiperglisemik hücreler hiperglisemik medyumda (25 mM) beslendi.

1. Yoğunluğu % 80'e gelen hücreler steril PBS ile bir kez yıkandı.
2. Serum içermeyen 3 ml normoglisemik ne hiperglisemik DMEM (pH 7,4) hücrelere eklendi ve 48 saat inkübe edildi.
3. 60 mm'lik petrilere deneye uygun inhibitör ve aktivatörler ile belirli zaman periyotlarında inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyonu bitirmek için buz üzerinde medyum hızlı bir şekilde aspire edildi.
5. 3 ml 1X PBS ile 2 kez yıkandı ve PBS ortamdan uzaklaştırıldı.
6. 300 µl buz soğukluğunda ayrışma tamponu eklendi.
7. Hücreler kuyucuklardan özel hücre kazıyıcısı yardımıyla kazındı ve plastik tüplere toplandı.
8. Ultrasonik homojenizatör ile 9000 rpm'de 10 saniye sonike edildi.
9. Santrifüjde +4 °C'de 150000 rpm'de 10-15 dakika santrifüj edilir.
10. Temiz süpernatant kısmı western blot analizi için kullanıldı.

3.7. Protein Miktarının Tayin Edilmesi

3.7.1. Protein Ölçüm Kitinin Prensibi

Bu yöntem ilk defa 1976 yılında Analytical Biochemistry dergisinde Bradford tarafından gösterilmiştir. Proteinler asidik ortamda coomassie brilliant blue G-250'e bağlandıkları zaman 595 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Verdiği absorbans spektrofotometrede ölçülmektedir.

3.7.2. Kullanılan Malzemeler

Hücre Lizis Tamponu:

- 10 mM Tris, pH 7.4,
- 100 mM NaCl (Sodyumklorür),
- 1 mM EGTA (Etilenbis (oksietilennitrilo) tetraasetikasit),
- 1 mM EDTA (Etilen diamin tetra asetikasit),
- 1 mM NaF (Sodyumflorid),
- 20 mM Na₄P₂O₇ (Sodyumpirofosfat)
- 2 mM Na₃VO₄ (Sodyumortovanadat),
- 0.1 % SDS (Sodyum dodesil sülfat),
- 1 % Triton X-100,
- 10 % Gliserol,
- 1 mM PMSF (Fenilmetansulfonilflorid).

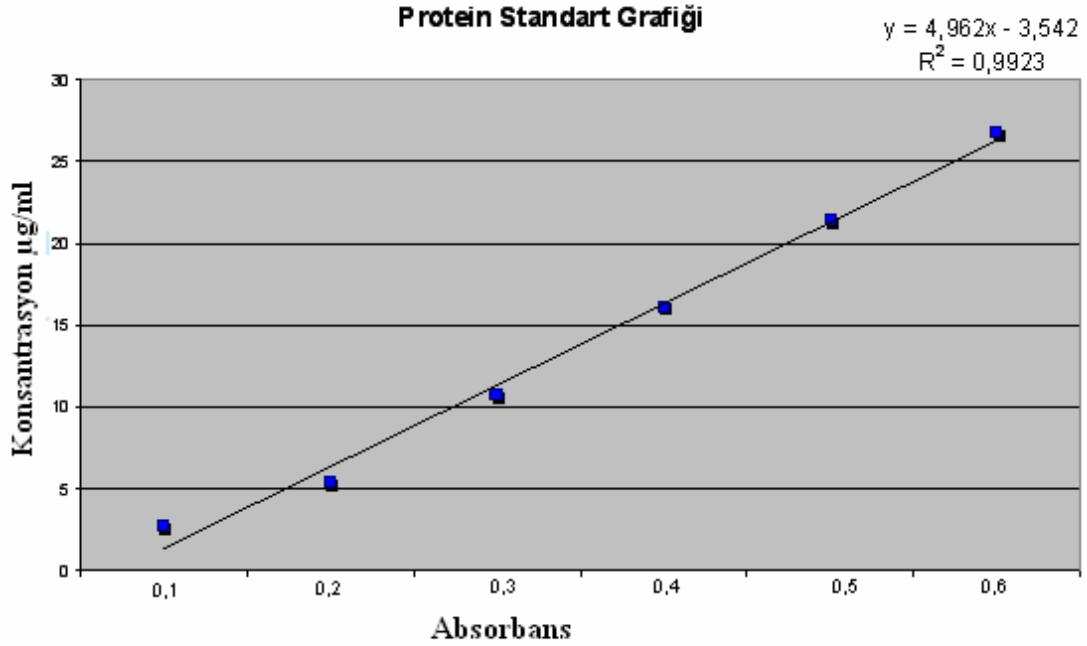
Hücre Lizis Tamponu, yukarıdaki konsantrasyonda olacak şekilde 1L hazırlandı ve 15'er ml'lik plastik tüplere bölündü. Hücre lizis tamponu kullanılmadan önce taze olarak proteaz inhibitör kokteyli (calbiochem, cat# 539131, 1x kokteyl 1µM Leupeptin, 1µg/ml Aprotinin, 1µM E-64, 500 µM EDTA, 500 µM AEBSF içermektedir) eklendi.

3.7.3. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafiğın Hazırlanması

İmmunglobulinler 1.34 mg/ml olarak kitin içinde hazır verildi. Bu stoktan 2, 4, 8, 12, 16, 20 µl alınarak 1 ml’de dilüsyonlar yapılarak standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartların konsantrasyonları sırasıyla 26.73 µg/ml, 21.38 µg/ml, 16.08 µg/ml, 10.72 µg/ml, 5.36 µg/ml, 2,68 µg/ml’dir. Standartların sırasıyla absorbans değerleri 0.568, 0.499, 0.365, 0.292, 0.205, 0.105’dir.

Protein ölçümü için kitin içinde hazır olarak verilen protein boyama reagent 5:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

Standart solüsyonundan 10 µl ve 1ml protein ölçüm kitinden pipetlenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında standartlar kendi körüne karşı 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede aynı anda okundu. Tüm protein standartları çift çalışıldı ve sonuçların ortalamaları alındı. Okunan absorbans değerlerine göre standart grafiğı çizildi (Şekil 3.7.1). Elde edilen doğru yardımıyla sonuçlar mililitredeki mikrogram protein miktarı olarak saptandı.



Şekil 3.7.1.: Protein Standart Grafiğı

3.7.4. Numunelerin Protein Miktar Tayini:

Hücre kültürlerinden hazırlanan lizatlar protein tayini için kullanıldı. Bio-Rad protein ölçüm kiti 1:5 oranında dilüe edildi. Hazırlanan her bir lizattan 5 µl alınıp dilüe edilmiş protein ölçüm kitinin 1 ml’sine pipetlendi. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda numuneler çift kontrollü olarak spektrofotometrede 595 nm’de körüne karşı okundu. Elde edilen absorbans değerleri, standart grafiğın yardımı ile örneklerin mililitresindeki mikrogram protein miktarının tayininde kullanıldı.

3.8. Jak2/STAT 1 Fosforilasyonun SDS-PAGE ve Western Immüno blot Analizi:

Rat aortik düz kas hücre kültürlerinde Ang II uyarımı sonrasında MAPK fosforilasyonu ve bu fosforilasyonda PLC ve PKC' nin rolü western blot tekniği uygulanarak belirlendi.

3.8.1. Elektroforez Jelinin Hazırlanması

Solüsyonların Hazırlanması:

Ayrıştırma jeli tamponu (Resolving Buffer) (1,5 M Tris pH 8,8): Tris 9,085 g tartıldı ve 20 ml distile su içinde çözüldü, pH 1,5 M HCl ile 8,8'e ayarlandı ve final hacim 50 ml'ye tamamlandı. 0,2 g SDS tartılıp solüsyona eklenip çözüldü. Solüsyon +4 °C'de saklandı.

Yükleme jeli tamponu (Stacking Buffer) (0,5 M Tris, pH 6,8): Tris 6,05 g ve 40 ml distile su içinde çözüldü, pH 1N HCl ile 8,8'e ayarlandı. 0,4 g SDS tartılır ve solüsyonda çözüldü. Solüsyon +4 °C'de saklandığında 1 ay stabildir.

Akrilamid – Bisakrilamid Solüsyonu: Akrilamid 30 g ve bisakrilamid 0,8 g tartıldı, 100 ml distile su içinde çözüldü.

Amonyum persülfat (%10; APS): Amonyum persülfat 50 mg tartıldı ve 0,5 ml distile su içinde çözüldü.

TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamin): Amonyum persülfattan serbest radikaller oluşmasını sağlayarak akrilamid ve bis akrilamidin polimerizasyonunu katalizleyen hazır solüsyon kullanıldı.

3.8.2. Jelin Hazırlanması ve Gerekli Kimyasalların Miktarı

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

Ayrıştırma Jeli (%10'luk): %9' luk ayrıştırma jeli Tablo 3.8.1'de verilen miktarların karıştırılması ile elde edildi.

Tablo 3.8.1. : Ayrıştırma jeli tamponu ve miktarları

	% 9
Distile Su	8,7 ml
Resolving buffer (pH: 8,8)	5 ml
Akrilamid	6 ml
% 10 APS	0.1 ml
TEMED	0,025 ml

Yükleme Jeli (%5): Yüklemeye Jeli Tablo 3.8.2' te verilen miktarların karıştırılması ile elde edildi.

Tablo 3.8.2.: Yüklemeye jeli tamponu ve miktarları

	<i>% 5</i>
Distile Su	3,050 ml
Stacking buffer (pH: 6,8)	1,250 ml
Akrilamid	0,650 ml
% 10 APS	0,025 ml
TEMED	0,005 ml

3.8.3. Jelin Dökülmesi İşlemi

- Jelin döküleceği camlar, üzerlerinde olabilecek partiküllerin jeli bozmaması ve proteinlerin düzgün bir şekilde yürümesini sağlamak için distile su ile yıkandı, % 70'lik alkolden geçirildi ve kurutuldu.
- Camlar hazır hale geldikten sonra ön ve arka cam birleştirildi ve kısıkaçlar yardımı ile sıkıştırıldı.
- Kısıkaçlara yerleştirilmiş camlar jelin sızıntısını engellemek için camların alt kısmı bantların üzerine gelecek şekilde dikey olarak yerleştirildi ve üsteki mandala tutturularak iyice sıkıştırıldı.
- Ayırışma jelinin ilk 3 solüsyonu karıştırıldı ve 5 dakika beklendi. 5 dakika bitiminde APS ve TEMED eklendikten hemen sonra jel karıştırılıp camlar arasında üstten 1-1.5 cm kalacak şekilde döküldü. TEMED polimerizasyon başlangıcında önemli bir rol oynadığından jel karışıma en son eklendi.
- Jelin hava ile temasını kesmek ve düzgün donmasını sağlamak için jelin üzerindeki boş bırakılan kısma distile su yavaş yavaş döküldü.
- Jel oda ısısında yaklaşık 60 dakika sonra katılaştı. Üst jelin (yüklemeye jeli) ilk 3 solüsyonu karıştırıldı. Alt jelin üzerindeki distile su boşaltılarak kurutma kağıdı ile kurutuldu.
- İki cam arasında 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi. Üst jele, APS ve TEMED eklendi ve hızlı bir şekilde karıştırılarak iki cam plak arasında tarakların içinde hava kalmayacak şekilde döküldü.
- Üst jel oda ısısında tamamen donduktan (yaklaşık 20 dakika) sonra camlar kısıkaçların içerisinden çıkarıldı ve jel artıkları temiz bir kağıt peçete ile silindi.
- Jelin içerisinde bulunduğu camlar üzerinde kutupların bulunduğu kısıkaçların içine yerleştirildi ve hemen elektroforez tankına alındı.

3.8.4. Elektroferez İşlemi

Solüsyonların Hazırlanması:

Redüklenmemiş Numune Tamponu (Loading Dye, Laemli, 5X konsantre):Laemli tamponu için 10 ml gliserol, 10 ml % 10 SDS, 1,25 ml 1 M pH 6,8 Tris, 7,5 ml β -merkaptoetanol ve brom fenol blue karıştırılıp 50 ml distile suya tamamlandı. Numune ile 1:5 oranında dilüe edilir.

Çalışma Tamponu (Elektroferez Running Buffer, 5X Stok Solüsyon): Tris 15 gr, 72 gr Glisin, 5 g SDS tartılır, 1000 ml distile su içinde çözüldü. Elektroferez aşamasında bu stok solüsyon 1:5 oranında dilüe edilmelidir.

Elektrofereze Konacak Örneklerin Hazırlanması:

- Protein miktarları tayin edilmiş lizatlar -20 °C'den alınarak buz içeren bir kaba kondu.
- Örnekler çözüldükten sonra protein konsantrasyonlarına göre 50 μ g protein olacak şekilde her numune 1.5 ml'lik ependorflara pipetlendi. Üzerine 5X laemli sample buffer numunelerin hacimlerine göre ayarlanarak eklendi. Örnekler boya ile iyice karıştırıldı.
- Hazırlanan örnekler 5 dakika kaynatıldı. Bu işlem esnasında plastik tüplerin kapaklarının açılmaması için etrafı parafilm ile sarıldı.

Elektroferez İşlemleri

- Elektroferez tankı, elektroferez tamponu ile dolduruldu ve camlar arasındaki taraklar çıkartıldı. Tarağın oluşturduğu kuyucukların içerisine girebilecek ince uçla enjektör ile hava pipetlenerek kuyucuklar temizlendi.
- İlk kuyucuğa molekül ağırlıkları bilinen proteinlerden oluşan karışım pipetlendikten sonra diğer kuyucuklara da örnekler yüklendi.
- Örneklerin yüklenmesi tamamlandıktan sonra uygun kutuplar bağlanarak tankın kapağı kapatıldı. Tank güç kaynağına bağlandı ve akım 80 V, 65 mA ayarlanarak elektroferez edildi.
- Yükleme boyası jelden çıktığında elektroferez sona erdirildi. Bu süre yaklaşık 2 saat kadar sürdü.
- Yükleme jeli kesilerek atıldı.
- Proteinleri içeren ayırma jeli protein transfer tamponuna konuldu. Bu aşamadan sonra jel, proteinlerin membrana transferi için hazır hale geldi.

3.8.5. Elektroferez Jelinin Membrana Aktarılması

Solüsyonların Hazırlanması:

Blotlama Tamponu (Blotting Buffer 1 L, 10X stok solüsyon): Tris 12,11 g, 30 g Glisin, 1 g Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA) tartıldı ve 1 L distile suda çözüldü. Kullanım esnasında 10X tampon 1X haline dönüştürülürken % 10 metanol eklendi.

Metanol: Transfer sırasında membranın şişmesi ve yapışan proteinlerin korunabilmesi için gereklidir.

İşlemler :

- Nitroselüloz membran, kurutma kağıtları ve süngerler buz soğukluğundaki blotting tamponu ile ıslatıldı ve 2-5 dakika tamponda bekletildi.
- Sandviç aparatının arasına gelecek şekilde en alta (-) kutup olmak şartıyla , transfer tamponu ile doyurulmuş sünger konuldu.
- Süngerin üzerine yine transfer tamponu ile doyurulan 3 adet kurutma kağıdı konuldu.
- Transfer kağıdının üzerine alt ve üst kısımlarına dikkat edilerek jel yerleştirildi.
- Jel üzerine nitroselüloz membran yerleştirildi.
- Üzerine 3 adet daha transfer tamponu ile doyurulan kurutma kâğıdı konuldu.
- Son olarak üzerine transfer tamponu ile doyurulan bir sünger daha konuldu ve bir silindir yardımı ile sandviçin içindeki hava kabarcıkları alındı. Sandviç aparatı üzerinden sıkıştırılarak kapatıldı.
- Hazırlanan sandviçin anot kutbu anota, katot kutbu katota bakacak şekilde, elektroferez tankına yerleştirildi. Tank blotlama tamponu ile dolduruldu.
- 1,5 saat +4 °C'de 80 V'ta ve yaklaşık 350 mA'de magnetik balık ve magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak ve her 30 dakika bir buz kabı değiştirilerek yürütüldü.
- 1,5 saat sonra sandviç tanktan çıkartıldı ve böylece membran antikör ile işaretlemeye hazır hale getirildi.

3.8.6. Membranların Antikör ile İşaretlenmesi

Solüsyonların Hazırlanması:

TBS Stok Solüsyon (Tris Buffer salin, 10X konsantre): TBS solüsyonu hazırlamak için 60,55 g Tris, 87,66 g NaCl 800 ml distile suda çözünür. pH, HCl ile 7,4'e ayarlanır. Final hacim 1000 ml olarak distile su ile tamamlandı.

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

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

% 5' lik Süt Tozu Çözeltisi (Bloklaama Çözeltisi): %5'lik bloklaama çözeltisi için 0,5 gr yağsız süt tozu tartılarak 10 ml TBS içerisinde çözüldü. Solüsyon 10 dakika magnetik karıştırıcıda karıştırılarak tam çözünmesi sağlandı.

Fosfo- Jak2 ve STAT1 Primer Antikoru: Primer antikor -20 °C'de saklandı. Kullanım esnasında 1:1000 dilüsyon kullanıldı. 5 ml TBST içinde 0,25 gr yağsız süt tozu çözüldü ve 5 µl primer antikor eklendi.

HRP (Horse - Radish Proxymase) konjuge anti-rabbit Sekonder Antikoru: Enzim işaretli, rabbit kökenli sekonder antikor -20°C'de saklandı. 1:2000 oranında dilüe edilerek kullanıldı. Bloklaama çözeltisinin 10 ml'sinde 5 µl sekonder antikor çözüldü.

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

İşlemler:

- Membran, temiz ve membranın sığabileceği büyüklükte bir petri kabında TBST ile yıkandı.
- Membranın yüzeyini örtecek şekilde bloklaama çözeltisi ilave edilerek 1 saat oda ısısında çalkalayıcı üzerinde hafifçe çalkalandı.
- TBST ile 10 dakika 3 kez yıkandı.
- Primer antikor ile membran yaklaşık tüm gece +4 °C'de hafifçe çalkalayıcı üzerinde çalkalandı.
- Süre sonunda antikoru içeren çözelti döküldü ve membran 10 dakika da bir 3 kez TBST ile hafifçe çalkalandı. Böylece zayıf olarak bağlanan ya da bağlanamamış antikolar membran üzerinden temizlendi.
- Yıkama işlemi bittikten sonra TBST ortamdan uzaklaştırıldı ve enzim işaretli sekonder antikor ile membran 1 saat çalkalandı.
- 1 saat sonunda tekrar TBST ile 10 dakikada bir 3 kez yıkama işlemi yapıldı.
- Yıkama işlemi sonunda membranlar pens yardımı ile yıkama solüsyonu içerisinde alınıp ve üzerindeki solüsyonu temiz bir kağıt peçeteye emdirildi.
- Membranlar hızlı bir şekilde temiz ve düzgün bir yüzeye yerleştirildi. Üzerine 1:1 oranında karıştırılan ECL-1 ve ECL-2 tüm yüzeyi kaplayacak şekilde yayıldı.
- Membranlar ECL ile yaklaşık 3 dakika bekletildi.

- Sürenin sonunda membran üzerindeki ECL temiz bir kağıt peçeteye emdirildi ve membranlar streç film üzerine yerleştirildi
- Hızlı bir şekilde membranın üzeri de streç film ile kaplandıktan sonra membran film kasetinin içerisine bantlandı.
- Bu aşamadan sonraki işlemler karanlık odada yapıldı.

3.8.7. Membrandaki Sinyallerin Filme Aktarılması

Kullanılan Solüsyonlar:

Hyperfilm: Kemilüminesan sinyallere yüksek afiniteli film kullanıldı.

Developer: Developer 1:10 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

Fiksatif: Fiksatif 1:10 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

İşlemler:

- Kasete bantlanan membranın üzerine karanlık odada film konuldu ve 5 dakika beklendi.
- Sürenin sonunda kaset açıldı ve film membranın üzerinden alınıp karanlıkta developer içine konuldu. Filmin üzerinde sinyaller görününceye kadar hafifçe sallandı.
- Daha sonra film developerdan alınıp fiksatife konuldu. Bu aşamadan sonra ışık açılabilir.
- Fiksatiften çıkan film distile suyla yıkandı ve kuruması için temiz bir yere asıldı.

Filmler protein standartlarına göre değerlendirildi.

3.8.8. Sinyallerin Grafik Haline Dönüştürülmesi

Filme aktarılan sinyaller, bilgisayar ortamında Windows XP işletim sisteminde çalışan Scion Image programı ile grafik haline dönüştürüldü. Bir bandın yoğunluğu 100 birim kabul edildi ve her grupta diğer bandlar 100 birim üzerinden değerlendirildi.

BULGULAR

4.1. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu

VDKH'lerin izolasyonu ve primer kültürü yapıldıktan sonra hücrelerin düz kas hücresi olduğunu gösterebilmek amacı ile VDKH'lerin 2. kuşak primer kültürlerine immünohistokimya tekniği uygulandı. Primer kültüre aktarılan hücreler lamalar üzerinde üretildi ve immünohistokimyasal karakterizasyon için uygun preparatlar haline getirildi.

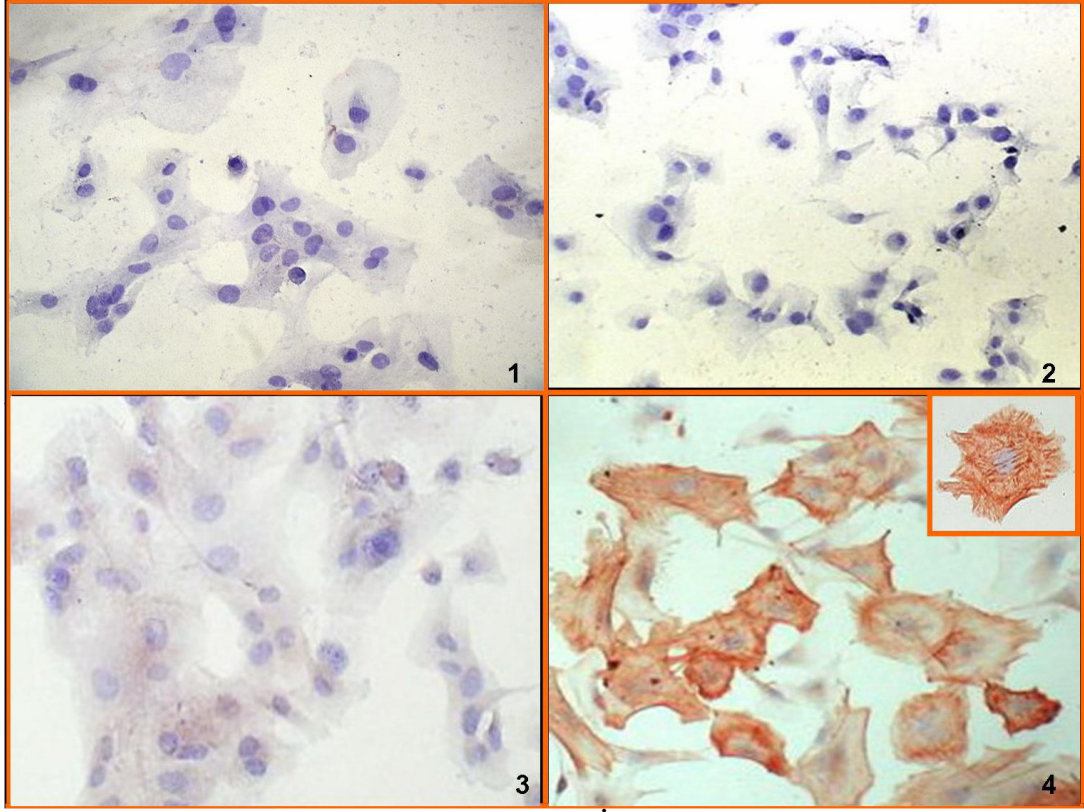
İmmüno preparatlar 4 gruba ayrılarak çalışıldı.

1. Kontrol Grubu: İmmünohistokimyasal analizlerde kontrol amacıyla kullanıldı. Kontrol gruplarında hiçbir boyamanın olmaması boyamaların primer antikora spesifik olduğunu gösterdi (Şekil 4.1.1).

2. İzotip Kontrolü: Boyanmaların sekonder antikordan kaynaklanmadığını göstermek amacıyla kullanıldı. Preparatlarda boyamanın olmaması sekonder antikordan kaynaklanan boyamanın olmadığını, boyanmaların primer antikora spesifik olduğunu gösterdi (Şekil 4.1.1-2).

3. Von Willebrand Faktör Grubu: İzole edilip kültüre aktarılan hücrelerde endotel hücresi bulunup bulunmadığını göstermek amacıyla, Von Willebrand Faktör primer antikoru kullanılarak hücreler boyandı. Preparatlarda kırmızı boyalı alanların olmayışı izole edilen hücrelerde endotel hücresi bulunmadığını göstermektedir (Şekil 4.1.1-3).

4. α -Aktin Grubu: Vasküler düz kas hücrelerini gösterebilmek amacıyla düz kas hücrelerinin α -aktin'leri, VDK hücrelerine spesifik α -aktin primer antikoruyla boyandı. Preparattaki kırmızı boyalı alanlar α -aktin'e spesifik düz kas hücrelerini göstermektedir (Şekil 4.1.1-4). Şekil 4.1.1-4'deki küçük pencerede tek bir hücredeki α -aktin fiberleri net olarak görülmektedir.

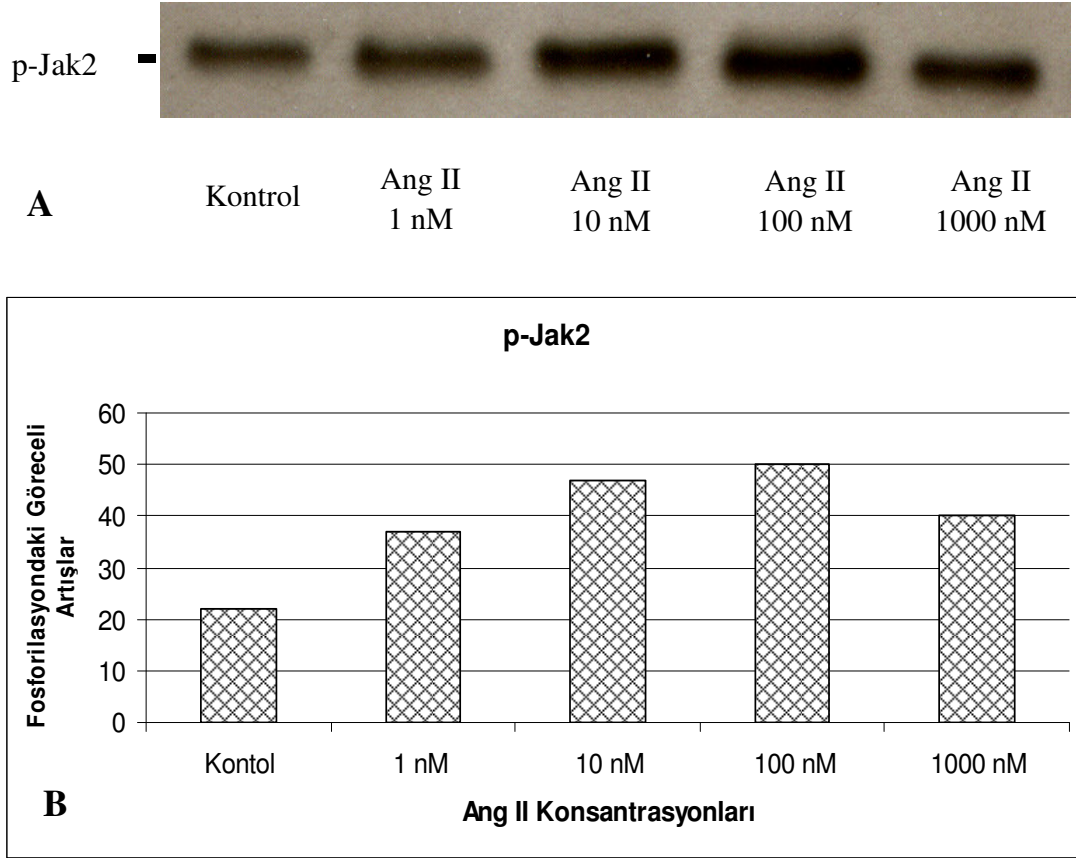


Şekil 4.1.1.: Vasküler Düz Kas Hücre Kültürlerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu. 1, kontrol gruplarını; 2, izotip kontrolünü; 3, endotel hücrelerinin von willebrand faktör boyamalarını; 4, vasküler düz kas hücrelerinin α -aktin'lerini göstermektedir. Boyalı alanlar kırmızı renkli görünmektedir.

4.2. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımlı Jak2/STAT1 Fosforilasyonunun Western Blot Sonuçları

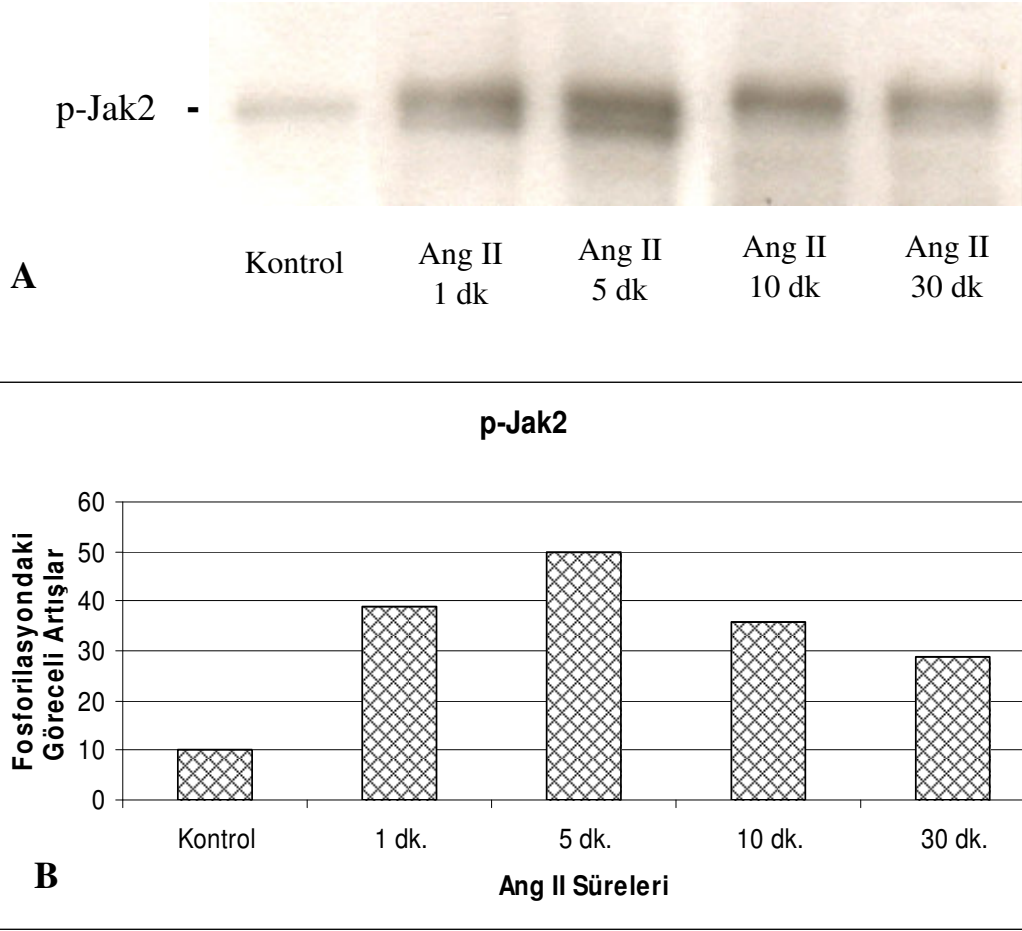
4.2.1. VDKH'lerinde Ang II'nin Jak2 Fosforilasyonu Üzerine Doz ve Zaman Bağımlı Etkileri

VDKH kültürlerinde, Ang II'nin Janus aktive edici kinazları aktive eden en iyi konsantrasyonunu bulabilmek için hücre kültürleri 1 nM, 10 nM, 100 nM ve 1000 nM farklı Ang II konsantrasyonları ile 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre lizatlarından western blot tekniği ile Jak2 aktivasyonları incelendi. Sonuçlara göre kontrol gruplarına kıyasla 100 nM'a kadar fosforilasyon artışı, 1000 nM'da ise 10 ve 100 nM'a göre kısmen fosforilasyon azalışı gözlemlendi. Bu sonuçtan yola çıkarak Jak2'yi en iyi aktive eden Ang II konsantrasyon değeri 100 nM olarak bulundu (Şekil 4.2.1).



Şekil 4.2.1.: VDKH'lerinde Ang II'nin farklı konsantrasyonlarının Jak2 aktivasyonu üzerine etkisi: A) Jak2 aktivasyonuna ait western blot sonuçlarını B) Jak2 fosforilasyondaki göreceli artışları göstermektedir. VDKH kültürleri Ang II'nin farklı konsantrasyonlarında (1, 10, 100, 1000 nM) 5 dakika inkübe edildi ve Jak2 aktivasyonları incelendi. Jak2'yi en iyi aktive eden Ang II konsantrasyonun 100 nM olduğu saptandı. (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir.)

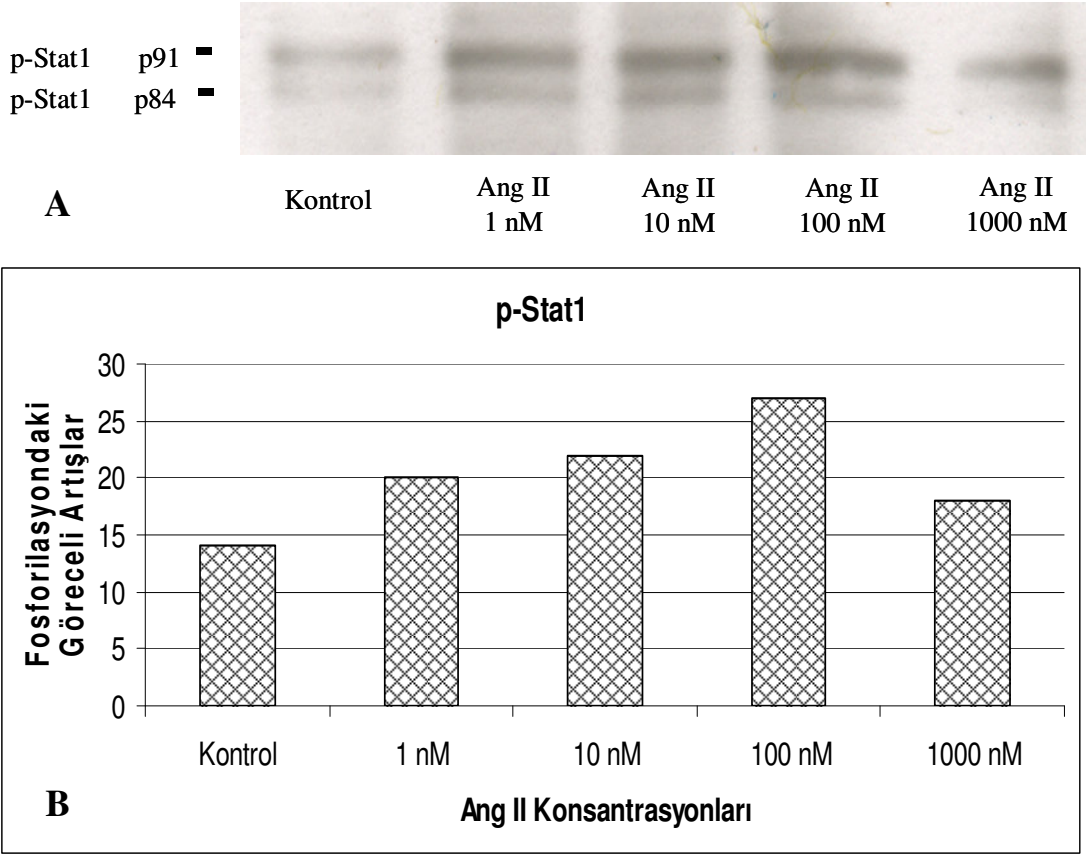
Ang II'nin VDKH kültürlerinde Jak2'yi 100 nM konsantrasyonda maksimum aktive ettiği belirlendikten sonra bu konsantrasyonda hücre kültürleri 1, 5, 10 ve 30 dakika olmak üzere farklı sürelerde aktive edildi. Hücrelerin Ang II uyarımlı Jak2 aktivasyon süresini belirlemek için 100 nM Ang II ile farklı sürelerde inkübe edildi. (Şekil 4.2.2). Kontrol grubunda bazal seviyede aktivasyon olurken 1. dakikadan itibaren artarak başlayan 5. dakikada maksimum olan ve 30. dakikada azalan bir aktivasyon seyri izlendi (Şekil 4.2.2). Sonuçlarımız 100 nM Ang II'nin 5. dakikasında Jak2 aktivasyonun maksimum olduğunu gösterdi.



Şekil 4.2.2.: VDKH kültürlerinde Ang II'nin Jak2 üzerine farklı sürelerde aktivasyonları. A) Jak2 aktivasyonuna ait western blot sonuçlarını **B)** Jak2 fosforilasyondaki göreceli artışları göstermektedir. Hücreler 100 nM Ang II ile farklı sürelerde (1, 5, 10 ve 30 dakika) stimülasyon sonrası hazırlanan hücre lizatlarından Jak2 fosforilasyonları incelendi. Kontrol grubunda bazal seviyede aktivasyon görüldü. Jak2 aktivitesinde 1. dakikadan itibaren artarak başlayan, 5. dakikada maksimum olan ve 30. dakikada azalan bir seyir izlendi. (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir.)

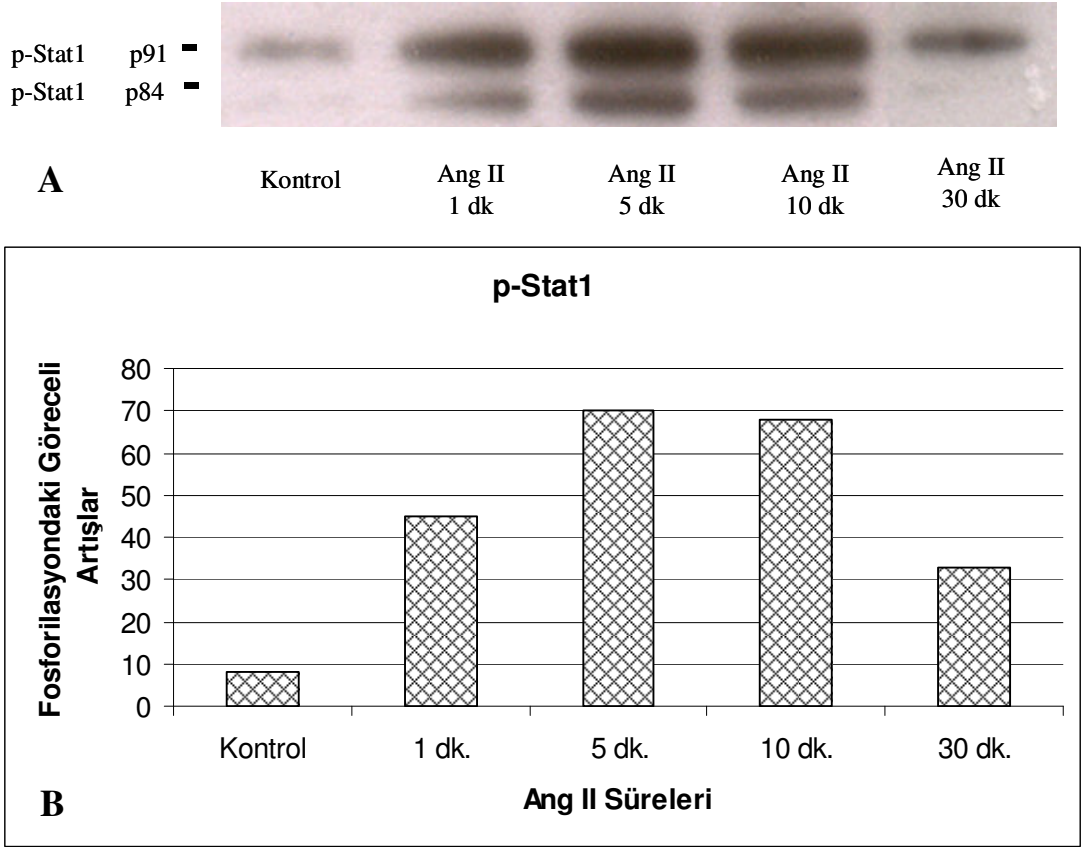
4.2.2. VDKH'lerinde Ang II'nin Stat1 Fosforilasyonu Üzerine Doz ve Zaman ve Bağımlı Etkileri

Ang II'nin, vasküler düz kas hücre kültürlerinde Stat1 üzerine aktive eden en iyi konsantrasyonunu belirlemek için hücre kültürleri 1, 10, 100 ve 1000 nM farklı Ang II konsantrasyonları ile 5 dk stimüle edildi. İnkübasyon sonunda hazırlanan hücre lizatlarında Stat1 aktivasyonları western blot tekniği uygulanarak incelendi. Western blot sonuçlarına göre kontrol gruplarına göre 100 nM'a kadar fosforilasyon artışı saptandı. 1000 nM'da ise kısmen fosforilasyon azalışı gözlemlendi. Stat1'i en iyi aktive eden Ang II konsantrasyonu 100 nM olarak bulundu (Şekil 4.2.3).



Şekil 4.2.3.: VDKH'lerinde Ang II'nin farklı konsantrasyonlarının Stat1 aktivasyonu üzerine etkisi: A) Stat1 aktivasyonuna ait western blot sonuçlarını B) Stat1 fosforilasyondaki göreceli artışları göstermektedir VDKH'leri 1, 10, 100, 1000 nM Ang II konsantrasyonlarıyla uyarıldı. Uyarım sonrası Stat1 fosforilasyonları western blot tekniği ile incelendi. Stat1'i en iyi aktive eden Ang II konsantrasyonunun 100 nM olduğu görüldü (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir.)

Ang II'nin VDKH'lerinde Janus kinazların alt iletim yolu olan Stat1'i 100 nM konsantrasyonda maksimum aktive ettiği belirlendi. Hücre kültürleri 100 nM Ang II ile 1, 5, 10 ve 30 dakikalarda sürelerde aktive edildi. Aktivasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve western blot tekniği uygulanarak Stat1 aktivasyonları incelendi. Yine Jak2 aktivasyonuna benzer şekilde kontrol grubunda bazal seviyede aktivasyon görülürken 1. dakikada aktivasyon artışı saptandı. 5. dakikada aktivasyon maksimum seviyeye çıktıktan sonra 30. dakikada düşüş görüldü. (Şekil 4.2.4). Western blot sonuçlarımız üst iletim yolu olan Jak2 fosforilasyonuna benzer şekilde 100 nM Ang II'nin 5. dakikasında STAT1 aktivasyonunun maksimum olduğu saptandı.



Şekil 4.2.4.: VDKH kültürlerinde Ang II'nin STAT1 üzerine farklı sürelerde aktivasyonları. **A)** Stat1 aktivasyonuna ait western blot sonuçlarını **B)** Stat1 fosforilasyondaki göreceli artışları göstermektedir. Hücreler 100 nM Ang II ile yukarıdaki sürelerde inkübe edildi ve STAT1 fosforilasyonları incelendi. VDKH kültürlerinde 100 nM Ang II'nin 5. dakikada STAT1'i maksimum fosforillediği saptandı. (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir.)

Bu aşamadan sonraki bulgularda Jak2-STAT1 fosforilasyonu için Ang II'nin 100 nM konsantrasyonu ve 5 dakikadaki süresi kullanılmıştır.

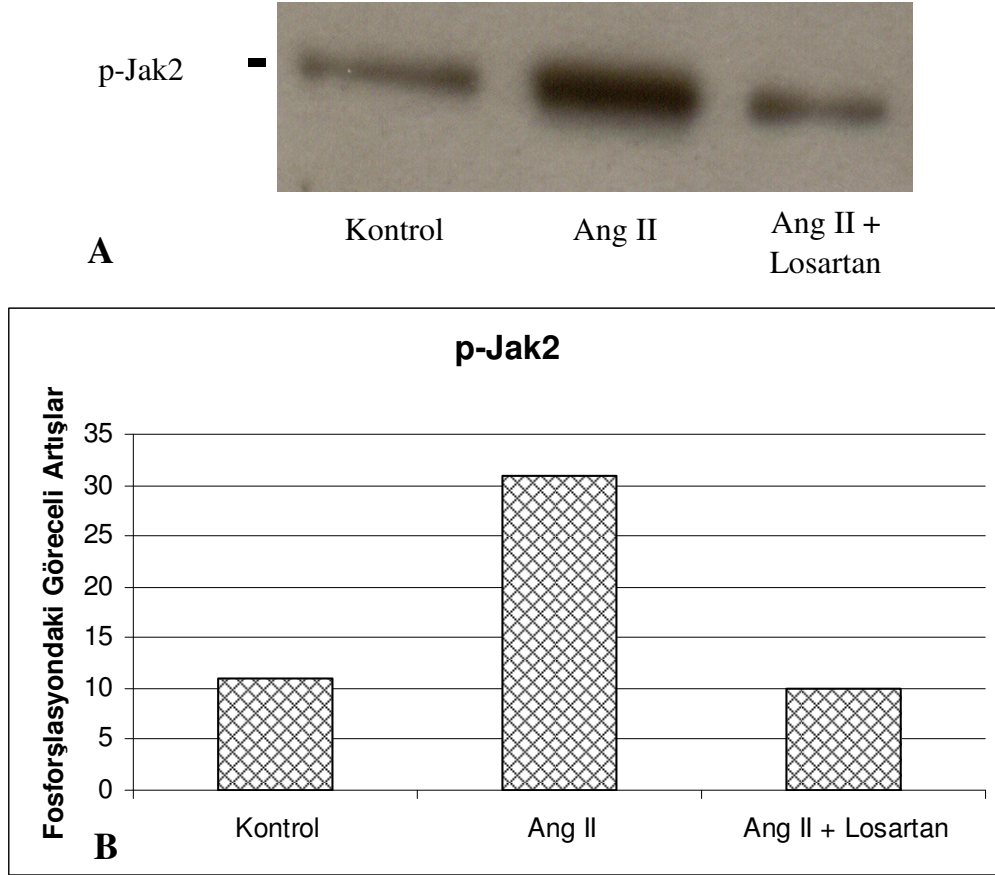
4.2.3. VDK Hücrelerinde Ang II'nin AT1 Reseptörü Üzerinden Jak2 Fosforilasyonu

Ang II'nin Jak2'yi fosforile eden sinyallerinin AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştiği göstermek için AT1 inhibitörü olan losartan kullanılarak Jak2 fosforilasyonuna bakıldı (Şekil 4.2.5).

Birinci band hiçbir uyarım olmadan kontrol olarak kullanılan VDKH'lerini göstermektedir.

İkinci band da VDKH kültürleri 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarım sonrası Jak2 aktivasyonunu göstermektedir.

Üçüncü band da VDKH kültürlerine 10^{-5} M, 10 dakika losartan eklendi ve hücreler Ang II ile 5 dakika aktive edildi. Hücrelerde Ang II uyarımı olduğu halde AT1 reseptörü inhibe olduğu için Jak2 fosforilasyonunun kontrol seviyesinde kaldığı saptandı.

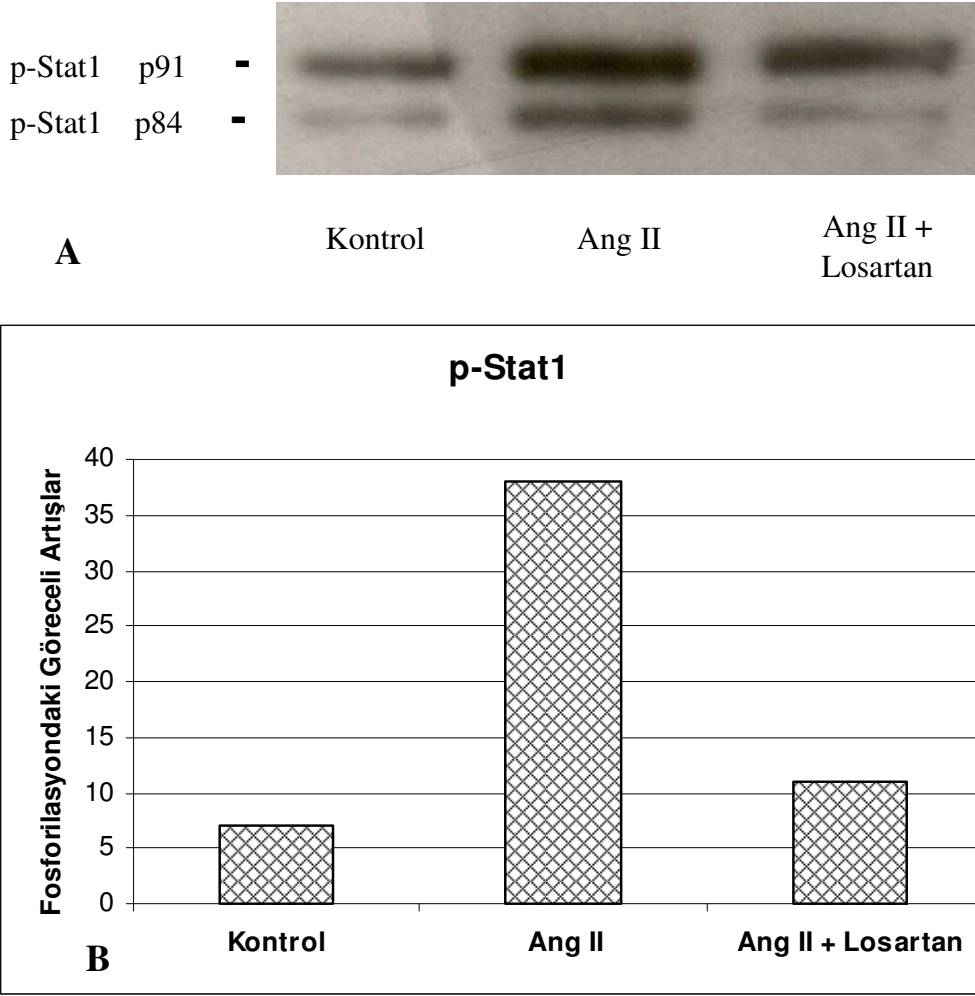


Şekil 4.2.5. : VDKH kültürlerinde Ang II'nin Jak2 fosforilasyonunda AT1 reseptörünün rolü.

A) Jak2 aktivasyonuna ait western blot sonuçlarını B) Jak2 fosforilasyonundaki göreceli artışları göstermektedir. 1. band hiçbir aktivasyon ve inhibisyonun olmadığı alan kontrol hücreleri, 2. band 100 nM Ang II ile uyarılan hücreleri ve 3. band da 10^{-5} M losartan ile inkübe edildikten sonra 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarılan hücrelerin western sonuçlarını göstermektedir (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir).

4.2.4. VDKH'lerinde Ang II'nin AT1 Reseptörü Üzerinden Stat1 Fosforilasyonu

Ang II uyarımlı Stat1'i fosforile eden sinyallerinin AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştiği gösterildi (Şekil 4.2.6.). Birinci band hiçbir uyarım olmadan kontrol olarak kullanılan VDKH'lerinin, ikinci band VDKH kültürleri 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarılan hücrelerin, üçüncü band da 10^{-5} M, 10 dakika losartan eklendikten sonra Ang II ile 5 dakika uyarılan hücrelerin western sonuçlarını göstermektedir. Üçüncü band da hücreler Ang II uyarımı olduğu halde AT1 reseptörü inhibe olduğu için Stat1 fosforilasyonunun kontrol seviyesinde kaldığı gösterildi.



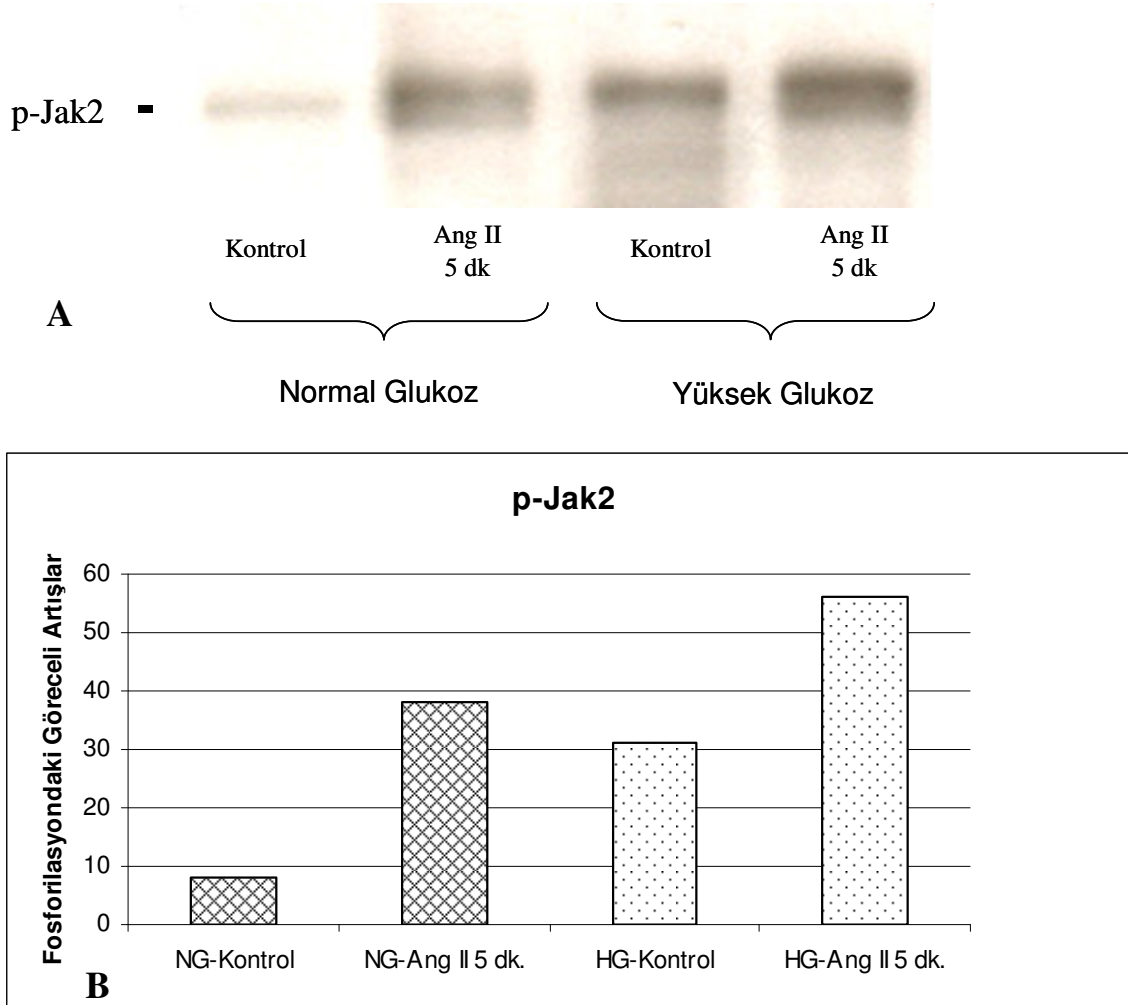
Şekil 4.2.6.: VDKH kültürlerinde Ang II'nin Stat1 fosforilasyonunda AT1 reseptörünün rolü.

A) Stat1 aktivasyonuna ait western blot sonuçlarını B) Stat1 fosforilasyondaki göreceli artışları 1. band VDKH kültürlerinde hiçbir aktivasyon ve inhibisyonun olmadığı alan kontrol olarak kabul edildi. 2. band da hücreler 100 nM Ang II ile uyarıldı ve Stat1 fosforilasyonu izlendi. 3. band da hücreler 10^{-5} M losartan ile inkübe edildi ve ardından 100 nM Ang II ile 5 dakika uyarıldı. (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir.)

4.2.5. VDKH'lerinde Yüksek Glukozun Ang II uyarımlı Jak2 Fosforilasyonuna Etkisi

Yüksek glukozun Ang II uyarımlı Jak2 fosforilasyonuna etkisini araştırmak için %80-90 konfluent olmuş hücreler 48 saat serumdan yoksun normal glukoz (5.5 mM) ve yüksek glukoz (25 mM) medyum içinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 100 nM Ang II ile 5 dakika aktive edildi. Aktivasyon sonunda hücre lizatlarının Jak2 aktivasyonları incelendi. Ang II'ye cevaben yüksek glukozda inkübe edilen hücrelerin Jak2 aktivasyonu, normal glukozda inkübe edilenlere göre artmış olarak bulundu. Ek olarak yüksek glukozda inkübe edilen hücrelerin bazal

seviyelerindeki Jak2 aktivasyonu normal glukozda inkübe edilen kontrol grubundaki hücrelere göre artış gözlenmiştir (Şekil 4.2.7).

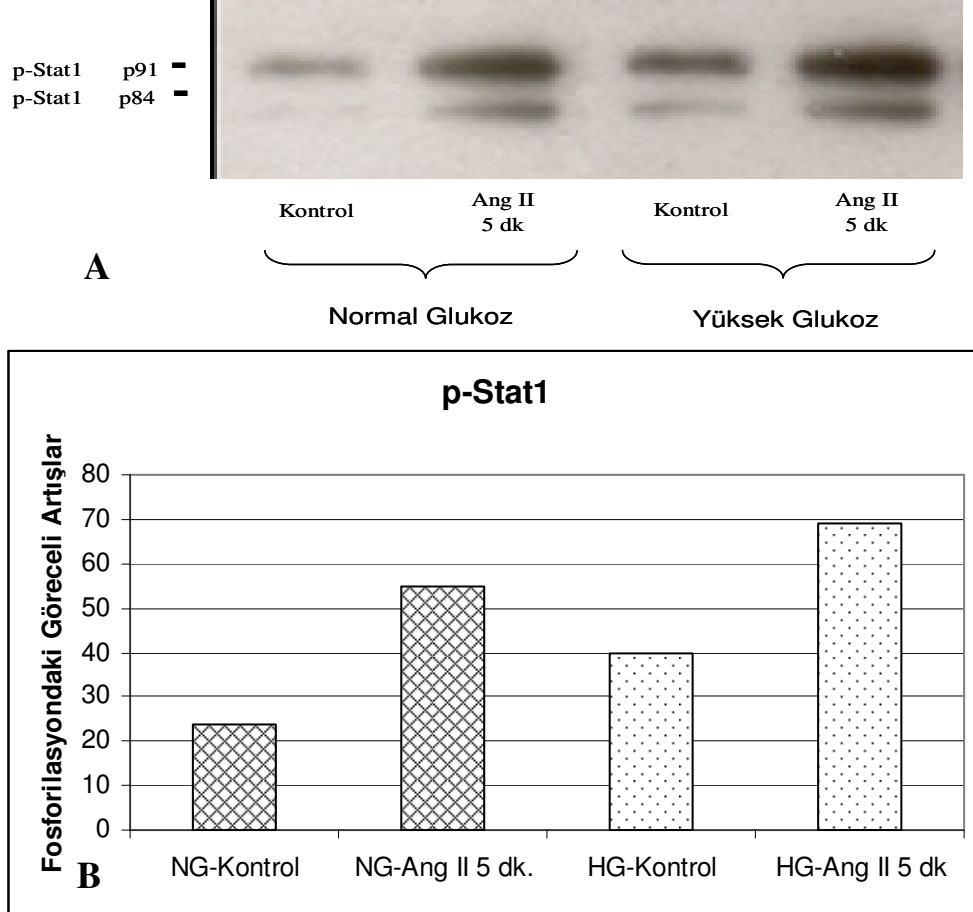


Şekil 4.2.7.: VDKH'lerinde Yüksek Glukozun Ang II uyarımlı Jak2 Fosforilasyonuna Etkisi. A) Jak2 aktivasyonuna ait western blot sonuçlarını **B)** Jak2 fosforilasyondaki göreceli artışları göstermektedir. (NG:Normoglisemik, HG:Hiperglisemik ortam) İlk 2 band serumdan yoksun normal glukozlu, son 2 band ise yüksek glukozlu serumdan yoksun medyum ile 48 saat inkübe edilen hücrelerin Ang II ile uyarım sonrası Jak2'nin aktivasyon sonuçlarını göstermektedir (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir).

4.2.6. VDKH'lerinde Yüksek Glukozun Ang II uyarımlı Stat1 Fosforilasyonuna Etkisi:

Yüksek glukozun Ang II uyarımlı Stat1 fosforilasyonuna etkisini araştırmak için hücreler 48 saat normal glukoz (5.5 mM) ve yüksek glukoz (25 mM) serumdan yoksun medyum içinde inkübe edildi. İnkübasyonu takiben hücreler Ang II ile 5 dakika uyarıldı ve hücre lizatları hazırlandı. Lizatlardan elde edilen western sonuçlarına göre yüksek glukozda inkübe edilen hücrelerin Ang II'ye cevaben Stat1

aktivasyonu, normal glukozda inkübe edilenlere göre artmış olarak bulunmuştur. Ayrıca yüksek glukozda inkübe edilen hücrelerin bazal seviyelerindeki Stat1 aktivasyonu normal glukozda inkübe edilen kontrol grubundaki hücrelere göre de artış gözlenmiştir (Şekil 4.2.8)



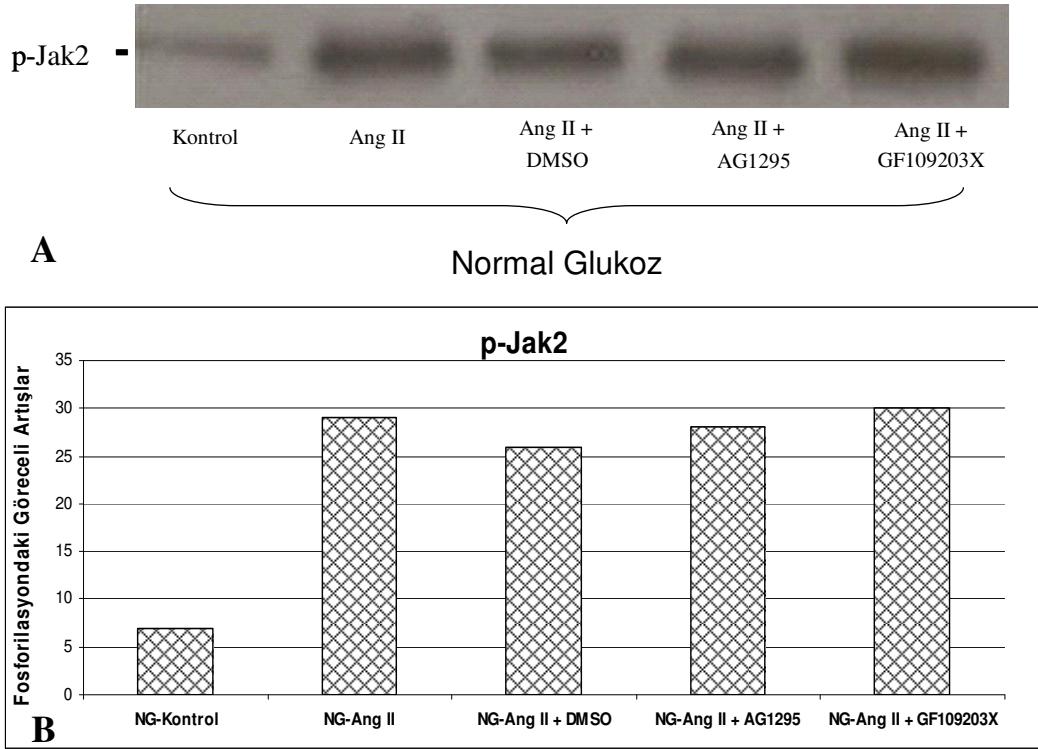
Şekil 4.2.8.: VDKH'lerinde Yüksek Glukozun Ang II uyarımlı Stat1 Fosforilasyonuna Etkisi: A) Jak2 aktivasyonuna ait western blot sonuçlarını B) Jak2 fosforilasyondaki göreceli artışları göstermektedir. (NG:Normoglisemik, HG:Hiperglisemik ortam) İlk 2 band normal glukozlu, son 2 band ise yüksek glukozlu serumdan yoksun inkübe edilen hücreleri göstermektedir. 48 saat inkübasyon sonunda hücreler 100 nM Ang II ile 5 dakika aktive edildi. Aktivasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve western blot ile Stat1 aktivasyonları incelendi (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir).

4.2.7. VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Jak2 Fosforilasyonunda PKC ve PDGF-β Reseptörünün Rolü

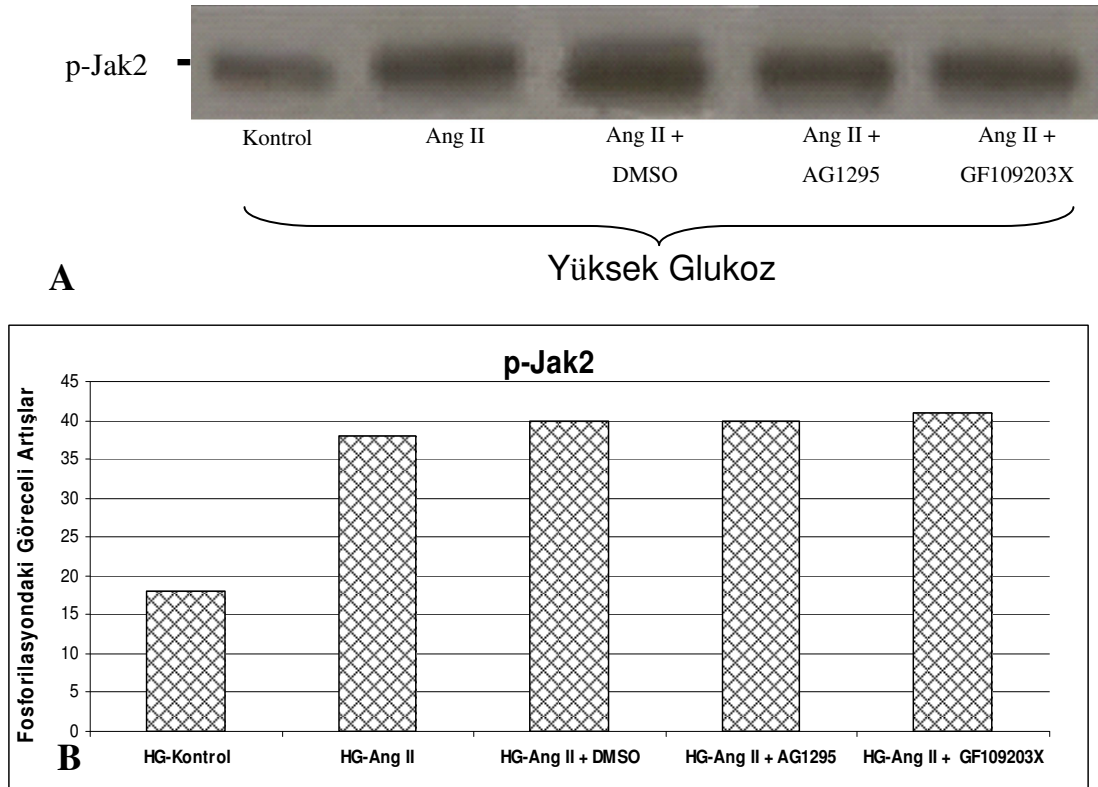
Ang II uyarımlı Jak2 fosforilasyonunda PKC ve PDGF-β reseptörünün rolünü araştırmak için spesifik inhibitörleri GF109203X (PKC inhibitörü) ve AG1295 (PDGF-β reseptör inhibitörü) kullanıldı. Hücreler normoglisemik ve hiperglisemik medyum içinde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 100 nM Ang II ile 5 dakika stimüle edildi. Şekil 4.2.9. ve 4.2.10'da gösterildiği sırada; kontrol grupları

herhangi bir aktivator veya inhibitör kullanılmadığı bazal aktivitesini göstermektedir. Ang II gruplarında hücreler sadece 100 nM Ang II ile 5 dakika aktive edildi. Ang II + DMSO gruplarında hücreler GF109203X'in ve AG1295'in içinde çözündüğü DMSO ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile 5 dakika uyarıldı. Ang + AG1295 gruplarında hücreler 10 µM AG1295 ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile 5 dakika uyarıldı.. Ang II + GF109203X gruplarında ise hücreler 5 µM GF109203X ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile 5 dakika uyarıldı.

Aktivasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve western blot tekniği uygulanarak Jak2 aktivasyonları incelendi. Yüksek glukoz ve düşük glukozda inkübe edilen hücrelerin Ang II uyarımlı Jak2 aktivasyonunda, PKC inhibitörü GF109203X ve PDGF-β reseptörü inhibitörü AG1295 sonrası herhangi bir inhibisyon görülmedi (Şekil 4.2.9., Şekil 4.2.10).



Şekil 4.2.9: VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Jak2 Fosforilasyonunda PKC ve PDGF-β Reseptörünün Rolü: A) Jak2 aktivasyonuna ait western blot sonuçlarını B) Jak2 fosforilasyonundaki göreceli artışları göstermektedir. Hücreler serumdan yoksun normal glukozlu (NG) medyumda 48 saat inkübe edildikten sonra Ang II ile 5 dakika uyarıldı. Yukarıda şekilde gösterildiği gibi gruplar sırasıyla kontrol hücreleri, 100 nM Ang II ile uyarılan hücreleri, DMSO ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreleri, AG1295 ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreleri, GF109203X ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreleri göstermektedir. (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir).

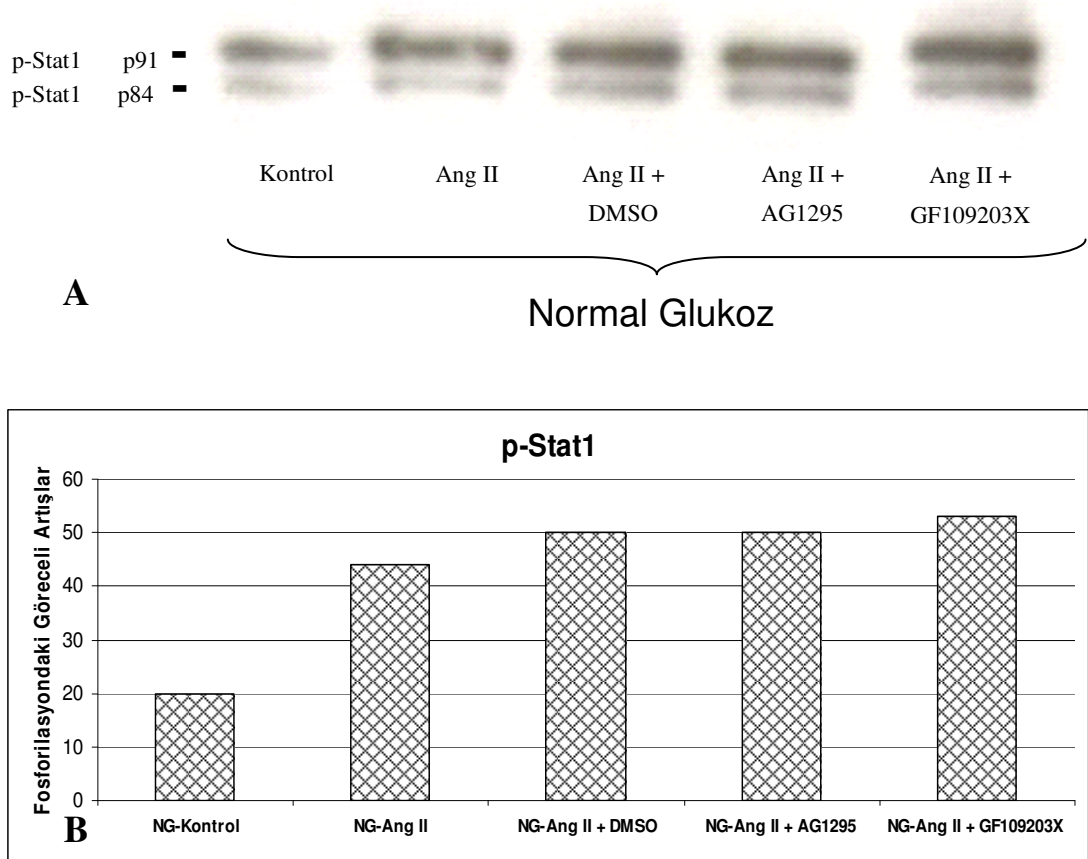


Şekil 4.2.10. : VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Jak2 Fosforilasyonunda PKC ve PDGF- β Reseptörünün Rolü: A) Jak2 aktivasyonuna ait western blot sonuçlarını B) Jak2 fosforilasyondaki göreceli artışları göstermektedir. Hücreler serumdan yoksun yüksek glukozlu (HG) medyunda 48 saat inkübe edildikten sonra Ang II ile 5 dakika uyarıldı. Yukarıda şekilde gösterildiği gibi gruplar sırasıyla kontrol hücreleri, 100 nM Ang II ile uyarılan hücreleri, DMSO ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreleri, AG1295 ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreleri, GF109203X ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreleri göstermektedir. (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir).

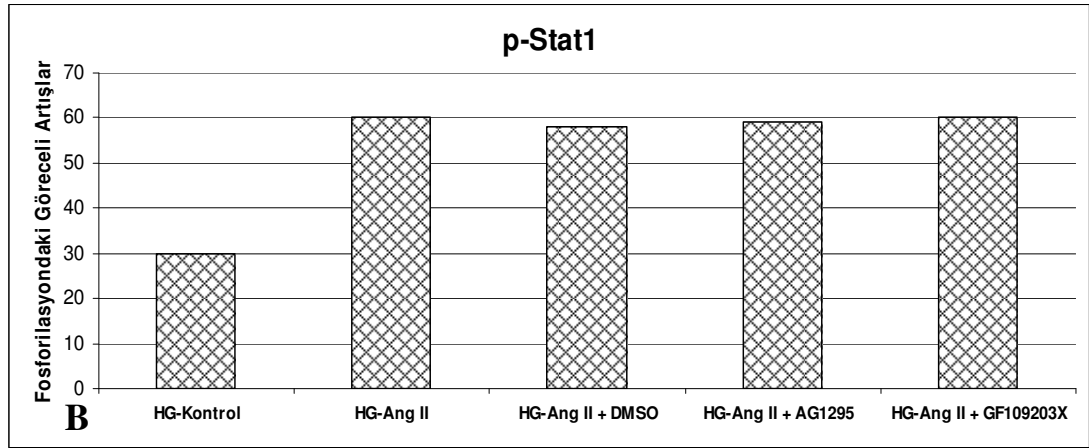
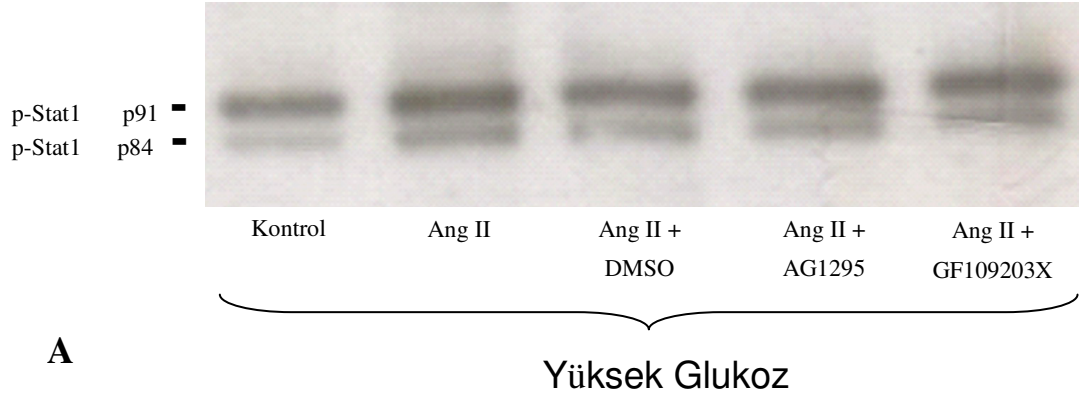
4.2.8. VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Stat1 Fosforilasyonunda PKC ve PDGF- β Reseptörünün Rolü

Ang II uyarımlı Stat1 fosforilasyonunda PKC ve PDGF- β reseptörünün rolünü araştırmak için spesifik inhibitörleri GF109203X ve AG1295 kullanıldı. Hücreler normoglisemik ve hiperglisemik medyum içinde 48 saat inkübe edildi ve Ang II ile 5 dakika stimüle edildi. Şekil 4.2.11. ve 4.2.12.'deki gibi; kontrol hücreler, sadece Ang II ile aktive edilen hücreler, 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreler, 10 μ M AG1295 ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreler, 5 μ M GF109203X ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreler gösterilmektedir.

Aktivasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve western blot tekniği uygulanarak Stat1 aktivasyonları incelendi. Yüksek glukoz ve düşük glukozda inkübe edilen hücrelerin Ang II uyarımlı Jak2 aktivasyonunda, PKC inhibitörü GF109203X ve PDGF- β reseptörü inhibitörü AG1295 sonrası herhangi bir inhibisyon görülmedi (Şekil 4.2.11., Şekil 4.2.12.).



Şekil 4.2.11.: VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Stat1 Fosforilasyonunda PKC ve PDGF- β Reseptörünün Rolü: A) Stat1 aktivasyonuna ait western blot sonuçlarını B) Stat1 fosforilasyonundaki göreceli artışları göstermektedir. Hücreler serumdan yoksun normal glukozlu (NG) medyumda 48 saat inkübe edildikten sonra Ang II ile 5 dakika uyarıldı. Yukarıda şekilde gösterildiği gibi gruplar sırasıyla kontrol hücreleri, 100 nM Ang II ile uyarılan hücreleri, DMSO ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreleri, AG1295 ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreleri, GF109203X ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreleri göstermektedir. (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir).



Şekil 4.2.12: VDKH'lerinde Ang II uyarımlı Stat1 Fosforilasyonunda PKC ve PDGF- β Reseptörünün Rolü: A) Stat1 aktivasyonuna ait western blot sonuçlarını B) Stat1 fosforilasyondaki göreceli artışları göstermektedir. Hücreler serumdan yoksun yüksek glukozlu (HG) medyumda 48 saat inkübe edildikten sonra Ang II ile 5 dakika uyarıldı. Yukarıda şekilde gösterildiği gibi gruplar sırasıyla kontrol hücreleri, 100 nM Ang II ile uyarılan hücreleri, DMSO ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreleri, AG1295 ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreleri, GF109203X ile 30 dakika inkübe edildikten sonra Ang II ile uyarılan hücreleri göstermektedir. (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir).

TARTIŞMA

Ang II, vasküler düz kas hücreleri üzerinde birçok etkileri olan, damar duvarın yapısal ve fonksiyonel bütünlüğün kontrolünde rol alan ve vasküler hastalıkların altında yatan patolojik mekanizmalar ile damar basıncının fizyolojik düzenlenmesinde önemli görevleri olan bir oktapeptittir (5). Ang II sinyal iletim yollarının incelenmesi vasküler hastalıkların altında yatan mekanizmaların anlaşılması ve yeni tedavi metotların geliştirilmesi açısından önemlidir.

Bu çalışmada Ang II uyarımlı Jak2-STAT1 aktivasyonunda yüksek glukozun etkisine bakıldı. Ayrıca Ang II uyarımlı Jak2-STAT1 aktivasyonunda PDGF- β reseptör ve PKC enzimlerinin rolü de incelenmiştir. Bunun için rat aortik kökenli düz kas hücreleri izole edilmiş ve primer kültür ortamına aktarılmıştır.

İzolasyonu ve primer kültürü yapılan hücrelerin düz kas hücresi olduğunu gösterebilmek için immünohistokimya tekniği uygulandı. Hücrelerin vasküler düz kas hücresi içeriğini gösterebilmek için düz kas aktin boyamaları yapılmıştır. İzole edilen hücrelerin içerisinde endotel hücresi olup olmadığını anlamak amacıyla von willebrand faktör boyamaları yapılmış ve hücre içeriğinde endotel hücresi olmadığı saptanmıştır. Boyamaların primer antikora spesifik olduğunu göstermek amacıyla da izotip boyamaları yapılmış ve sekonder antikordan kaynaklanan istenmeyen boyamaların olmadığı gösterilmiştir.

Ang II'nin, VDKH kültürlerinde Jak2 ve STAT1'i aktive eden en iyi konsantrasyonunu bulabilmek amacıyla hücre kültürleri Ang II'nin 1, 10, 100 ve 1000 nM farklı konsantrasyonları ile 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kontrol gruplarına göre hem Jak2 hem de STAT1 fosforilasyonunda 100 nM'a kadar artış saptanmıştır. Uygulanan konsantrasyonlardaki fosforilasyon artışlarından en yüksek düzeyde aktive eden değer 100 nM olarak bulunmuştur (Şekil 4.2.1.ve Şekil 4.2.3.).

Ang II'nin VDKH kültürlerinde Jak2 ve STAT1 yolunu maksimum aktive ettiği 100 nM konsantrasyonda hücre kültürleri 1, 5, 10, 30 dakika sürelerde stimüle edildi. Ang II'nin Jak2 ve STAT1'in süre bağımlı aktivasyonu Amiri ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada gösterilmiştir (18). Hem Jak2 hem de STAT1'in 100 nM Ang II'ye cevaben 1.dakikada başlayan, 5.dakikada maksimum olan ve 30. dakikalarda ise etkisinin azaldığı bir aktivasyon seyri izlenmiştir (Şekil 4.2.2., Şekil 4.2.4.). Sonuçlar 100 nM Ang II'nin Jak2-STAT1 yolağını 5. dakikada maksimum aktive ettiğini göstermiştir. Sonuçlarımız literatürdeki çalışmadaki sonuçlar ile uyumludur (18).

Bu aşamadan sonraki çalışmalarda Ang II'nin 100 nM konsantrasyonunda ve 5 dakika inkübasyon süresinde deneyler yapılmıştır.

Ang II, VDKH'lerinde sentez edilen AT1 reseptörü üzerinden birçok fizyolojik etkilerine aracılık ettiği ve Ang II uyarımlı vasküler fonksiyonların kontrolünde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ang II'nin, VDKH kültürlerinde Jak2 ve STAT1 yolunun AT1 reseptörü üzerinden aktive ettiği göstermek için spesifik AT1 reseptör inhibitörü losartan kullanılmıştır. Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT1 fosforilasyonu, 10^{-5} M losartanın 10 dakika inkübasyonunun sonrasında kontrol düzeyine inmiştir (Şekil 4.2.5. ve Şekil 4.2.6.). Elde edilen sonuçlar hem Jak2 hem de STAT1'i aktive eden Ang II sinyallerinin AT1 reseptörü üzerinden olduğunu ve losartanın bu konsantrasyon ve süresinin AT1 reseptörünü bloke etmekte yeterli olduğunu göstermiştir. Ayrıca Ang II'nin Jak2 tirozin fosforilasyonu, AT1 reseptörü ve Jak2'nin kompleks oluşumu ile beraber olduğu gösterilmiştir (107). Bu kompleks, Jak'ın AT1 reseptörünün C-terminalin hücre içi birimi 4 YIPP motifi ile ilişkiye girmesiyle oluştuğu bir başka çalışmada gösterilmiştir (108). Dahası Jak2 inhibitörü AG490 veya STAT1 veya STAT3 karşı bloking antikorların elektroporasyonu aracılığı ile JAK2 tirozin fosforilasyonunun inhibisyonu, Ang II uyarımlı VDKH proliferasyonu ve DNA sentezini inhibe etmektedir (9). Bu sonuçlar, özellikle AT1 reseptörü gibi G-protein-bağlı reseptörlerin mitojenik sitokin ve büyüme faktörlerinin kullanmış olduğu tirozin fosforilasyon yolları üzerinden benzer mekanizmayla etki ettiğini göstermektedir (109).

Diyabetes mellitus ve aterosklerozis gibi kardiyovasküler komplikasyon riski yüksek hastalıklarda Jak-STAT sinyalizasyon yolağının hiperaktif olduğu bulunmuştur (110). Örneğin, Amiri ve arkadaşlarının 1999'da rat aortik düz kas hücrelerinde yaptıkları çalışmada, hipergliseminin Ang II ile indüklenmiş Jak/STAT sinyalizasyonu üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada yüksek glukoz (25 mM) konsantrasyonunda 24 saat kültüre edilen VDKH'lerin daha hızlı proliferere olduğu ve kontrol grubu ile (normal glukoz, 5.5 mM) kıyaslandığında JAK2 ve STAT proteinlerinin yüksek seviyelerde (iki katdan fazla) aktive oldukları gösterilmiştir (18). Benzer şekilde kendi laboratuvar şartlarımızda yüksek glukoz ile rat VDKH'leri inkübe edildi ve Jak2-STAT1 fosforilasyonuna bakıldı. Amiri ve arkadaşları 24 saat inkübasyon sonrası Jak-STAT fosforilasyonunda iki kattan fazla artış bulmuşlardır (18). Ancak biz, 24 saatlik inkübasyonlar sonrası hücrelerde, Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT1 fosforilasyonunda yüksek glukoz aracılı bir fosforilasyon artışı gözlemedik. Bununla beraber 48 saat inkübasyon sonrasında ise yüksek glukoz aracılı Ang II uyarımlı Jak2-STAT1 fosforilasyonunda bir artış gözlemedik. Hem Jak2 hem de STAT1 fosforilasyonundaki bu artış Amiri ve arkadaşlarının buldukları gibi şiddetli bir artış şeklinde değil normoglisemik koşullardaki hücrelere göre %30-40 daha fazla gerçekleşmiştir (Şekil 4.2.7.ve 4.2.8.). Yine aynı çalışmada hiperglisemi tek başına bazal Jak ve STAT fosforilasyonunu az bir oranda artırmaktadır. Bizim sonuçlarımızda da Ang II uyarımı olmadan yüksek glukoz ile muamele edilen hücrelerde Jak2 ve STAT1'in bazal fosforilasyonunda artış görülmüştür (Şekil 4.2.7.ve 4.2.8.). Hiperglisemik koşullardaki bazal seviyelerdeki bu artış, normoglisemik koşullardaki kontrol gruplarına göre Jak2 için 2 katdan fazla, STAT1 için ise 2 katına yakın bir fosforilasyon artışı tespit edilmiştir. Bununla beraber, başka bir çalışmada yüksek glukozun glomerüler mezangial hücrelerde (GMC, Glomerular Mezangial Cells) JAK/STAT yolağı aktivasyonu ile büyüme ve matriks depolanmasında artışa neden olduğu gösterilmiştir (111). Bu gibi veriler

Jak/STAT yolağının diyabetes mellitusda gözlenen artmış VDKH ve GMC büyümesinin altında yatan olası mekanizmalardan birisi olduğunu düşündürmektedir. Ancak, VDKH ve GMC’de, hem yüksek glukoz hem de vazoaktif peptid aracılı Jak-STAT yolağının aktivasyonunun moleküler mekanizması aydınlatılmayı beklemektedir.

1992’de Williams ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, VDKH’lerin 20 mM glukoz konsantrasyonunda Ang II’nin reseptörüne bağlanmada down regülasyona uğradığı gözlenmiştir (19). Dolayısıyla bu çalışmaya göre beklenmesi gereken yüksek glukozun Ang II’nin indüklediği sinyalizasyon cevaplarını azaltmasıdır. Yüksek glukoz varlığında Ang II, reseptörüne bağlanmada azalma olsa bile, Ang II sinyalizasyonundaki artışlar sadece Jak/STAT yolu için değil, bazı non-reseptör tirozin kinazlar (ERK 1/2 ve p38 MAPK) içinde gösterilmiştir (10).

Bazı çalışmalarda VDKH’lerinde hipergliseminin artan PDGF- β reseptör ekspresyonu ile ilişkili olduğunu ve PDGF-BB aracılı vasküler düz kas hücrelerinin göçünü, büyümesini ve DNA sentezini artırdığını göstermişlerdir (20, 22). Ek olarak AT1 reseptör aktivasyona cevaben gelişen mitojenik cevapların RTK aktivasyonu ile gelişebileceğini desteklemektedir. Ang II doğrudan RTK’lara bağlanmamasına rağmen aktive edebilmektedir. Bu transaktivasyon yolları EGFR, PDGFR ve IGFR’leri için gösterilmiştir (39). Vignais ve arkadaşlarının 1996’da çeşitli hücre dizisi kültürlerinde yaptığı çalışmalarda, PDGF reseptörlerinin aktivasyonu bir çok Jak/STAT ailesinin fosforilasyonunu aktive etmektedir (21). Biz bu çalışmamızda özellikle yüksek glukozda inkübe edilen VDKH’lerin Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT1 yolunda PDGF- β reseptör transaktivasyonun rolünü araştırdık. Bu bağlamda Ang II uyarımlı Jak-STAT yolağında hem normal glukoz hem de yüksek glukoz maruz bırakılan hücrelerde PDGF- β reseptörünün rolünü araştırmak amaçlı spesifik inhibitörü AG1295 kullanılmıştır. Ang II ile uyarılmadan önce PDGF- β reseptör inhibitörü 10 μ M AG1295 ile 30 dakika inkübe edildi. Deneyde kullanılan AG1295, DMSO içinde çözüldüğünden, çözücünün düz kas hücreleri üzerinde herhangi bir inhibitör veya aktivatör etkisinin olup olmadığını saptamak amacıyla inhibitörün ortamda kaldığı sürede (30 dakika) ve çözücü miktarında hücreler DMSO ile inkübe edildi. (Sonuçta hücrelerin Ang II uyarımlı Jak2-STAT1 fosforilasyonuna cevap verdiği saptanmış ve DMSO’nun ortama olan etkisi elimine edilmiştir.) Hem normal glukoz, hem de yüksek glukoz maruz bırakılan hücreler, PDGF- β reseptör inhibitörü AG1295 sonrası Ang II ile uyarılmıştır. Normal ve yüksek glukoz maruz bırakılan hücrelerde PDGF- β reseptör inhibitörü AG1295 sonrası Ang II uyarımlı Jak2-STAT1 fosforilasyonunda herhangi bir inhibisyon görülmemiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, VDKH’lerinde yüksek glukoz tarafından artan Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT 1 yolağının PDGF reseptörleri üzerinden sağlanmadığını göstermiştir (Şekil 4.2.10.ve 4.2.12.).

Diyabetik hayvanların birçok dokularında artan PKC aktivitesi ve DAG seviyeleri gösterilmiştir (112). Aortik ve vasküler hücrelerde diyabetik ratlarda hiperglisemiye cevap olarak PKC- β II ve PKC- ζ izoformlarının aktive oldukları gösterilmiştir. Tavşan aortik VDKH’inde 27,5 mM glukoz ile 5 gün inkübasyon sonrası total PKC aktivitesinde artış görülmüş ve bu artış PKC genel inhibitörü ile baskılanmıştır (23). Bu bağlamda, özellikle yüksek glukoz aracılı Ang II uyarımlı

Jak2 ve STAT1 yolağında hem normal glukoz hem de yüksek glukoz maruz bırakılan hücrelerde PKC'nin rolünü araştırmak amaçlı spesifik inhibitörü GF109203X kullanılmıştır. PKC inhibitörü'nün PKC izoformlarından PKC- α , - β I, - β II, - γ 'yı inhibe ettiği bilinmektedir. VDKH'ler, Ang II ile uyarılmadan önce PKC inhibitörü 5 μ M GF109203X'e 30 dakika inkübe edildi. Deneyde kullanılan GF109203X, DMSO içinde çözündüğünden, çözücünün herhangi etkisinin olup olmadığını saptamak amacıyla hücreler DMSO ile inkübe edildi. (Sonuçta hücrelerin Ang II uyarımlı Jak2-STAT1 fosforilasyonuna DMSO'nun herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.) Hem normal glukoz, hem de yüksek glukoz maruz bırakılan hücreler PKC genel inhibitörü GF109203X sonrası Ang II uyarılmıştır. Normal ve yüksek glukoz maruz bırakılan hücrelerde PKC genel inhibitörü GF109203X sonrası Ang II uyarımlı Jak2-STAT1 fosforilasyonunda herhangi bir inhibisyon görülmemiştir (Şekil 4.2.9., 4.2.10., 4.2.11. ve 4.2.12.) Sonuçlarımız VDKH'lerinde yüksek glukoz tarafından artan Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT1 yolağının PKC üzerinden sağlanmadığını göstermiştir.

Son çalışmalarda yüksek glukoz aracılı JAK2 aktivasyonuna aracılık ettiği mekanizmalardan birinin reaktif oksijen türlerinin (ROS) olduğu düşünülmektedir. Örneğin, PDGF, ROS'u ikincil mesajcı olarak JAK/STAT yolağının aktivasyonunu regüle etmek suretiyle rat fibroblastlarında büyümeye yol açmaktadır (113). Ayrıca, araştırmacılar JAK ve STAT proteinlerinin Ang II tarafından aktivasyonunun, NAD(P)H oksidaz inhibitörü difenil iyodonyum ve NAD(P)H oksidazı nötralize eden antikor anti-p47 phox antikorunun elektroporasyonu ile anlamlı bir şekilde inhibe edildiğini göstermişlerdir. Bu veriler NAD(P)H oksidaz aracılı ROS üretiminin Ang II'ye cevap olarak JAK2 ve STAT'ları aktivasyonuna katkı sağladığını düşündürmektedir (114). Tüm bu veriler JAK/STAT yolağı hücre içi ROS'a duyarlı olabileceğini ve hem yüksek glukoz hem de Ang II, JAK2 aktivasyonunda ROS'u ikincil mesajcı olarak kullanabileceğini göstermektedir. Bu durum VDKH'lerinde NADPH oksidaz-aracılı ROS üretiminin Ang II'ye cevaben JAK2 ve STAT proteinlerinin aktivasyonuna katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (115). Yukarıda bahsedildiği gibi vasküler hücreler vasküler hasarlanmada önemli bir molekül olan ROS'u NADPH aracılığı ile üretebilir. Ancak, yüksek glukoz aracılı ROS üretimi VDKH proliferasyonuna neden olurken ROS üretimi aynı zamanda endotelial fonksiyonların bozulmasına ve hücre ölümüne neden olabilmektedir (116).

Bu çalışmamızın sonuçları göstermiştir ki, VDKH'lerinde Jak2 ve alt iletim yolu olan Stat1 fosforilasyonu Ang II' cevaben artmaktadır. Aktivedeki bu artış en iyi Ang II'nin 100 nM konsantrasyonunda ve 5. dakikasında gerçekleşmektedir. Bununla birlikte yüksek glukoz ile uzun süreli inkübe edilen hücrelerde Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT1 fosforilasyonu normal glukozdaki hücrelere göre artmış olarak bulunmuştur. Yüksek glukoz aracılı Jak2 ve STAT1 fosforilasyondaki bu artış, Ang II uyarımı olmadan bazal düzeyde de görülmüştür. Yüksek glukozun vasküler düz kas hücrelerinde Jak/STAT sinyalizasyonuna hangi yol üzerinden etkili olduğu konusunda bulgular yetersizdir. Özellikle yüksek glukozda inkübe edilen hücrelerde Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT1 sinyalizasyon yolundaki fosforilasyon artışının PDGF- β reseptör transaktivasyonundan ve PKC'den bağımsız olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Yüksek glukozun VDKH'lerinde Jak/STAT

sinyalizasyonuna hangi yol üzerinden gerçekleştiğini açıklayan daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

SONUÇLAR

- 1- Deneyleerde kullanılan vasküler düz kas hücrelerin izolasyonu ve primer kültürü yapıldı. Hücrelerin düz kas hücresi olduğu immünohistokimyasal olarak boyamaları ile gösterilmiştir.
- 2- VDKH kültürlerinde Jak2 ve STAT1 yolağı, en iyi 100 nM Ang II konsantrasyonunda aktive olduğu tespit edilmiştir.
- 3- Jak2 ve STAT1 yolunun fosforilasyonu 100 nM Ang II'ye cevaben 1.dakikada başlayan, 5.dakikada maksimum olan ve 30. dakikalarda ise etkisinin azaldığı bir aktivasyon seyri izlenmiştir.
- 4- Ang II'nin Jak2 ve STAT1'i fosforile eden sinyallerinin AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştiği spesifik inhibitörü losartan kullanılarak gösterilmiştir.
- 5- Yüksek glukozda inkübe edilen hücrelerin Ang II uyarımı olmadan bazal seviyelerindeki Jak2 ve Stat1 aktivasyonu, normal glukozda inkübe edilen kontrol grubundaki hücrelere göre artış gözlenmiştir.
- 6- Ang II'ye cevaben yüksek glukozda inkübe edilen hücrelerin Jak2 ve STAT1 aktivasyonu, normal glukozda inkübe edilenlere göre artmış olarak bulunmuştur.
- 7- Hem yüksek glukozda hem de normal glukozda inkübe edilen hücrelerde Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT1 sinyalizasyon yolundaki fosforilasyon artışının PDGF- β reseptör transaktivasyonundan bağımsız gerçekleştiği PDGF- β reseptör inhibitörü AG1295 kullanılarak gösterilmiştir.
- 8- PKC inhibitörü GF109203X ile yapılan deney sonuçlarımız, Ang II uyarımlı Jak2 ve STAT1 sinyalizasyon yolundaki fosforilasyon artışının PKC'den bağımsız gerçekleştiğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Wilson JD, Foster DF: Chapter 24, Diabetes Mellitus. pp, 1255-1333 Williams Textbook of Endocrinology, 1992.
2. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 19(39):257-67, 1996.
3. Sowers JR, Epstein M: Diabetes mellitus and associated hypertension, vascular disease, and nephropathy. An update. *Hypertension*, 26, 869–879, 1995.
4. Colwell JA: Vascular thrombosis in type II diabetes mellitus. *Diabetes*, 42: 8-11, 1993.
5. Touyz RM, Schiffrin EL: Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacol Rev*, 52(4):639-72, 2000.
6. Hollenberg MD: Tyrosine kinase pathways and the regulation of smooth muscle contractility. *Trends Pharmacol Sci*, 15:108-114, 1994.
7. Leduc I, Haddad P, Giasson E, Meloche S: Involvement of a tyrosine kinase pathway in the growth-promoting effects of angiotensin II on aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 48:582-592, 1995.
8. Powell JS, Clozel JP, Muller RKM, Kuhn H, Hefti F, Hosang M, Baumgartner HR: Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science*, 245, 186–188, 1989.
9. Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN: Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Biol. Chem*, 272, 24684–24690, 1997.
10. Natarajan R, Scott S, Bai W, Kumar K, Yeneni V, Nadler J: Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells under high glucose conditions. *Hypertension*, 33: 378-384. 1999.

- 11.** Remy I, Wilson IA, Michnick SW: Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*, 283:990–993, 1999.
- 12.** Becker S, Groner B, Müller CW: Three-dimensional structure of the STAT3-homodimer bound to DNA. *Nature*, 394:145–151, 1998.
- 13.** Chen X et al: Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*, 93: 827–839, 1998.
- 14.** Decker T, Kovarik P, Meinke A: GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res*, 17:121–134, 1997.
- 15.** Natarajan R, Gonzales N, Xu L, Nadler JL: Vascular smooth muscle cells exhibit increased growth in response to elevated glucose. *Biochem Biophys Res Commun*, 187, 552–560, 1992.
- 16.** Yamagishi S, Imaizumi T: Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr Pharm Des*, 11(18): 2279-99, 2005.
- 17.** Matsubara H: Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res*, 14-28;83(12):1182-91, 1998.
- 18.** Amiri F, Venema VJ, Wang X, Ju H, Venema RC, Marrero MB: Hyperglycemia enhances angiotensin II-induced janus-activated kinase/STAT signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 5;274(45): 32382-6, 1999.
- 19.** Williams B, Tsai P, Schrier RW: Glucose-induced down regulation of angiotensin II and arginine vasopressin receptor in cultured rat aortic vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 90: 1992-1999, 1992.
- 20.** Inaba T, Ishibashi S, Gotoda T, Kawamura M, Morina N, Nojima Y, Kawakami M, Yazaki Y and Yamada N: Enhanced expression of platelet-derived growth factor- β receptor by high glucose. *Diabetes*, 45: 507-512, 1996.
- 21.** Vignais ML, Sadowski HB, Watling D, Rogers NC, Gilman M: Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinase and STAT proteins. *Mol Cell Biol*, 16: 1759-1766, 1996.

- 22.** Yasunari K, Kohno M, Kano H, Yokokawa K, Minami M, Yoshikawa J: Antioxidants improve impaired insulin-mediated glucose uptake and prevent migration and proliferation of cultured rabbit coronary smooth muscle cells induced by high glucose. *Circulation*, 99(10):1370-8, 1999.
- 23.** Srivastava AK: High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: A potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes. *Int J Mol Med*, 9: 85-89, 2002.
- 24.** Junqueira LC, Carneiro J, Kelley OR: A LANGE medical book, Temel Histoloji, yedinci baskı sayfa 254-255.
- 25.** <http://www.sunyniagara.cc.ny.us/val/elasticct.jpg>
- 26.** Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A: Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(2):168-75, 2003.
- 27.** Ross R: Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115-216, 1999.
- 28.** Olivetti G, Anversa P, Melissari M, Loud AV: Morphometry of medial hypertrophy in the rat thoracic aorta. *Lab Invest*, 42(5):559-65, 1980.
- 29.** Ardaillou R: Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol*, 10: S30-S39, 1999.
- 30.** Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature*, 362: 801-809, 1993.
- 31.** Wilcox JN, Scott NA: Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis. *Int J Cardiol*, 54 Suppl 21-35, 1996.
- 32.** Iozzo RV, Murdoch AD: Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J*, 10(5): 598-614, 1996.
- 33.** Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI: Counter regulatory actions of angiotensin (1-7). *Hypertension*, 30:535-541, 1997.

- 34.** Danser AH: Local renin-angiotensin systems. *Mol Cell Biochem*, 157:211-216, 1996.
- 35.** Hollenberg NK, Fisher NDL, Price DA: Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension*, 32:387–392, 1998.
- 36.** Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A: Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem*, 265:22348–22357, 1990.
- 37.** Urata H, Nishimura H, Ganten D: Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am J Hypertens*, 9:277–284, 1996.
- 38.** Shiota N, Okunishi H, Takai S, Mikoshiba I, Sakonjo H, Shibata N, Miyazaki M: Tranilast suppresses vascular chymase expression and neointima formation in balloon-injured dog carotid artery. *Circulation*, 99:1084–1090, 1999.
- 39.** Touyz RM, Berry C: Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res*. 35(9):1001-15, 2002.
- 40.** de Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M, Goodfriend T, Harding JW, Inagami T, Timmermans PB: Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension*, 25:924–927, 1995.
- 41.** Sadoshima J: Versatility of the angiotensin II type I receptor. *Circ Res*, 82:1352–1355, 1998.
- 42.** Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FAO: Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens*, 13: 31-38, 2000
- 43.** Berk BC, Corson MA: Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle. Role of tyrosine kinases. *Circ Res* 80: 607-616, 1997.
- 44.** Nahmias C, Strosberg D: The angiotensin AT receptor: Searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci*, 16:223–225, 1995.

- 45.** Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ: Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem*, 268:24539–24542, 1993.
- 46.** Tamura M, Wanaka Y, Landon EJ, Inagami T: Intracellular sodium modulates the expression of angiotensin II subtype 2 receptor in PC12W cells. *Hypertension*, 33:626–632, 1999.
- 47.** Touyz RM, Endemann D, He G, Li J-S, Schiffrin EL: Role of AT2 receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small arteries in young SHR. *Hypertension*, 33 (Part 2): 366-373, 1999.
- 48.** Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Ichiki T, Gaffney A, Inagami T: Ang II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy fibrosis in chronic Ang II-induced hypertension. *Circulation*, 104: 346-351, 2001.
- 49.** Horiuchi M, Akishiita M, Dzau VJ: Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*, 33: 613-621, 1999.
- 50.** Alexander RW, Brock TA, Gimbrone Jr MA, Rittenhouse SE. Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension*, 7: 447-451, 1985.
- 51.** Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, Sternweis PC: Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science*, 251:804–807, 1991.
- 52.** Homma Y, Sakamoto H, Tsunoda M, Aoki M, Takenawa T, Oyama T: Evidence for involvement of phospholipase-gamma 2 in signal transduction of platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells. *Biochem J*, 290: 649–653,1993.
- 53.** Touyz RM, Wu XH, He G, Park JB, Chen X, Vacher J, Rajapurohitam V, Schiffrin EL : Role of c-Src in the regulation of vascular contraction and Ca²⁺ signaling by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*, 19: 441-449, 2001.
- 54.** Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW: Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta 1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem*, 273: 19772-19777, 1998.

- 55.** Touyz RM, Schiffrin EL: Role of calcium influx and intracellular calcium stores in angiotensin II-mediated calcium hyperresponsiveness in smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 15: 1431-1439, 1997.
- 56.** Billah MM: Phospholipase D and cell signaling. *Curr Opin Immunol*, 5: 114-123, 1993.
- 57.** Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Lyons PR, Lassègue B, Griendling KK: Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the β g subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 55: 142-149, 1999.
- 58.** Bonventre JV: Phospholipase A₂ and signal transduction. *J Am Soc Nephrol*, 3: 128-150, 1992.
- 59.** Nasjletti A: The role of eicosanoids in angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension*, 31: 194-200, 1997.
- 60.** Oyekan A, Balazy M, McGiff JC: Renal oxygenases: differential contribution to vasoconstriction induced by endothelin-1 and angiotensin II. *Am J Physiol*, 273: 293-300, 1997.
- 61.** Berk BC: Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: pathways activated by specific tyrosine kinases. *J Am Soc Nephrol*, 10 Suppl 11:S62-8, 1999.
- 62.** Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R: Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science*, 17;275(5298):394-7., 1997.
- 63.** Yin G, Yan C, Berk BC: Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(6):780-3, 2003.
- 64.** Luchtefeld M, Drexler H, Schieffer B: Role of G beta-subunit in angiotensin II-type 1 receptor signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 26;280(3):756-60, 2001.
- 65.** Sayeski PP, Ali MS, Harp JB, Marrero MB, Bernstein KE: Phosphorylation of p130Cas by angiotensin II is dependent on c-Src, intracellular Ca²⁺, and protein kinase C. *Circ Res*, 82: 1279-1288, 1998.

- 66.** Schmitz U, Ishida M, Berk BC: Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma-associated proteins. Characterization of a c-Src-dependent 97-kD protein in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 81(4):550-7, 1997.
- 67.** Sandberg EM, Wallace TA, Godeny MD, VonDerLinden D, Sayeski PP: Jak2 tyrosine kinase: a true jak of all trades? *Cell Biochem Biophys*: 41, 207– 232, 2004.
- 68** Schindler CW. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest.*;109(9):1133-7, 2002.
- 69.** McBride KM, McDonald C, Reich NC: Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J*. 19:6196–6206, 2000.
- 70.** Ihle JN: Cytokine receptor signalling. *Nature*, 377: 591-594, 1995.
- 71.** Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN: Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem*, 272: 24684-24690, 1997.
- 72.** Saito Y, Berk BC: Transactivation: a novel signaling pathway from Ang II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol*, 33: 3-7, 2001.
- 73.** Omura T, Yoshiyama M, Ishikura F, Kobayashi H, Takeuchi K, Beppu S, Yoshikawa J: Myocardial ischemia activates the JAK-STAT pathway through angiotensin II signaling in in vivo myocardium of rats. *J Mol Cell Cardiol*, 33(2):307-16, 2001 .
- 74.** Frank GD, Saito S, Motley ED, Sasaki T, Ohba M, Kuroki T, Inagami T, Eguchi S: Requirement of Ca(2+) and PKCdelta for Janus kinase 2 activation by angiotensin II: involvement of PYK2. *Mol Endocrino*, 16(2):367-77, 2002.
- 75.** Leduc I, Meloche S: Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of the focal adhesion protein paxillin in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 270: 4401-4404, 1995.
- 76.** Guan JL: Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. *Int J Biochem Cell Biol*, 29: 1085-1096, 1997.

- 77.** Zhu T, Goh EL, LeRoith D, Lobie PE: Growth hormone stimulates the formation of a multiprotein signaling complex involving p130(Cas) and CrkII. Resultant activation of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK). *J Biol Chem*, 11;273(50):33864-75, 1998.
- 78.** Chaudhary A, Brugge JS, Cooper JA. Direct phosphorylation of focal adhesion kinase by c-Src: evidence using a modified nucleotide pocket kinase and ATP analog. *Biochem Biophys Res Commun*, 7;294(2):293-300, 2002.
- 79.** Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, Schlessinger J: A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*, 10;383(6600):547-50, 1996.
- 80.** Li X, Dy RC, Cance WG, Graves LM, Earp HS: Interactions between two cytoskeleton-associated tyrosine kinases: calcium-dependent tyrosine kinase and focal adhesion tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 26;274(13):8917-24, 1999.
- 81.** Blaschke F, Stawowy P, Kappert K, Goetze S, Kintscher U, Wollert-Wulf B, Fleck E, Graf K: Angiotensin II-augmented migration of VSMCs towards PDGF-BB involves Pyk2 and ERK 1/2 activation. *Basic Res Cardiol*, 97(4):334-42, 2002.
- 82.** Cary LA, Han DC, Polte TR, Hanks SK, Guan JL: Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol*, 140: 211-221, 1998.
- 83.** Saward L, Zahradka P: Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 81: 249-257, 1997.
- 84.** Takahashi T, Taniguchi T, Konishi H, Kikkawa U, Ishikawa Y, Yokoyama M. Activation of Akt/PKB after stimulation with Ang II in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 276 (Part 2): H1927-H1934, 1999.
- 85.** Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T: Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 273: 8890-8896, 1998.
- 86.** Wang D, Yu X, Cohen RA, Brecher P: Distinct effects of N-acetylcysteine and nitric oxide on angiotensin II-induced epidermal growth factor receptor

phosphorylation and intracellular Ca(2+) levels. *J Biol Chem*, 21;275(16):12223-30, 2000.

87. Saito Y, Haendeler J, Hojo Y, Yamamoto K, Berk BC: Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cell Biol*, 21(19):6387-94, 2001.

88. Heeneman S, Haendeler J, Saito Y, Ishida M, Berk BC: Angiotensin II induces transactivation of two different populations of the platelet-derived growth factor beta receptor. Key role for the p66 adaptor protein Shc. *J Biol Chem*, 26;275(21):15926-32, 2000.

89. Weng YI, Shukla SD: Angiotensin II activation of focal adhesion kinase and pp60c-Src in relation to mitogen-activated protein kinases in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 8;1589(3):285-97, 2002.

90. Robinson MJ, Cobb MH: Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 9:180-186, 1997.

91. Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL: Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance vessels. *Circulation*, 99: 392-399, 1999.

92. Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Diep Q, Mardigyan V, Schiffrin EL: Differential activation of ERK1/2 and p38MAP kinase by angiotensin II type I receptor in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. *J Hypertens*, 19: 553-559, 2001.

93. Treisman R: Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*, 8:205-215, 1996.

94. Watson MH, Venance SL, Pang SC, Mak AS: Smooth muscle cell proliferation: Expression and kinases activities of p34cdc2 and mitogen-activated protein kinase homologues. *Circ Res*, 73:109-117, 1993.

95. Berk BC, Aranow MS, Brock TA, Cragoe EJ, Gimbrone MAJ: Angiotensin II-stimulated Na⁺/H⁺ exchange in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 262:5057-5064, 1987.

- 96.** Ip YT, Davis RJ: Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*, 10: 205-219, 1998.
- 97.** Liao DF, Monia B, Dean N, Berk BC: Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 272: 6146-6150, 1997.
- 98.** Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griending KK: p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem*, 273: 15022-15029, 1998.
- 99.** Laufs U, Liao JK: Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ Res*, 87: 526-528, 2000.
- 100.** Somlyo AP, Somlyo AV: Signal transduction by G protein, Rho kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, 522: 177-185, 2000.
- 101.** Griending KK, Ushio-Fukai M: NADH/NADPH oxidase and vascular function. *Trends Cardiovasc Med*, 7: 310-317, 1997.
- 102.** Hsueh WA, Do YS, Anderson PW, Law RE: Angiotensin II in cell growth and matrix production. *Adv Exp Med Biol*, 377: 217-223, 1995.
- 103.** Abe JI, Berk BC: Reactive oxygen species as mediator of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*, 8: 59-66, 1998.
- 104.** Kamata H, Hirata H: Redox regulation of cellular signaling. *Cell Signal*, 11: 1-14, 1999.
- 105.** Gunter S, Alexander W, Atkinson WJ, Gimbrone MA: Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cell. *J Cell Biol*, 92: 289-298, 1982.
- 106.** Xia P, Kramer RM, King GL: Identification of the mechanism for the inhibition of Na⁺,K⁽⁺⁾-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J Clin Invest*, 96(2):733-40, 1995.
- 107.** Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE. *Nature*, 375, 247–250, 1995.

- 108.** Ali MS, Syeski PP, Dirksen LB, Hayzer DJ, Marrero MB, Bernstein KE. *J Biol Chem*, 272, 23382–23388, 1997.
- 109.** Marrero MB: Introduction to JAK/STAT signaling and the vasculature. *Vascul Pharmacol*, 43(5):307-9. 2005
- 110.** Marrero MB, Fulton D, Stepp D, Stern DM: Angiotensin II induced insulin resistance and protein tyrosine phosphatases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 2009– 2013, 2004.
- 111.** Amiri F, Shaw S, Wang X, Tang J, Waller JL, Eaton DC, Marrero MB: Angiotensin II activation of the JAK/STAT pathway in mesangial cells is altered by high glucose. *Kidney Int*, 61, 1605–1616, 2002.
- 112.** Lee IK, Koya D, Ishi H, Kanoh H, King GL: d-Alpha-tocopherol prevents the hyperglycemia-induced activation of diacylglycerol (DAG)-protein kinase C (PKC) pathway in vascular smooth muscle cell by an increase of DAG kinase activity. *Diabetes Res Clin Pract*, 45: 183-190, 1999.
- 113.** Rai US, Fanburg BL, Cochran BH: Activation of the JAK–STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol*, 275:1640–1652, 1998.
- 114.** Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker S, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H: Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction, *Circ Res* 87, 1195–1201, 2001.
- 115.** Shaw S, Wang XD, Redd H, Alexander GD, Isales CM, Marrero MF: High glucose augments the angiotensin II-induced activation of JAK2 in vascular smooth muscle cells via the polyol pathway, *J Biol Chem* 278, 30634–30641, 2003.
- 116.** Li JM, Shah AM: Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, 1014–1030, 2004.

ÖZGEÇMİŞ

Oktay Hasan ÖZTÜRK, 29.05.1974 tarihli Ankara doğumludur.. İlkokul öğrenimini 1985 yılında Kepezaltı İlkokulunda, orta öğrenimini 1988 yılında Erenköy Ortaokulunda ve lise öğrenimini 1991 yılında Çağlayan Lisesinde, yüksek öğrenimini 1999 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tamamladı. 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladı. Evli ve bir çocuk babasıdır. Yabancı dili İngilizcedir.

EKLER

EK 13

From: Journal of Physiology and Biochemistry [<mailto:jpbif2@unav.es>]
Sent: Monday, January 30, 2006 5:55 PM
To: Akin Yesilkaya
Subject: Re: About Article 2219

Dear Prof. Yesilkaya,

Finally, your article "Changes in nitrite, prostaglandin Fla, and nytrotyrosine levels in lipopolysaccharide-stimulatedrats: functional and histochemical implications in aorta" has been accepted for publication in our Journal. We will send you the acceptance letter via urgent mail.

Yours sincerely,

Rafael Heredero

**Journal
of
PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY**

Apartado 177, 31080 Pamplona (España)

Tel 948-425600; Fax 948-425649
e-mail jpbif2@unav.es

A. Yesilkaya
Akdeniz University
Medical School
Department of Biochemistry
07070 Antalya (TURKEY)

Pamplona, March 9, 2006

Dear Dr Yesilkaya,

We are pleased to inform you that your article entitled "Changes in nitrite, prostaglandin Fla, and nityrotyrosine levels in lipopolysaccharide-stimulated rats. functional and histochemical implications in aorta", reference number 2219, has been accepted for publication in our Journal of Physiology and Biochemistry

It will probably be published in the next numer 62 (1), 2006

We are grateful for your trust in the Journal of Physiology and Biochemistry

Yours sincerely,



Rafael Horedero
Journal of
Physiology and Biochemistry

EK 2

Changes in nitrite, prostaglandin F_{1 α} and nitrotyrosine levels in lipopolysaccharide-stimulated rats: functional and histochemical implications in aorta

Oktay H. Öztürk¹, Arzu Çetin¹, Sadi S. Özdem², Nimet Uysal³, Ümit A. Kayışlı⁴, Ümit K. Şentürk³, Akın Yeşilkaya*¹

Akdeniz Üniversitesi, Medical School, Department of ¹Biochemistry, ²Pharmacology, ³Physiology, and ⁴Histology

Antalya, Turkey

Running Title: NO, nitrotyrosine and PGF_{1 α} in LPS-stimulated rats

*Correspondence: Dr. Akın Yeşilkaya, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 07070 Antalya

E-mail: yesilkaya@akdeniz.edu.tr

phone: +90 242 2274343-44131

fax: +90 242 2274482

This study was supported by Akdeniz Üniversitesi Araştırma Birimi with Project No: 99.01.0103.23

Changes in nitrite, prostaglandin F_{1α} and nitrotyrosine levels in lipopolysaccharide-stimulated rats: functional and histochemical implications in aorta

Abstract

We investigated the effects of lipopolysaccharide (LPS) stimulation on plasma nitrite, nitrotyrosine and 6-keto prostaglandin F_{1α} (PGF_{1α}) levels and the related resultant changes in function and histochemistry of aorta in rats.

5 mg/kg intravenous LPS was administered to the rats and plasma nitrite, PGF_{1α}, nitrotyrosine levels were analysed and compared with those in non-stimulated rats. The distribution of nitrotyrosine in the aorta was studied immunohistochemically. The contractile responses of aortic rings to phenylephrine (PE) from both the LPS-stimulated and control rats were studied in the organ baths.

There were increases in plasma nitrite, PGF_{1α}, and nitrotyrosine concentrations of LPS-stimulated rats compared to non-stimulated rats. Immunoreactivity of nitrotyrosine residues were detected in the endothelial and smooth muscle cells in LPS-treated but not in control rat aorta. The contractile responses to PE of the LPS-treated rat aortic rings were significantly reduced as compared with those of control rat's. Incubation of the aortic rings from LPS-treated rats with cyclooxygenase inhibitor indomethacine or with a combination of indomethacine and nitric oxide synthase inhibitor N⁰-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) increased the contractile responses to the levels observed in control rats suggesting that both prostanoids and particularly nitric oxide (NO) are involved in the reduced contractile responses in LPS-treated rats.

These results supported the view that LPS might causes an increment in both NO and PGI₂ levels. This increment in the NO and PGI₂ levels may be responsible from the reduction in responses of aorta to contractile agents in LPS-stimulated rats. Increased peroxynitrite formation in LPS-stimulated rats may lead to nitration of the tyrosil residues of the proteins in the aorta.

Key Words: Lipopolysaccharide , nitrite, nitric oxide, prostacyclin, nitrotyrosine.

Introduction

The homeostasis of vessels is maintained by the vasodilators and vasoconstrictors. In the blood vessels, endothelial tissue produce mainly two vasodilators, prostacyclin (PGI₂) and nitric oxide (NO), which act synergistically on vascular smooth muscles to keep blood vessels in a dilated state so that blood flows in large vessels and the surface stays nonthrombogenic. NO stimulates the synthesis of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP), which leads to vasodilation and inhibition of platelete aggregation(1). The other important vasodilators are bradykinin and endothelium-derived hyperpolarizing factor whereas endothelin, angiotensin, and endothelium-derived contracting factor are the vasoconstrictors(2).

NO is one of the most interesting molecules which is produced with three different nitric oxide synthases (NOS) from L-arginine. NO may react with superoxide anion to form peroxynitrite, that can rapidly produce toxic substances such as hydroxyl radicals. These reactive oxygene species promote lipid peroxidation, and subsequent tissue injury if they are formed in excessive amounts. During sepsis or hypertension, both NO synthesis and peroxynitrite production are substantially enhanced in a variety of tissues leading to injury and inflammation(3). Peroxynitrite modifies tyrosine residues in proteins to create nitrotyrosine, leaving footprints detectable in vivo(4).The reaction of NO with superoxide anion occurs at a diffusion-limited reaction rate and NO is the only molecule known to compete with superoxide dismutase for its substrate in a biological compartment(5).

It is also well known that inflammatory states such as sepsis or endotoxemia lead to the expression of an inducible form of NOS in vascular tissues(6) that results

in excessive NO production. The administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS) can stimulate the development of the systemic inflammatory response syndrome, which can compromise the function of many organ systems, resulting in multiple organ failure.

The cardiovascular effects exerted by endogenously produced NO are often mediated in conjunction with another important vasodilator and platelet inhibitory eicosanoid released from the endothelium, namely, prostacyclin (PGI₂) that is formed by the cyclooxygenase (COX) enzyme system from arachidonic acid. PGI₂ exerts vasodilator and antithrombotic effects by activating adenylate cyclase and increasing the levels of cAMP(7,8).

Administration endotoxins such as lipopolysaccharides increased reactive oxygen radicals that can also activate iNOS in cardiac vascular endothelial and smooth muscle cells, and cardiac myocytes(9). Not only NO but also PGI₂ levels increase in human endothelial cell culture in response to endotoxin administration(10).

In the present study, we aimed to investigate the effects of LPS stimulation on plasma nitrite, nitrotyrosine and PGI₂ levels and the possible related resultant changes in function and histochemistry of aorta in rats.

Materials and Methods

Experimental protocol

Male Wistar rats (n=20) weighing 250-300 g were used in this study and each animal received the care that was described by Animal Research Ethical Council of Akdeniz University. Animals were divided into control and LPS administered groups. LPS from *Escherichia coli* (serotype 055:B5) was dissolved in sterile saline administered intravenously at a dose of 5 mg/kg of body weight. Control rats were injected with the same volume of sterile saline. Before decapitating the animals, systolic and diastolic blood pressure was measured from the tail using MP 100-CE (Biopac Systems, Ca, USA) probes.

The rats were stunned and sacrificed by decapitation after 4 hours of injection. Blood was collected from each animal.

Plasma was used for measurements of nitrites and prostaglandin $F_{1\alpha}$. Nitrite measurement was performed according to the Griess reaction described before (11). Prostaglandin $F_{1\alpha}$ was measured with a modified HPLC method described by Uysal et al (12,13) with a flow rate of 1 ml/min of water:acetonitrile:benzene:acetic acid (767:230:2:1, v/v/v/v) as mobile phase. Plasma nitrotyrosine measurements were made on HPLC with UV detection at 365 nm using a 15 cm ODS18 (5 μ m) column with 50 mM KH_2PO_4 (pH 3.0)-methanol (92:8, v/v) as the mobile phase at 1 ml/min according to the method described before (14).

The thoracic aorta was removed rapidly and transverse rings (3 mm long) were cut and then mounted in thermostatically controlled (37°C) organ baths. The organ baths contained 30 ml physiological salt solution (PSS) of the following

composition (in mM): NaCl 118, KCl 5.9, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.5, NaH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5 and glucose 5.6. The pH of the solution was 7.4 during bubbling with 5% CO₂ in O₂. Isometric tension was continuously measured with a force transducer (FDT10-A, Commat Ltd., Turkey), connected to a computer-based data acquisition system (TDA 97, Commat Ltd., Turkey). The tissues were maintained for 60 min under a resting tension of 2 g which was found to be optimal for measuring the changes in tension. The preparations were washed with PSS every 15 min during the equilibration period. The presence of a functional endothelium was confirmed by the ability of acetylcholine (10⁻⁶ M) to produce relaxation of tissues precontracted with phenylephrine (PE, 10⁻⁶ M). Each aortic ring was exposed to gradually increasing concentrations of PE (10⁻⁹ to 10⁻⁴ M). In preliminary studies, we found no significant alteration in responses of aortic rings to repeated cumulative PE concentrations. To test the possible temporal changes in tension following PE administration due to spontaneous relaxation of the vessels, time control measurements were obtained with diluents following PE contractions. To evaluate the possible roles of endogenous prostanoids and NO in PE-induced contractions, concentration-response curves to PE were also obtained after 20 min incubation (for both) of aortic rings with cyclooxygenase (COX) inhibitor indomethacin and a combination of indomethacin (Indo, 10⁻⁶ M) and NOS blocker N⁰-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10⁻⁴ M, n= 9 and 12 for each control and LPS groups, respectively). Concentration-response curves were performed at intervals of at least 45 min.

Nitrotyrosine in the aortic tissue was detected with immunohistochemical methods in both groups. A section of aorta from each animal was fixed in formalin

and embedded in paraffin. After deparaffinization and rehydration tissue were exposed to a 3% hydrogen peroxide/methanol solution to block endogenous peroxidase activity. Sections were incubated in 10% normal goat serum to block nonspecific antibody binding. Each section were incubated with nitrotyrosine antibody and streptavidine-horseradish peroxidase with DAB to visualize positive immunoreactivity. Nonimmune serum as controls showed no detectable immunoreactivity in any treatment group.

Analysis of results

At the end of each experiment, aortic rings were detached from the recording set up, blotted and weighed. The contractile response was expressed as milligrams (mg) of tension developed per mg of tissue wet weight. All values are expressed as means \pm S.E.M. The concentration of agonist which elicited a 50% maximal response was designated as the EC₅₀. These values were determined by regression analysis of the linear portions of the log concentration-response curves. Sensitivity was expressed as pD₂ (-log EC₅₀). Smooth muscle contractility was evaluated as the maximally developed tension per unit tissue weight (E_{max}). Statistical analysis of the results was performed using the analysis of variance and Student's *t*-test. Wilcoxon was used for analysing plasma measurements. *P* values lower than 0.05 were considered significant.

Materials

All chemicals were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, Mo., USA). Absolute ethanol was used to dissolve the indomethacine to make a solution of 10⁻² M. All other drugs were dissolved in distilled water.

Results

Plasma nitrotyrosine, 6-keto prostaglandin F_{1a} and nitrite concentrations were increased in LPS stimulated rats compared to the control group (Figure 1). All results showed an almost 3 fold increase. Nitrotyrosine concentration was $69.7 \pm 11.0 \mu\text{M}$ (mean \pm S.E.M.) in control group, however we measured $172.1 \pm 20.1 \mu\text{M}$ in LPS stimulated group. Plasma prostaglandin F_{1a} had the same tendency, $6.48 \pm 1.51 \mu\text{M}$ in control group and $17.34 \pm 1.29 \mu\text{M}$ in LPS-stimulated group. The nitrite levels were $19.3 \pm 2.63 \mu\text{M}$ in control group and $42.4 \pm 3.81 \mu\text{M}$ in LPS stimulated group. The statistical calculations showed clearly the important difference between two groups ($p < 0.01$)

The distribution of nitrotyrosine residues in the aorta is shown in Figure 2. The immunohistochemical staining showed that nitrotyrosine residues were more stained closer to the endothelial layer and infused mostly in the smooth muscle cells after 4 hours of LPS injection.

After 4 hour incubation of LPS injection we measured the tail systolic and diastolic blood pressure and both the systolic and diastolic blood pressures showed a marked decrease ($p < 0.05$). Before LPS injection the systolic/diastolic blood pressure was $110.0 \pm 11.3/80.6 \pm 16.8 \text{ mmHg}$ and after 4 hours of the LPS injection it was $79.9 \pm 10.6/51.0 \pm 8,1 \text{ mmHg}$.

PE-induced contractions were markedly impaired in aortic rings from LPS-treated rats; both sensitivity and maximal response to PE were significantly lower in LPS treated rats compared to control rats. Indo incubation did not cause a significant alteration in sensitivity and maximal response of control rats to PE. On the other

hand, although there was no significant alteration in sensitivity, Indo incubation caused a significant increment in maximal response and sensitivity to PE in LPS-treated rats. Both sensitivities and maximal responses of “Indo + L-NAME” incubated aortic rings from control and LPS-treated rats to PE were significantly higher than their respective “Indo-incubated” and untreated controls. Increment in maximal response to PE in LPS group was markedly higher (%138) than those seen in control group (%43) together with approximately 3 and 4 times increases in sensitivities to PE, respectively (Table I, Fig. 3).

Discussion

Administration of bacterial LPS influences many organs and ends up with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) with dysfunction of the organs(15,16). Activation of macrophages and endothelial cells by endotoxins and the subsequent formation of reactive oxygen and nitrogen species are of central pathogenic importance in sepsis(17).

It has been shown in many studies that NO and its metabolites nitrite/nitrate increase with LPS stimulation(18-24). The activity and the expression of iNOS were reported to be increased in several tissues and different arteries following LPS administration(24-26). In our study, we found that 4 hours of LPS stimulation increased the plasma nitrite levels from 69.7 μM to 172.1 μM indicating that LPS-stimulation has the ability to increase NO in rats.

Similarly, plasma PGI_2 levels increased following LPS stimulation. Both iNOS and COX-2 expression increase after LPS injection. It has been reported that, during LPS stimulation, the release of prostanoids is due to activation of COX-2 and iNOS but not eNOS(27-29). Bishop-Bailey et al showed that in the cell culture, vessels release first 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ and PGE_2 at the same rate, then they start to release TXB_2 (28). In our study we measured plasma 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ as an indicator of PGI_2 and found that there was an almost 3 fold increase in 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ level after 4 hours of LPS-stimulation.

Zou and Ullrich proposed that PGI_2 synthase was inhibited by peroxynitrite resulting in endothelial dysfunction that led to collapse of microcirculation, with

subsequent ischemia and finally a loss of organ function(30). In another study of the same group, it was demonstrated that peroxynitrite nitrated the specific tyrosine residues in the enzyme protein, resulting in an inactive enzyme protein(31). Szabo et al demonstrated that injection of endotoxin leads to the expression of iNOS in thoracic aorta together with increases in circulating levels of both nitrite and immunoreactivity of nitrotyrosine in rats(19). In accordance, in the present study, we showed that nitrotyrosine concentration in plasma increased almost 3 fold 4 hours after LPS-stimulation. We also found a high immunoreactivity of nitrotyrosine both in endothelial and smooth muscle cells of thoracic aorta in LPS-stimulated rats compared to those of control rats.

It has been shown that cyclooxygenase was activated by NO and therefore, NO could also have an indirect effect on PGI₂ production via cGMP (1,32,33). It is also known that peroxynitrite activates COX and relaxation of aortic rings in rats(34, 35). Taken together, these data support the view that both peroxynitrite and NO are important modulators of COX activity.

Chen et al demonstrated that endotoxemia for 6 h was associated with a severe hypotension and vascular hyporeactivity to norepinephrine together with an increase in plasma NO in vivo and aortic NO ex vivo (36). Similarly, we also found that the contractile responses to PE were significantly decreased in LPS-treated rat aorta compared to control rats. Additionally, incubation of thoracic aortic rings with COX inhibitor indomethacin caused a significant increase in maximal contraction response to PE in LPS-treated but not control rats. Furthermore, incubation of LPS-treated rat aortic rings with both indomethacin and L-NAME caused a more marked increase in responses to PE that was significantly higher than those observed in

control rats. After indomethacin and L-NAME incubation, the contractile responses to PE in aorta from LPS-treated rats were similar to those seen in control rats indicating that both prostanoids and NO, particularly the latter, are responsible for the observed reduction in vascular responsiveness.

Taken together, our findings suggest that stimulation with LPS activates cytokines and increases the plasma levels of NO and PGI₂ together with an increase in immunoreactivity of nitrotyrosine in endothelial and smooth muscle cells of thoracic aorta in rats. Nitrated tyrosyl residues could trigger the activation of COX. The increment in NO and PGI₂ might play a role in decreased vascular responsiveness and hypotension in LPS treated rats. Further studies are needed to understand the mechanisms of interactions between PGI₂, NO and the smooth muscle proteins.

References

1. Salvemini D, Currie M, Mollace V; Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation. A key event in the platelet effect of nitrovasodilators. *J Clin Invest* 97: 2562-2568, 1996.
2. Ruschitzka FT, Noll G, Luscher TF, The endothelium in coronary artery disease, *Cardiology* 88 Suppl 3: 3-19, 1997.
3. Whittle BJ. Nitric oxide in physiology and pathology. *Histochem J* 27: 727-737. 1995.
4. Beckman JS, Koppenol WH; Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-C1437, 1996.
5. Huie RE, Padmaja S, The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Res Commun* 18: 195-199, 1993.
6. Moncada S and Higgs EA, Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 9: 1319-1330, 1995.
7. Vane JR, Angard EEA, Botting RM, Regulatory function of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323: 27-36, 1990.
8. Kelly RA, Smith TW; Nitric oxide and vasodilators: similarities, differences, and interactions. *Am J Cardiol* 77: 2C-7C, 1996.
9. Rees DD; Role of nitric oxide in the vascular dysfunction of septic shock. *Biochem Soc Trans* 23: 1025-1029, 1995.
10. Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Potzsch B, Spriestersbach R, Bhakdi S, Suttorp N, Seeger W; Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins Escherichia coli hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol* 159: 1909-1916, 1997.

11. Tracey WR, Tse J, Carter G; Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 1011-1015, 1995.
12. Cockrell CS, Ellis EF; Simple single high-performance liquid chromatographic method for the separation of cyclooxygenase and lipoxygenase enzyme metabolites of arachidonic acid. *J Chromatogr* 308: 316-321, 1984.
13. Izgut-Uysal VN, Derin N, Kaputlu I; Effect of nitric oxide synthase inhibition on the gastric mucosal barrier in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 12: 263-270, 2001.
14. van der Vliet A, Eiserich JP, Kaur H, Cross CE, Halliwell B; Nitrotyrosine as Biomarker for reactive nitrogen species. *Methods Enzymol* 269:175-184, 1996.
15. Redl H, Bahrami S, Schlag G, Traber DL; Clinical detection of LPS and animal models of endotoxemia. *Immunobiology* 187: 330-345, 1993.
16. Parillo JE; Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 328: 1471-1477, 1993.
17. Mitchell JA, Kohlhaas KL, Sorrentino R, Warner TD, Murad F, Vane JR; Induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat mesentery: lack of effect on action of vasoconstrictors. *Br J Pharmacol* 109: 265-270, 1993.
18. Bian K, Murad F. Diversity of endotoxin-induced nitrotyrosine formation in macrophage-endothelium-rich organs. *Free Radic Biol Med* 31: 421-429, 2001.
19. Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H; Endotoxin triggers of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta in vivo. *FEBS Lett* 363: 235-238, 1995.

20. Boughton-Smith NK, Evans SM, Laszlo F, Whittle BJ, Moncada S; The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability by endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol* 110: 1189-1195. 1993.
21. Griffiths MJ, Liu S, Curzen NP, Messent M, Evans TW; In vivo treatment with endotoxin induces nitric oxide synthase in rat main pulmonary artery. *Am J Physiol* 268: L509-L518, 1995.
22. Pulido EJ, Shames BD, Fullerton DA, Sheridan BC, Selzman CH, Gamboni-Robertson F, Bensard DD, McIntyre RC Jr; Differential inducible nitric oxide synthase expression in systemic and pulmonary vessels after endotoxin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R1232-R1239 2000.
23. Lin SL, Lee YM, Chang HY, Cheng YW; Yen MH. Effects of naltrexone on lipopolysaccharide-induced sepsis in rats. *J Biomed Sci* 12(2):431-40, 2005.
24. Seven I, Turkozkan N, Cimen B; The effects of nitric oxide synthesis on the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity in guinea pig kidney exposed to lipopolysaccharides. *Mol Cell Biochem* 271(1-2):107-12, 2005.
25. Wize mann TM, Gardner CR, Laskin JD, Quinones S, Durham SK, Goller NL, Ohnishi ST, Laskin DL; Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 56: 759-768, 1994.
26. Mercer DW, Smith GD, Cross JM, Russel DH, Chang L, Cacioppo J; Effects of lipopolysaccharide on intestinal injury; potential role of nitric oxide and lipid peroxidation. *J Surg Res* 63: 185-192, 1996.
27. Mebazaa A, De Keulenaer GW, Paqueron X, Andries LJ, Ratajczak P, Lanone S, Frelin C, Longrois D, Payen D, Brutsaert DL, Sys SU; Activation of cardiac endothelium as a compensatory component in endotoxin-induced cardiomyopathy,

Role of Endothelin, prostaglandins, and nitric oxide. *Circulation* 104: 3137-3144, 2001.

28. Bishop-Bailey D, Larkin SW, Warner TD, Chen G, Mitchell JA; Characterization of the induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in rat aorta in organ culture. *Br J Pharmacol* 121: 125-133, 1997.
29. Viridis A, Colucci R, Fornai M, Blandizzi C, Duranti E, Pinto S, Bernardini N, Segnani C, Antonioli L, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M; Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*;312(3):945-53, 2005.
30. Zou MH, Ullrich V; Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *Febs Lett* 382:101-104, 1996.
31. Zou M, Martin C, Ullrich V; Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol Chem* 378: 707-713, 1997.
32. Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P, Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br J Pharmacol* 114: 1171-1178, 1995.
33. Salvemini D; Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell Mol Life Sci* 53: 576-582, 1997.
34. Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ; Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:15069-15074, 1996.

35. Li J, Li W, Altura BT, Altura BM. Peroxynitrite-induced relaxation in isolated rat aortic rings and mechanisms of action. *Toxicol Appl Pharmacol* 28, 2005.
36. Chen SJ, Chen KH, Wu CC. Nitric oxide-cyclic GMP contributes to abnormal activation of Na⁺-K⁺-ATPase in the aorta from rats with endotoxic shock. *Shock* Feb;23(2):179-85, 2005.

Legends

Figure 1. The plasma levels of nitrotyrosine, 6-keto prostaglandin F_{1a} , and nitrite in control and LPS-stimulated group (* $p < 0.01$ in all the three parameters compared to control group, $n=20$).

Figure 2. Immunoreactivity of nitrotyrosine residues in control and LPS-stimulated rat aortas (Figure represents one of five different experiments).

Figure 3. Contractile responses to phenylephrine in isolated aortic rings from LPS-treated and control rats, alone and in the presence of indomethacine (Indo, 10^{-5} M) and N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester (NAME, 10^{-3} M). Vertical lines indicate SEM. ($n = 9$ and 12 for each control and LPS group, respectively).

Table I: Maximal contractile responses (E_{max} , mg tension / mg tissue) and sensitivities (pD_2) to phenylephrine in isolated aortic rings from LPS-treated and control rats.

Figure 1

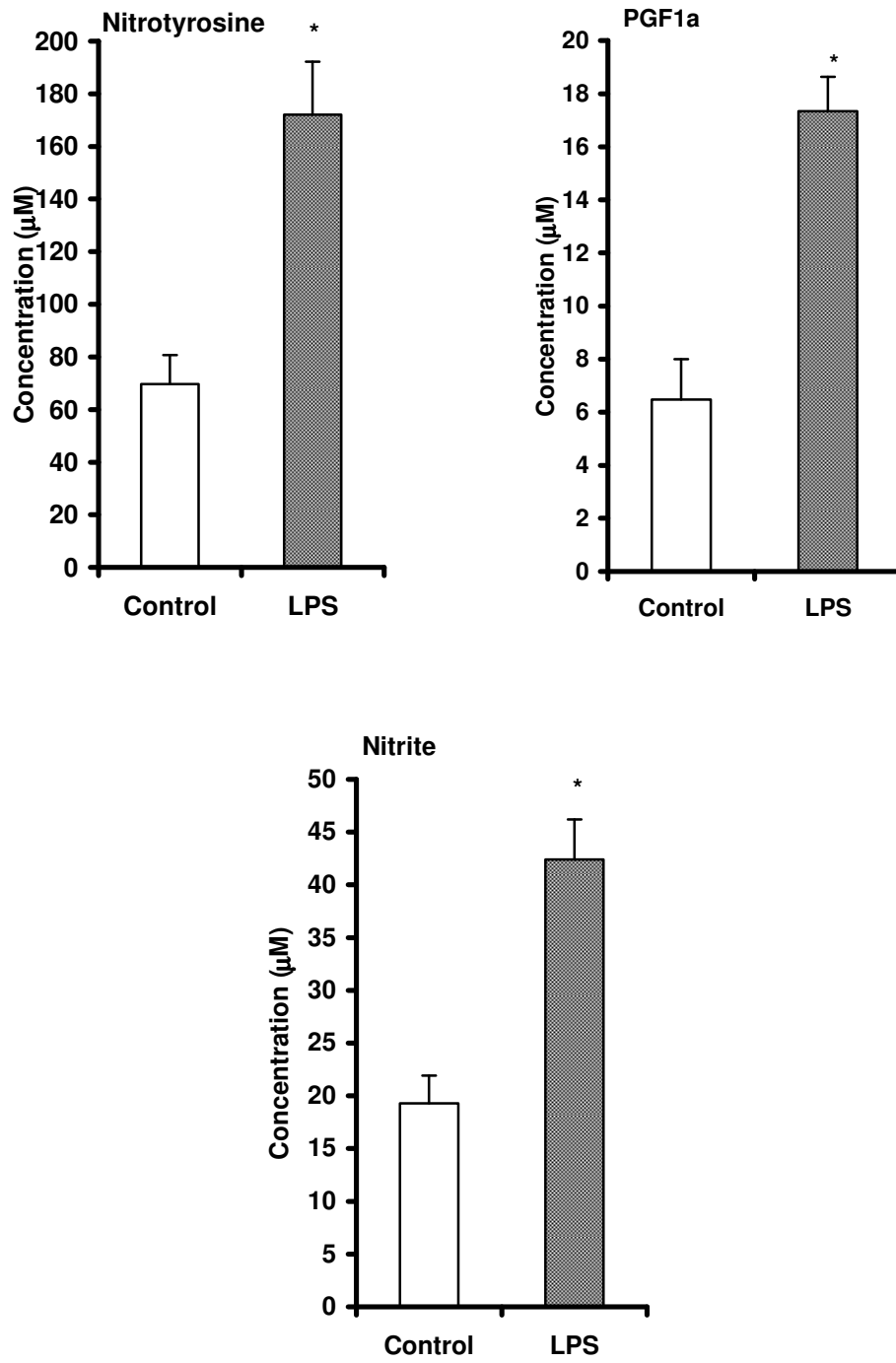


Figure 2

Control



LPS-stimulated

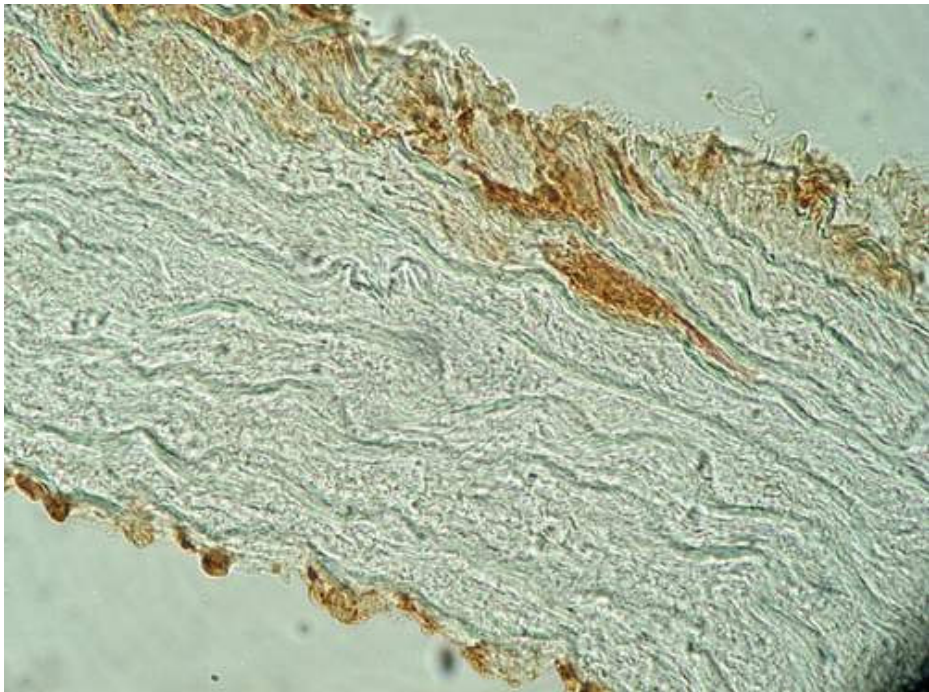


Figure 3

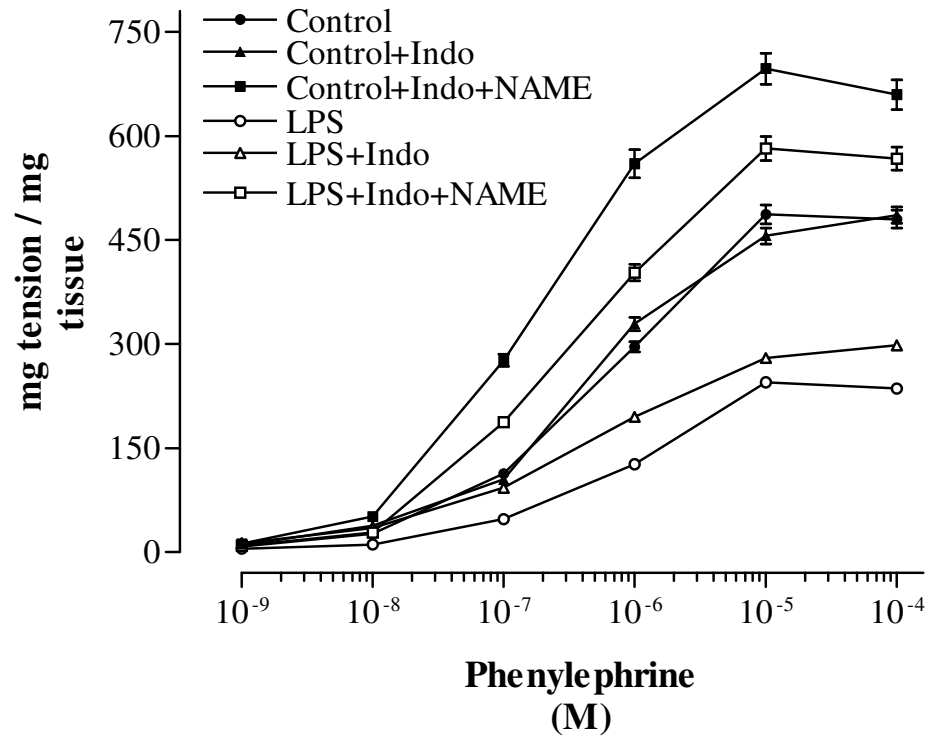


Table I

Table I: Maximal contractile responses (E_{max} , mg tension / mg tissue) and sensitivities (pD_2) to phenylephrine in isolated aortic rings from LPS-treated and control rats.

Groups	n	E_{max}	pD_2
Control	9	487 ± 38	6.21 ± 0.11
Control+Indo	9	486 ± 36	6.32 ± 0.05
Control+Indo+L-NAME	9	697 ± 63*†	6.79 ± 0.08*†
LPS	12	244 ± 16	6.04 ± 0.13
LPS+Indo	12	298 ± 18*	6.33 ± 0.13*
LPS+Indo+NAME	12	582 ± 51*†	6.50 ± 0.14*†

* $P < 0.05$, as compared with respective control or LPS group. † $P < 0.05$, as compared with respective "+ Indo" group.