

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Neşe AKIŞ SANSA

**ENDOTEL HÜCRENİN FARKLI DİYABET STRESLERİ  
ALTINDA MONONÜKLEER HÜCRELERİ BAĞLAMA  
VE KORUYUCU GENLERİ İFADELEME YANITLARI**

**(Doktora Tezi)**

**Nimet Dilek TİYEKLİ ÇELİK**

**Referans no: 10117440**

**EDİRNE-2016**

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Neşe AKIŞ SANSA

**ENDOTEL HÜCRENİN FARKLI DİYABET STRESLERİ  
ALTINDA MONONÜKLEER HÜCRELERİ BAĞLAMA  
VE KORUYUCU GENLERİ İFADELEME YANITLARI**

(Doktora Tezi)

**Nimet Dilek TİYEKLİ ÇELİK**

**Destekleyen Kurum : TÜBAP 2012/72**

**Tez No: 10117440**

EDİRNE-2016

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve Doç.Dr. Neşe Akış Sansa danışmanlığında doktora öğrencisi N. Dilek Tiyekli Çelik tarafından tez başlığı " Endotel Hücrenin Farklı Diyabet Stresleri Altında Mononükleer Hücreleri Bağlama Ve Koruyucu Genleri İfadeleme Yanıtları" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 21/06/2016 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Doktora Tezi**" olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Armağan Altun

İmza

Doç. Dr. Gülderen Yanıkkaya Demirel

İmza

Doç. Dr. Neşe Akış Sansa

İmza

Doç. Dr. Tammam Sipahi

İmza

Yrd. Doç. Dr. Jülide Duymaz Tozkır

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam Sipahi

Enstitü Müdürü

## TEŐEKKÜR

Bu tezin fikrinin oluŐumundan bitimine kadar t¼m aŐamalarında bilgisi, tecr¼beleri, desteği ile her daim yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Neşe AKIŞ'a; ilgisi, tecr¼besi ve sonsuz desteği için saygıdeğer hocam Prof. Dr. Murat TUğRUL'a; h¼crelerini benimle paylaŐan Prof. Dr. Ümit BAğRIAğIK (Gazi Üniversitesi) ve Doç. Dr. Batu ERMAN'a (Sabancı Üniversitesi); değerli katkıları için Yrd. Doç. J¼lide DUYMAZ'a; projeye desteklerinden dolayı TÜBAP'a; yardımlarını esirgemeyen ve hep yanımda olan meslektaŐım, arkadaŐım AraÇ Gör. Őebnem BUKAVAZ'a; destekleri için Utkan TIYEKLI'ye; varlıklarıyla bana güç veren kızım İğde Ela'ya ve aileme sonsuz teŐekk¼rlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	2
<b>ENDOTEL HÜCRE FİZYOLOJİSİ</b> .....	2
<b>DİABETES MELLİTUS'DA PLAZMA KOMPOZİSYONU ve TEDAVİ</b> .....	15
<b>DİYABETTE ENDOTEL İŞLEV KAYBI ve VASKÜLER PATOFİZYOLOJİLER.</b> ..	16
<b>ENDOTEL KORUYUCU GENLER ve ÜRÜNLERİYLE DRUG ÇALIŞMALARI</b> ..	21
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	28
<b>BULGULAR</b> .....	47
<b>TARTIŞMA</b> .....	80
<b>SONUÇLAR</b> .....	85
<b>ÖZET</b> .....	86
<b>KAYNAKLAR</b> .....	90
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	107
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	108
<b>EKLER</b> .....	110

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>ADA</b>	: American Diabetes Association
<b>AGE</b>	: Advanced Glycation End
<b>ANG II</b>	: Angiotensin II
<b>A1</b>	: Alpha-1 (B Cell Leukemia/Lymphoma 2 Related Protein A1)
<b>CO</b>	: Carbon monoxide
<b>cDNA</b>	: Complementary DNA
<b>DAG</b>	: Diacylglycerol
<b>DEPC</b>	: Diethylpyrocarbonate
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DMEM</b>	: Dulbecco'c Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	: Dimetyl Sulfoxid
<b>DNA</b>	: Deoxyribonucleic Asid
<b>dNTP</b>	: Deoksiribose Nükleotid Triphosphates
<b>EDTA</b>	: Ethylenediaminetetraacetic Asid
<b>eNOS</b>	: Endothelial Nitric Oxide Synthase
<b>FCS</b>	: Fetal Calf Serum
<b>GENC</b>	: Glomelüler Endotel Cell
<b>GDM</b>	: Gestational Diabetes Mellitus
<b>HO</b>	: Heme oxygenase
<b>HO-1</b>	: (Hsp-32) Heme oxygenase-1 (Heat shock protein-32)
<b>HPRT-1</b>	: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferse 1

**HUVEC** : Human Umbilical Vein Endothelial Cell  
**ICAM-1** : Intracellular Adhesion Molecule-1  
**IFG** : Impaired Fasting Glucose  
**IGT** : Impaired Glucose Tolerance  
**Keap1** : Kelchlike ECH-Associated Protein 1  
**LUBAC** : Linear ubiquitin chain assembly complex  
**MAE** : Murine Aortic Endothelial Cell  
**NADPH** : Nicotineamide Adenine Dinucleotide Phospate  
**NDDG** : National Diabetes Data Group  
**NF-κB** : Nuclear Factor kappa B  
**NO** : Nitric oxide  
**Nrf2** : Nuclearfactor-3erythroid 2-Related Factor  
**OTU** : Ovarian Tumor Domain  
**PAI-1** : Plazminogen Activator Inhibitor-1  
**PKC** : Protein kinase C  
**PZR** : Polimer Zincir Reaksiyonu (Polymerase chain reaction)  
**qRT-PZR** : Gerçek zamanlı- Polimer Zincir Reaksiyonu (Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction)  
**RAGE** : Receptor for Advanced Glycation End products  
**RIP1** : Receptor-interacting Protein1  
**RNA** : Ribonucleic Asid  
**ROS** : Reactive oxygen radicals  
**RT-PZR** : Ters Transkriptaz- Polimer Zincir Reaksiyonu (Reverse transcriptase polymerase chain reaction)  
**TBE** : Tris/Borate/EDTA  
**TGF-β** : Transforming Growth Factor-Beta  
**TNF-α** : Tumor Necrosis Factor-Alpha  
**TNFAIP3** : Tumor necrosis factor alpha induced protein 3  
**VCAM** : Vascular Cell Adhesion Molecule  
**WHO** : World Health Organization

## GİRİŞ ve AMAÇ

Vasküler hastalıklar insan ölümlerinin büyük bölümünü oluşturan yaygın sağlık problemi olarak bildirilmiştir (1). Bu hastalıkların büyük kısmı endotel hücre işlev kaybından kaynaklanmaktadır (2). Kandaki yüksek şeker ve insülin, sigara dumanı kondensatı, bozuk yapıllı lipit partikülleri, yüksek tansiyon ve istenmeyen trombosit agregasyonu en sık rastlanan endotel işlev kaybı nedenleridir (3-5). Bu olumsuz stres faktörlerine rağmen damarlardaki lezyonların hastalarda çok yavaş gelişmesi dikkat çekicidir. Lezyon gelişimini yavaşlatan mekanizmaların endotel hücrelerde evrimleşmiş koruyucu yanıt sistemiyle sağlandığı gösterilmiştir (6, 7). Ancak, hangi stres koşulunda hangi koruyucu alt sistemin devreye girdiği henüz tam açıklık kazanmamıştır. Bu tezde "farklı diyabet stresleri altındaki *in vitro* glomerüler endotel hücre" modelinde koruyucu hücre sel ve moleküler yanıtlardan bazıları açıklığa kavuşturulmak istenmiştir. Hipotezimiz, endotel hücrelerin tip-I DM, tip-II DM ve IGT stresleri karşısında mononükleer hücrelere yapışma ve koruyucu genleri ifade etme açısından farklı yanıtlar verdiğini iddia etmektedir. Çalışmanın sonucunda endotel hücrenin her bir diyabet stresi karşısında monosit ve T lenfositlerini hangi profilde yapıştırdığı; A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'larını hangi profilde ifade ettiği ortaya konacaktır. Elde edilen bilgiler diyabet tipine özgü endotel koruyucu drug tasarımına olanak sağlayabilir.



## GENEL BİLGİLER

### ENDOTEL HÜCRE FİZYOLOJİSİ

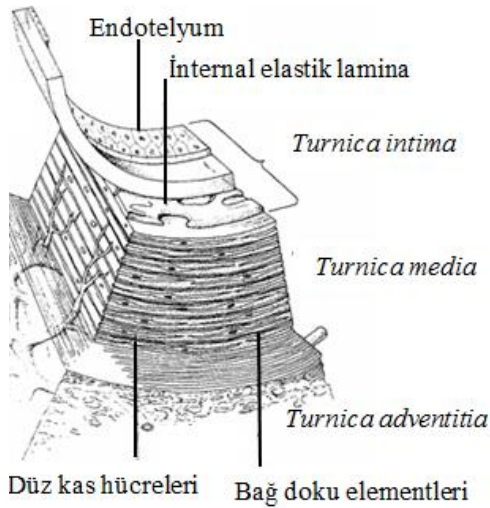
Endotel hücreler mezenkimden gelişen morfolojik açıdan yassı epitel hücre karakteri taşıyan, bazı özellikleri bakımından da bağ dokusuna benzeyen hücrelerdir ve vasküler, lenf damarlarının lümenal yüzeyini kaplamaktadırlar. Endotel hücre 10-15 µm genişliğinde ve 20-25 µm uzunluğunda çok köşeli morfolojidedir. Endotel hücreler yetişkin bir insanda yaklaşık 1 kg ağırlığındadır ve 1-7 m<sup>2</sup> alan kaplamaktadır (8). Hücre lümene doğru yassılaştırmış kabarık bir çekirdeğe sahiptir. Hücre içeriği, gelişmiş endoplazmik retikulum, mitokondri, ribozom, makromolekül-elektrolit içeren transport vezikülleri, *von Willebrand* faktörü (faktör VII) içeren *Weibel-Palade* cisimciklerinden oluşmaktadır (9, 10). Hücre yüzeyi 55Å kalınlığında olup glikoproteinler, glikozaminoglikanlar, proteoglikandan oluşan negatif yüklü glikokaliks tabakası ile kaplanmıştır (11). Glikokaliks yapısında koagülasyonun baskılanmasında etkin, heparan sülfat (antitrombin III'e kofaktör) ve dermatan sülfat (heparine kofaktöre) bulunmaktadır (12, 13). Bunun yanı sıra glikokaliks hücresel ve makromoleküler trafiğin düzenlenmesinde bariyer görevi görmektedir (14).

### Vasküler Yapı

Dolaşım sistemindeki kan ve lenf damarlarının endotel isimli bir epitel hücre ile tabaka oluşturduğu bilinmektedir. Kan damarlarının arter, arteriol, kapiller, venül ve ven damarlar gibi farklı histolojik yapıdaki borulardan oluştuğu düşünülürse farklı bazal yapılarla iletişim içinde olduğu ve buna göre farklı davranacağı beklenmektedir. Histolojik yapısı her ne olursa olsun endotel hücrenin dört ana işlevi kan hücrelerinin endotele yapışmadan

akmasını sağlamak, bazal ve lümen tarafındaki moleküllerin gereğinde diğer tarafa aktarılmasını sağlayacak geçirgenliği sağlamak, vasküler tonusu düzenlemek ve yangı sürecini yürütmektir.

Büyük çaplı damar duvar yapısı genel özellikler bakımından tüm damarlarda ortak olup üç tabakadan oluşmaktadır (Şekil 1). Lümen tarafındaki iç tabaka (*turnica intima*) endotel hücrelerden ve hemen altında bulunan bağ dokudan meydana gelmektedir. *Turnica intima* orta tabakadan internal elastik lamina ile ayrılmaktadır (15). Kollajen, elastin ve glikozaminoglikan gibi ekstrasellülmatriks komponentlerinden ve vasküler düz kas hücrelerinden oluşan orta tabaka (*turnica media*), duvarın en geniş tabakasıdır. *Turnica media* damarın çapını ve gerilimini düzenlemektedir. Üçüncü tabaka (*turnica adventitia*) ise fibroblastlar ve bağ dokudan meydana gelmekte ve damar duvarına mekanik stabilite kazandırmaktadır (16).



### Şekil 1. Damarların histolojik yapısı

Şeklinde arter duvar yapısının kesitsel görüntüsü gösterilmektedir. Endotelyum ve internal elastik laminadan oluşan *turnica intima* tabaka damarın iç tarafında yer almaktadır. Orta tabakada düz kas hücreleri ve bağ doku elementleriyle *turnica media*, damarın bazalında ise *turnica adventitia* tabakaları bulunmaktadır (15).

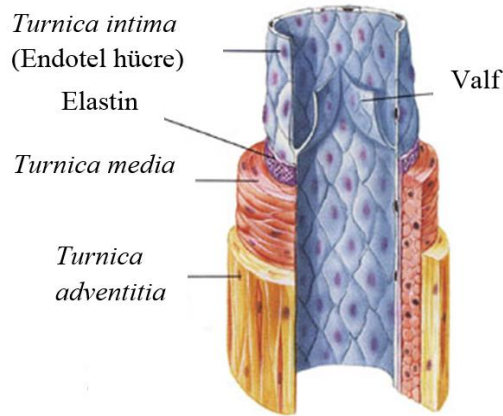
Kanı kalpten kapiller yatağa kadar taşıyan arteriyal damarlar, mürskuler arterler, elastik arterler ve arteriollerden oluşmaktadır (16). Elastik arterler büyük arterleri kapsamaktadır. Kanı direk kalpten alan arterlerdir. Damar yapısında en geniş tabaka elastik liflerin yoğunlukta olduğu *turnica mediadır*. Endotel hücreler tek katlı yassı epiteldir. Hücreler internal elastik membranla birlikte sıkı bağlantılarla ve *gap-junction* ile bağlanmıştır (16).

Kasılma ve gevşemelere yardımcı olan lifler içeren kalın subendotelyal tabakaya sahiptir (16). Aort, koroner karotid, iliak ve sublavian arterler elastik arterlerdendir.

Müsküler arterler en sık görülen arter tipidir. Kanın dolaşımında organlara dağıtımını sağlamaktadır. *Tunica intima* tabakası elastik arterlere göre daha incedir (16). Subendotelyal tabakada internal elastik lamina baskındır. Bu durum pencereci elastik membran özelliği kazandırmaktadır. Endotel hücreler internal elastik membranla iç içe girmiştir ve *tunica mediada gap-junction*larla düz kaslarla bağlanmıştır. Brakial ve femoral arterler müsküler arterlere örnektir.

Arterioller kan akışını düzenlenmesinde yer alan terminal arteriyal damarlardır. Arteriollerin lümen çapı duvar genişliği kadardır (16). Büyük arterioller ince ve pencereci internal elastik laminaya sahiplerdir (16). Ancak, küçük ve terminal arteriollerde bu yapı görülmemektedir. *Tunica media* tabakası düz kas yapısına sahiptir (16). Bu yapısal özelliği lümenin genişleyip daralabilmesine olanak tanımaktadır. Böylelikle kan akım miktarını düzenlemektedir.

Venler kanı dokulardan uzaklaştıran damarlardır. Arterlere göre daha büyük lümen çaplı ve ince duvarlı yapıdadır (16). Venlerde kanın geriye akışını önleyen kapakçıklar bulunmaktadır. Venler büyük venler, orta venler ve venüller olmak üzere üçe ayrılmaktadır (16).



## Şekil 2. Ven yapısı

Venlerin damar yapısı damarların genel histojik yapısına benzer şekilde üç tabakadan oluşmaktadır. Venler valf adı verilen ve kanın geriye kaçmasını engelleyen kapakçıklara sahiptir (17).

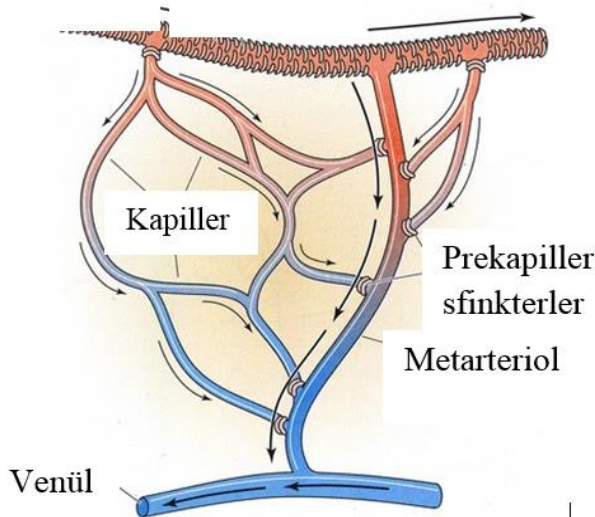
Büyük venlerin intima tabakaları incedir ve media tabakalarında birkaç kat düz kas hücreleri bulunmaktadır. *Tunica adventitia* en gelişmiş ve en kalın tabakadır.

Orta venlerin intima tabakaları endotel, bazal lamina, ince bir bağ dokusu ve kapakçıklardan oluşmaktadır. Media tabakasında kollajen fibriller, fibroblastlar ve düz kas hücrelerden oluşmaktadır. Kalınlaşmış adventisya tabakası uzunlamasına düzenlenmiş kollajen demetleri, elastik lifler ve az sayıda düz kas hücresi içermektedir. İç kısımlarda kapakçıklar bulunmaktadır.

Venüller, endotel hücrelerinin en gevşek bağlantılar yaptığı ince damarlardır. Kapillere benzer olarak medialarında kasılma özelliğinde olan perisitler bulunmaktadır. Venül çapı kapillere göre daha geniştir. Venül çapı genişledikçe perisitlerin yerini düz kas hücreleri almaktadır. Çapı büyüyen venüller birbirlerine yaklaşıyor kesintisiz bir tabaka oluşturabilmektedirler. Kanı kapillerden postkapiller venüller almaktadır. Geçirgenlik arterden venüllere doğru gittikçe artmaktadır.

Kapillerle tek hücrenin geçişine izin veren yapılardır (16). Buldukları yatakta kapillerlerin hepsi aynı anda açık değildir. Kapillerlerarası fenestrasyon adı verilen pencereler veya sıkı bağlantılar bulunmaktadır. Duvar yapılarındaki endotel hücreler bir bazal lamina ile çevrilidir ve birbirlerine *zonula occludens*ler ve *tight-junction*larla tutunmaktadır. Fizyolojik ihtiyaca bağlı olarak kapiller yatağın açılmasını ve kan akışının artmasını sağlar. Kapiller sistem arteriyel sistem ve venöz sistem arasında yerleşmiştir. Kanın kapillerlere geçişi prekapiller sfinkterler ile olmaktadır. Kapillerler, duvarlarında bulunan endotel hücrelerinin yapısı ve bazal laminanın bulunup bulunmamasına göre sınıflandırılırlar.

### Arteriöl



### Şekil 3. Kapiller sistem

Şekilde arteriyel sistem ve venöz sistem arasında yer alan kapiller sistem gösterilmektedir (18).

Devamlı kapillerde endotel hücreler sıkı bağlı, bazal lamina kesintisizdir. Bu damarlar sinir dokuları, ekzokrin bezler, bağ ve kas dokularında bulunmaktadır. Endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlar molekülün subendotelyuma geçişini engellemektir.

Pencereli (visseral) kapiller diyaframlı ve diyaframsız olarak ikiye ayrılmaktadır. Pencereli-diyaframlı kapillerlerde bazal lamina kesintisizdir. Endotel hücre sitoplazmasında fenestrata bulunmaktadır. Pencereli-diyaframsız kapillerlerde ise pencere yapısında diyafram bulunmamaktadır.

Sinüzoidal kapillerde endotel hücre sitoplazmasında pencereler bulunmaktadır. Bazal lamina ise kesintili veya yoktur. Sinüzoidal kapiller yatağı dolaşımı yavaşlatacak biçimdedir. Karaciğer, dalak, kemik iliği, lenfoid organlar ve böbrek üstü bezinde yoğun bulunmaktadır.

Damar havuzları olan kalp, hipofiz kapiller ağ, dalak ve karaciğerdeki sinozial sinüsler ve glomerüllerdeki kapiller ağa özgün yapıdadır.

Kan dolaşımı sırasında kapillerden geri alınamayan ve interstiyel alana geçmiş olan proteinlerin tekrar dolaşıma lenfatik damar sistemi tarafından kazandırılmaktadır. Lenfatik sistemi lenf, lenf kapillerleri, lenf damarları ve lenf düğümlerinden oluşmaktadır.

Lenf kapillerleri kan kapillerlerinden farklı olarak protein ve büyük moleküllerin geçişine izin verecek şekilde düzensiz ve geniş lümeneye sahiptirler. Bir ucu kapalı diğer ucu açık tek katlı endotel hücrelerden oluşan kapillerler birbirlerine yaklaşarak ağ oluşturmaktadır. Ağ oluşturarak birleşen kapillerler lenf damarlarını oluşturmakta ve sonrasında lenf nodlarına ulaşmaktadırlar (19).

Lenf damarları yapısal olarak venlere benzemektedir. Ancak lenf damarları venlere göre daha ince damar duvarına ve daha fazla kapakçıklara sahiptir. Lenf damar içeriğindeki kapaklar lenf sıvısının dolaşımında sadece periferden merkeze doğru hareket etmesini sağlamaktadır.

Endotel hücrelerin genel olarak birbirlerine benzemelerine rağmen buldukları yatağa özgü yapısal ve işlevsel farklılık göstermektedirler (20, 21). Bu farklılıklar hücre-hücre bağlantıları birimleri, hücre yüzey belirteçleri ve dış faktörlerle (mekanik güç, çözünebilir çoğalma faktörleri, sitokinler, plazma lipitleri, plazma proteinleri, kan hücreleri, mikroplar) oluşmaktadır (22). Örneğin böbrek glomerülü ve dalak sinüzoidal kapillerinde endotel hücreleri devamlılık göstermez, hücreler arasındaki boşluklar hücresel trafığa izin verecek niteliktedir (23). Tam tersine beyin bariyerini oluşturan endotel hücreler sıkı bağlantılar yapmıştır. Bazal membran kesintisizdir. Endotel hücrelerin transendotelyal kanalları ya da pencereleri yoktur, transsellüler geçiş özellikleri sınırlıdır, diğer endotel hücrelere göre daha

büyük hacimde mitokondrilere ve beyine özgü enzimlere sahiptirler. Bu özellikleri ile endotel hücreler kan ile beyin arasında seçici bariyer oluşturmaktadır (24).

Endotelyumun vasküler bütünlüğü sağlama ve bariyer olma özelliğini subendotelyal yüzeyde ekstrasellüler matriksle, lateral yüzeyde ise civar hücrelerle sıkı veya aralıklı bağlantılar sağlanmaktadır.

Endotel hücre gelişkin iskeleti F-aktin (mikrofilamanlar), mikrotübüller ve arafilamanları ile oluşturmuştur. Hücredeki sabit hücre iskeleti ve aktin sistemi endotel hücrelerin hem ekstrasellüler matriks hem de civar hücreler ile iletişimini sağlanmaktadır. Böylelikle gelişkin iskelet sistemi ile endotelyumun dinamik yapısını kontrol etmektedir (14). Endotel hücre aktin sistemi membran iskeleti, kortikal aktin ağ ve aktomyozin temelli gerilim liflerden oluşmaktadır (25). Kortikal aktin ağ endotel hücreye temel şeklinin verilmesi, hücreesel geçirgenliğin artırılması, endotel hücre-ekstrasellüler matriks ve hücre-hücre bağlantılarının yapılmasında rol oynamaktadır. Gerilim lifleri ise hücre merkezinde yer almakta ve hücre-hücre bağlantılarını sabitlemektedir (26). Sabit hücre iskeleti ile aktin sisteminin birbiriyle olan ilişkisinin düzenlenmesinde vasküler endotel-kadherin (VE-kadherin) kompleksinin ( $\beta$ -katenin,  $\alpha$ -katenin and p120 katenin, nektin) önemli bir rolü vardır (27). VE-kadherin hücrelerin birbirlerine zayıf bağlanmalarını sağlayan bir transmembran proteindir (27). Bu protein bir yandan civar hücrelerin ara filamanlarına bağlanarak hücre-hücre bağlantısını diğer yanda da hemidezmozomlar aracılığı ile hücre-ekstrasellüler matriks bağlantısını yapmaktadır (27, 28).

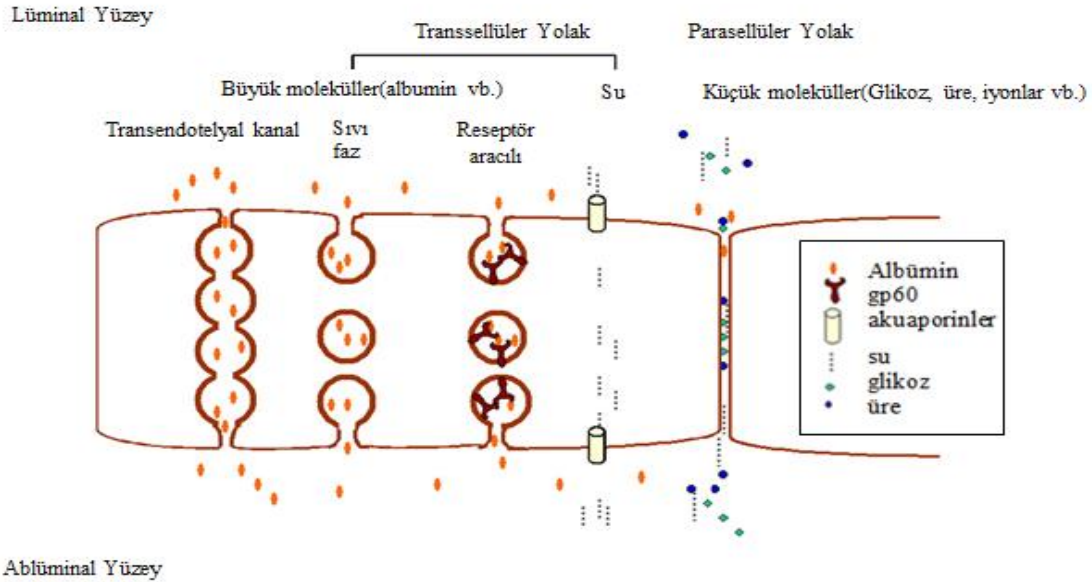
Ara filamanlar endotelyumun kan akım hızına ve basıncına yapısal olarak karşı koyabilmesini ve esneklik kazanmasını sağlanmaktadır. Mikrotübüller ise sinyalleşme ve yapısal değişimi düzenlemektedir. Bu iki özellik endotel hücrelere bariyer olma işlevi yanına hücre göçünü yönlendirme ve vaskülogenez işlevi de kazandırmaktadır (29).

Endotelyum kan ve doku arasında bariyer olmakla beraber hücre membranındaki birçok moleküle özgü (çoğalma faktörleri, koagulant, anti-koagulant proteinleri, lipit partikülleri, hormonlar ve metabolitlere özgü) reseptör ile kan akımını düzenleyen, anabolik ve katabolik işlevleri bulunan dinamik bir organdır.

Endotel hücreler gerektiğinde sentezledikleri vazoaktif araçlarla plazma moleküllerinin dokuya geçişini, vasküler tonun düzenlenmesini, fibrinolizis hemostazını, koagülasyon hemostazını ve yangıyı kontrol etmektedir (30, 31).

## Seçici Geçirgenlik

Kan ve doku arasındaki moleküllerin endotel hücrelerden ne şekilde taşınacağı hücreler arasındaki bağlantıların yapısına, taşınan molekülün ağırlığı, büyüklüğüne, doku-kan arasındaki molekül konsantrasyon gradientine ve moleküllerin hidrofilik ya da hidrofobik yapısına bağlıdır. Endotelyum subendotelyal alandaki moleküllerin geçişlerini pasif difüzyon, taşıyıcı proteinlerle kolaylaştırılmış difüzyon ve aktif taşıma ile kontrol etmektedir. Endotel hücreden moleküllerin geçişi parasellüler ve transsellüler yollarla olmaktadır (Şekil 4). Transsellüler yolla büyük moleküller transendotelyal kanallar, veziküller ya da reseptör aracılı aktif taşıma ile dokulara taşınmaktadır. Su moleküllerinin endotelyumda lüminal ve ablüminal geçişi transsellüler yolla membranının lipit çift katmanında bulunan akuaporinler ile yapılmaktadır. Glikoz, aminoasit, üre gibi küçük proteinler parasellüler yolda taşıyıcı proteinler-aracılı kolaylaştırılmış-difüzyonla dokulara taşınmaktadır. Parasellüler geçirgenlik aktomyozin güdümlü moleküler hücresel motorlar ile kontrol edilen hücresel yapışma gücü ve yakalayıcı yapışma gücü arasındaki denge ile düzenlenmektedir (32). Bu dengenin sağlanmasında endotel hücreler arasındaki bağlantılar oldukça önemlidir. Koroner ve pulmoner vasküler yataklardaki gibi devamlı kapillerlerde parasellüler geçiş ön plana çıkmaktadır.



**Şekil 4. Endotel hücre molekül taşıma yolları**

Fizyolojik koşullar altında yarıçapı 3 nm'den büyük olan albümin gibi moleküller, sıvı faz yolağı olan kaveola vezikülü gibi reseptör aracılı veziküler taşıma veya transendotelyal kanallardan geçerek transsellüler yolla taşınmaktadır. Su molekülleri membran üzerindeki akuaporinler ile taşınmaktadır. Glikoz gibi yarıçapı 3 nm'den küçük olan moleküller ise dokulara parasellüler yolla taşınmaktadır.

Ekstrasellüler matrikse bağılı integrin reseptörleri, moleküllerin taşınması sırasında endotel hücrelerin arasındaki bağlantıların geçişe elverişli hale gelmesine yardımcı olmaktadır. Vasküler endotel çoğalma faktörü (VEGF), histamin, bradikinin, trombin gibi araçlar reseptörlerine bağlanarak ekstrasellüler matriks ve hücrelerarası bağlantı kompleksinin aralanmasına imkan vermektedir. Endotelyumda reseptör aracılı sinyal yolağı aktivasyonu ve/veya baskılanması yangı mekanizmasının da kontrol edilmesini sağlamaktadır (32).

### **Vasküler Tonun Düzenlenmesi**

Vasküler ton merkezi ve lokal olarak iki seviyede düzenlenmektedir. Arteriyel ve ven sistemlerindeki sinir hücreleri beyni düzenli bilgilendirerek nörotransmitterler aracılığı ile damar kaslarının gerilim ve gevşemesini sağlayarak vasküler tonu sabit bir aralıkta tutmaktadırlar. Asetil kolin bu açıdan önemlidir. Renin-anjiyotensin sistemi (RAS) sıvı hacminin korunması ve kan basıncının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Kan basıncının düştüğü durumlarda renin hormonu böbrekteki glomerüler afferent arteriyollerin giriş bölgesinde bulunan jukstaglomerüler hücreler tarafından salgılanmaktadır. Renin, karaciğerde üretilerek dolaşıma katılan anjiyotensinojeni anjiyotensin I'e dönüştürmektedir. Aktive anjiyotensin I endotel hücre membran proteini ACE'ye (*Angiotensin-Converting Enzyme*) bağlanarak anjiyotensin II'yi metabolize etmektedir. Güçlü bir vazokonstriktör olan anjiyotensin II, arteriyoller üzerinde güçlü, venler üzerinde orta dereceli kasılmaya neden olarak kan basıncını yükseltmektedir. Böylelikle kalbin atım gücünü artmaktadır. Ayrıca anjiyotensin II adrenal korteksten aldosteron salınımını uyarmaktadır. Aldosteron artışı böbreklerde sodyum emilimi arttırarak sıvı hacminin artmasına, kan basıncının ve dolayısıyla damar basıncının yükselmesine neden olmaktadır.

Periferdeki kapillerlerde vasküler tonun sabitliğı lokal olarak endotel hücreler tarafından sağlamaktadır. Endotel hücre bu işlevini özgün ve çok gelişmiş iskeleti ile gerçekleştirmektedir. Kasılmayı endotelin-1 ile gevşemesini ise NO ile gerçekleştirmektedir.

Nitrik oksit (NO) hücre içinde L-arjinin amino asidinin yapısındaki terminal kuanidino nitrojen atomlarının, nitrik oksit sentaz enzimi ile oksidasyonu sonucu sentezlenmektedir (33). NOS enzimi, endotel hücreler endotelyal NOS (eNOS), nöronlar NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olarak üç farklı formda bulunmaktadır. eNOS enzimi vasküler gerilimi ile artan hücre içi kalsiyum konsantrasyonu, trombin, ADP, bradikinin reseptörü, P madde ve muskarinik agonistler ile aktive olmaktadır (34).



Endotel hücreler yüksek kan akımı sonucu sürüklenme şiddetine ve yüksek basınç sonucu mekanotransdüksiyon uyarısına maruz kaldıklarında vasküler gerilime uğramaktadırlar. Bu durumlarda vasküler kinin-kininojen sistemi devreye girmektedir. Endotel hücre sitoplazmasında, veziküller içinde saklanan kininojen lüminal mikroçevreye salgılanarak bradikininin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Açığa çıkan bradikinin bradikinin reseptörüne (BR2) bağlandığında endotel hücrelerde NO sentezini uyarmaktadır. Hücre içinde artan NO vasküler düz kas hücrelerine difüze olmaktadır. Düz kas hücrelerinde hücreiçi NO konsantrasyonunun artışı guanilat silaz (sGC) enzimini aktive ederek siklik GMP oluşumunu tetiklemekte ve hücreiçi serbest sitozolik kalsiyumu baskılamaktadır. Hücre içinde kalsiyumun baskılanması miyozinin defosforilasyonuna neden olarak düz kas kasılması engellenmektedir (35). NO ayrıca serum albuminin sülfidril grubu ile etkileşerek S-nitrozoalbumini oluşturmaktadır ve trombozis, yangı ve hücre proliferasyonunu baskılamaktadır (36). Nitrik asidin bir diğer işlevi intraselüler siklik guanosin monofosfatı arttırarak intraselüler kalsiyumu ve fosfatidil inositol 3-kinazı (PI3-kinase) baskılamak ve trombosit agregasyonunu önlemektedir. (8, 9).

Endotel hücre membranında araşidonik asitten üretilen prostasiklin (PGI<sub>2</sub>), trombosit kümeleşmesini engelleyen diğer bir vazodilatördür. Hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) konsantrasyonunu arttırarak trombosit kümeleşmesini inhibe etmektedir (37). Nitrik oksit ve PGI<sub>2</sub>'nin yanı sıra yine endotelden salınan ADPaz, endotel yüzeyindeki ADP'yi parçalayarak ortamdan uzaklaştırmakta ve sonuçta trombosit aktivasyonu inhibe edilmektedir.

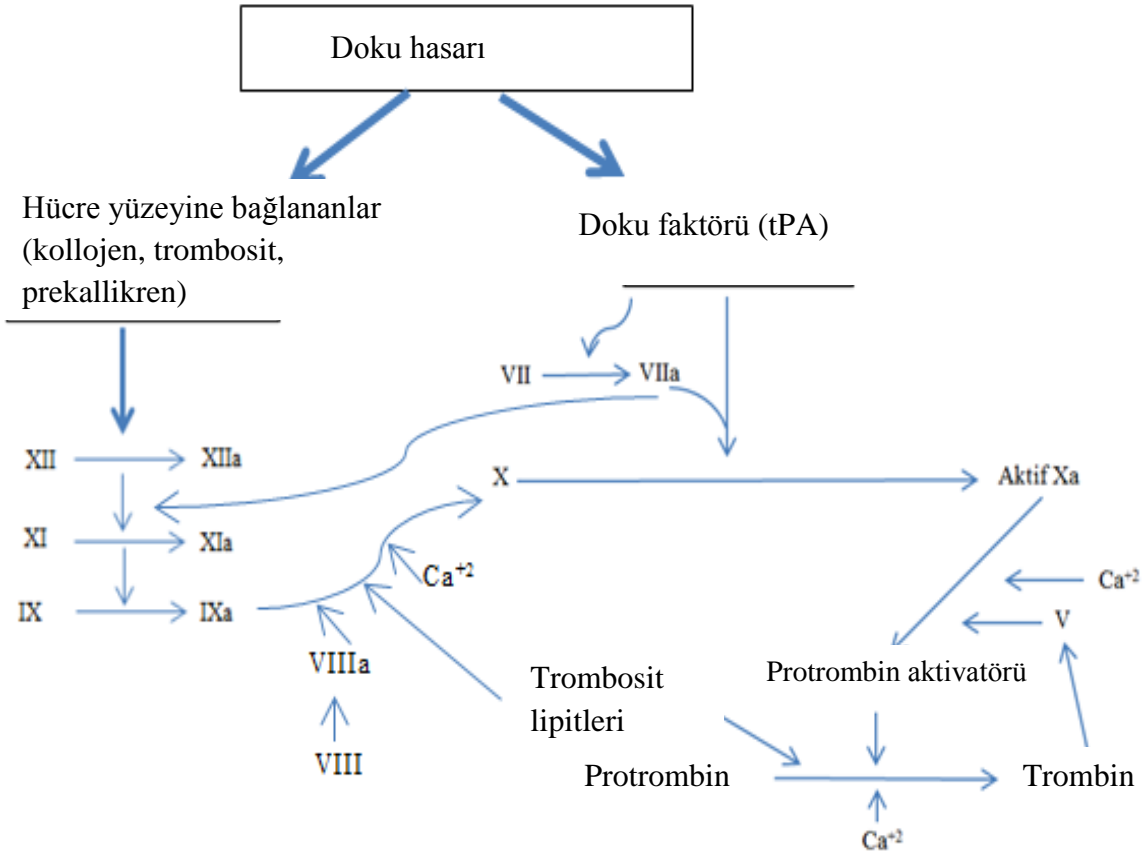
Endothelin-1 (ET-1) damarda hipoksi ve gerilim artışı ile aktive olan, trombosit kümeleşmesini baskılayan vazokonstriktör bir peptittir. Endothelin-1 endotelyumun uyarılması sonrasında endotel hücrelerde üretilmekte ve eksositoz ile salgılanmaktadır. ET-1 vasküler düz kas hücrelerinde G-protein ilişkili ET-A reseptörüne bağlanarak inositoltrifosfat (IP<sub>3</sub>) ve diaçilgliserol (DAG) yolağını aktive etmektedir. Bu yolağın aktivasyonu hücre zarındaki voltaj-bağımlı kalsiyum kanallarının açılmasına ve hücreye dışarıdan kalsiyum girmesine neden olmaktadır. Artmış hücreiçi kalsiyum konsantrasyonu vasküler düz kas hücrelerinde vazokonstriksiyonla sonuçlanmaktadır. Lökotrienler düz kas tonunu, geçirgenliği ve kemotaksisi düzenlenmektedir (38, 39).

Platelet aktive edici faktör (PAF) araşidonik asit metabolizması ile üretilen vazokonstriktör peptitlerin bir diğeridir. PAF endotel hücre yüzeyinde bulunmaktadır ve fosfolipit aktivatörüdür (40). Endotelyumda vazokonstriksiyon ve lökosit adezyonunun uyarılmasını sağlamaktadır (41).

## **Koagülasyon Hemostazi**

Normal hemostaz damar duvarı, suendotelial doku, trombositler, doku faktörleri ve plazma proteinlerin arasındaki ilişkinin denge hali olarak tanımlanabilmektedir. Vasküler gerilim, hipoksi, oksidatif stres ve endotoksinlerin yol açtığı doku ve/veya damar hasarı endotel hücre hemostazını bozmaktadır. Damar duvarındaki hasarlanma pıhtı oluşumu ve doku tamiri gerektirmektedir. Trombositler hasarın olduğu bölgede subendotelial doku kollojenlerine ve endotel hücreden salınan von Willebrand faktörüne bağlanarak aktive olmaktadır. Ardından kümeleşen trombositler primer hemostatik fibrin tıkaçı meydana getirmektedirler (42). Damar hasarlanmalarının daha büyük olduğu durumlarda ise koagülasyon kaskadı devreye girmektedir. Koagülasyon kaskadı ekstrinsek veya intrinsek yollarla aktive olmaktadır (Şekil 5). Her iki yolda da hasara karşı endotel hücreden doku faktörü (DF) sentezlenmektedir. Sirkülasyonda artan doku faktörü, faktör VIIa (ekstrinsek yolak) veya faktör IX (intrinsek yolak) ile birlikte faktör X'u aktive ederek koagülasyonu başlatmaktadır. Endotelium koagülasyonun meydana geldiği ana yüzeydir. DF artışıyla endotel hücre ve trombosit yüzeyinde trombin ve fibrine özgü bağlanma bölgelerinin ifadesi artmaktadır (43, 44).

Plazma proteinlerinden trombin, trombositlerin kümeleşmesini ve fibrin liflerinin oluşumunu tetikleyen bir proteindir. Trombin, endotel hücreye yüzeyindeki proteaz aktive edici faktör (PAR-1) reseptörü ile bağlanmaktadır (45). PAR-1 reseptörü ayrıca kendi kendini etkileyerek DF, NO, endotelin, PAF, Plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) gibi proteinlerin yapımını indüklemekte; böylece vasküler tonun ayarlanması, lökosit adezyonu ve koagülasyonun düzenlenmesinde rol almaktadır (46).



**Şekil 5. Koagülasyon kaskadı**

Doku hasarı koagülasyonun ekstrinsek ve intrinsek yollarını aktive edebilmektedir. Hücre yüzeyine trombositlerin ve doku faktörlerinin bağlanmasıyla ekstrinsek yolda faktör XII ve intrinsek yolda faktör VII aktive olmaktadır. Kaskad ekstrinsek yolda IXa ve intrinsek yolda VIIa faktörleri ile faktör Xa'yı ve sonunda trombini aktive ederek devam etmektedir. Trombin ile fibrin lifleri meydana gelmektedir.

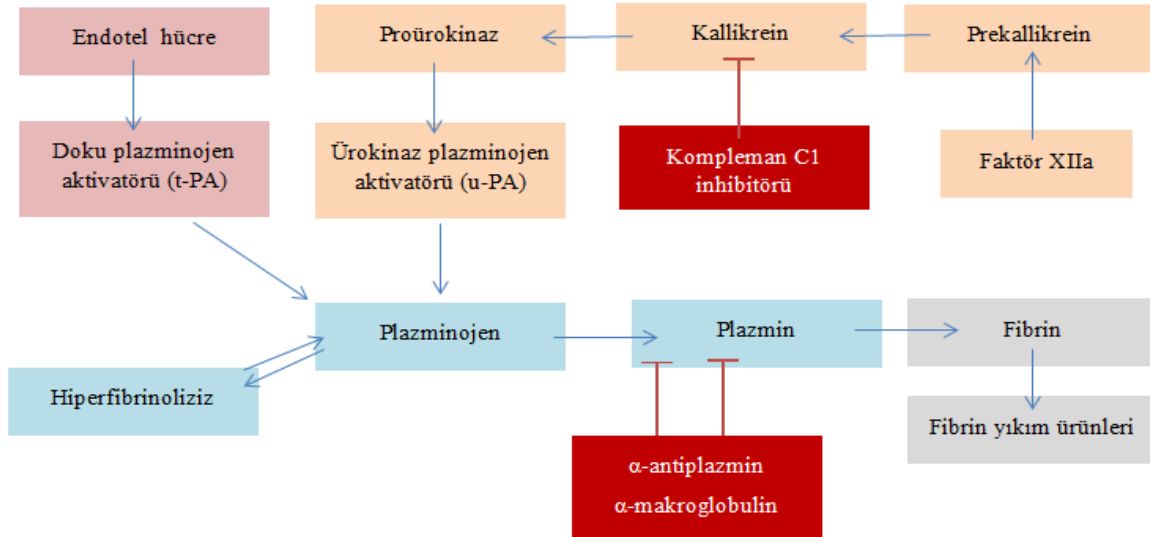
Endotel hücre duvar yapısında bulunan heparan sülfat ve dermatan sülfat (glikozaminoglikanlar) hücre yüzeyine antikoagülatik özellik kazandırmakta böylelikle fizyolojik koşullarda trombositlerin damar duvarına yapışmasını engellemektedir. Heparan sülfat hücre/matriks aktivitesi ile ilişki antitrombin III, dermatan sülfat ise heparinkofaktör II gibi koagülasyonu engelleyen proteinlerinin aktive kalmasını sağlamaktadır (13, 47). Endotel hücreler koagülasyonu engelleyen proteinler sentezlemektedirler. Trombomodulin bu proteinlerin en önemlisidir. Endotel hücrelerden membrana bağlı ya da sirkülasyonda serbest formda bulunan trombomodulin trombine yüksek afinite göstermektedir. Trombomodulin fizyolojik koşullarda trombini bağlamaktadır ve trombin aktivasyonunu baskılamaktadır. Bununla birlikte trombin-trombomodulin kompleksi koagülasyon kaskadının baskılayıcılarından olan protein C'yi de aktive etmektedir (48). Protein C koagülasyon

kaskadındaki faktör V ve faktör VIII'i inaktif hale getirmektedir. Endotel hücrelerden salınan ve koagülasyonu engelleyen proteinlerden biri de doku faktör yolağı inhibitor (TFPI) proteindir. TFPI proteini faktör X'e bağlanarak faktör X'i baskılamakta ve trombin oluşumunu engellemektedir (49).

### Fibrinoliz Mekanizması

Endotel hücreler fizyolojik koşullarda tromboz oluşumunun kontrol ederek kanın damar içinde sirkülasyonunu sağlamaktadır. Kan proteinlerinden plazminojen, trombin oluşumunu baskılayan ve fibrinlerin yıkımını sağlayan plazmin proteinin öncülüdür. Endotel hücreler ürettikleri proteaz doku plazminojen faktörü (t-PA) ile plazminojeni plazmine dönüştürmekte ve fibrinolitik sistemi aktive etmektedirler (37) (Şekil 6).

Böbrek endotel hücreleri tarafından üretilen diğer bir plazminojen aktivatörü ürekinaz plazminojen faktörüdür (u-PA) (50). Kallikrein ile aktive olan u-PA doku tamiri ve angiogenezde rol oynamaktadır (37, 51). Plazminojen faktörleri  $\alpha 2$  antiplazmin ve plazminojen aktivasyon inhibitörleri (PAI-1, PAI-2, PAI-3) ile kontrol edilmektedir (52).



Şekil 6. Fibrinolitik sistem

Endotel hücrelerde sentezlenen plazminojen faktörleri plazminojenin plazmine dönüşmesini sağlamaktadırlar. Faktör XIIa kallikrein-kinin sistem yolağını aktifleyerek böbrek endotel hücrelerinden ürokinaz plazminojen faktörünün salgılanmasına yol açmaktadır. Bu yolakta kompleman C1 inhibitör proteini kallikreinin baskılayıcısıdır. Koagülasyon kaskadında plazmin oluşumu  $\alpha$ -antiplazmin ve  $\alpha$ -makroglobulin proteinleri ile kontrol edilmektedir.

## Yangı

Dokuda yangının başlatılması, sürdürülmesi ve sonlandırılması sürecinde endotel hücreler önemli görev üstlenmektedirler. Bunlardan biri bazal yönden gelen proinflamatuvar sitokinleri tanıyarak selektinler, kemokinler ve adezyon molekülleri ifade etmeleri ve böylece lökosit trafiğini kontrol etmeleridir. Bir diğeri endotel hücreler profesyonel olmayan fagosittir ve aktive olduklarında MHC II ile antijen sunumu yapmaktadırlar. Aktive endotel hücrenin proinflamatuvar sitokin salgılayarak lokal immün hücreleri uyarması da bir diğeri özelliğidir. Ayrıca endotel hücreler anafilatoksinlerle uyarılabilirler ve mast hücrelerinin ürettiği vasküler aminlerle geçirgenliklerini değiştirebilirler. Bu sırada vasküler kinin-kininojen sisteminden kaynaklanan bradikininin yangı ortamındaki ağrının gelişiminde ana rol oynadığı bilinmektedir. Damar hasarında subendotelyal yüzey ortaya çıktığında gerek anyonik yüzeylere saldıran komplemanın lezyonu büyütmesi ve gerekse ortaya çıkan araziidonik asit ürünlerinin yangıyı çoğaltması önemlidir.

Yangıda ilk aşama kan akışı sırasında yuvarlanan lökositlerin yavaşlatılmasıdır. Bu aşamada endotel hücreler yüzeylerinde ifade ettikleri selektinlerle (E-selektin, P-selektin) lökositlere bağlanarak adeta fren etkisi yapmaktadır. E-selektin ve P-selektin, lökositleri yüzeylerine bulunan CD15 molekülünün yapısındaki sialil Lewis-X molekülüne bağlanarak lökositlerin yavaşlamasına sebep olmaktadır. Lökositler endotel hücrelerle yarı yapışık halde yuvarlanmaya ve endotel hücrelerle daha uzun süreli ilişki içerisine girmeye başlamaktadır. Bu sırada endotel hücre yüzeyinde kemokin reseptör artmakta ve yangı alanında sentezlenen kemokinler endotel hücre yüzeyindeki kemokin reseptörlerine bağlanmaktadır. İkinci aşamada lökosit-endotel hücre kontakının uzaması lökositlerin endotel yüzeyinde bağlanmış olan kemokinlerden sinyal alarak orada kümeleşmesine ve yüzeylerinde integrin moleküllerin sentezinin tetiklenmesine neden olmaktadır. Üçüncü aşama hücrelerin yangı alanına göç ettiği aşamadır. Kemokin reseptörlerinin hücre yüzeyinde artışı ve proinflamatuvar sitokin salgılanımı endotel hücrelerde adezyon moleküllerinin sentezini arttırılmaktadır. Hücre içi adezyon molekülleri (ICAM-1, ICAM-2), vasküler adezyon molekülü-1 (VCAM) ve mukozal adresin hücre adezyon molekülü-1 (MAdCAM-1) endotel hücre adezyon molekülleridir. Adezyon moleküllerinin lökositlerle etkileşimi lökositler üzerindeki integrinlerin ifadenmesini uyarmaktadır. Lökosit hücreler, yüzeyindeki integrinlerle adezyon moleküllerine bağlanarak yangı alanına göç etmektedir.

## DİABETES MELLİTUS'DA PLAZMA KOMPOZİSYONU ve TEDAVİ

Diabetes mellitus (DM) insülin hormonunun çevresel veya genetik nedenlerle mutlak veya görece azlığı ya da etkinliği sonucu kandaki glikoz seviyesinin aşırı yükselmesi ile ilişkili bir metabolizma hastalığıdır.

2012 yılında Amerikan Diyabet Cemiyeti (ADA) DM hastalığını etiyolojik olarak güncelleyerek sınıflandırılmıştır (53). DM hastalığı tanı kriterleri ise 1997 yılında Amerikan Ulusal Diyabet Bilgi Grubu (NDDG) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kuruluşları tarafından belirlenmiş ve 2003 yılında revize edilmiştir. ADA raporuna göre Tip I DM, Tip II DM, Gebelik Diyabeti (gestasyonel diyabet, GDM) ve diğer özel tipler olarak sınıflandırılmıştır. Bozulmuş kan glikozu (IFG) ve bozulmuş glikoz toleransı (IGT) ise diyabet öncesi grupta gösterilmiştir. NDDG ve WHO raporuna göre sağlıklı ve DM hastası kişilerin plazma glikoz konsantrasyonları Tablo-1'de gösterilmektedir.

**Tablo 1. Sağlıklı kişilerin ve DM hastalarının plazma glikoz konsantrasyonları**

Normaglisemi	Hiperglisemi		
	IFG	IGT	Diabetes Mellitus (Tip I, Tip II, GDM)
Normal glikoz düzenlemesi			
-Açlık kan glikoz seviyesi <100 mg/dl (5,6 mmol/l) -OGTT sonrası 2. saatte glikoz seviyesi < 140 mg/dl	Açlık glikoz seviyesi ≥100 mg/dl (5,6 mmol/l) ve < 126 mg/dl (6,9 mmol/l)	OGTT sonrası 2. saatte glikoz seviyesi ≥140 ve <200 mg/dl (11,0 mmol/l)	-Açlık kan glikoz seviyesi ≥ 126 mg/dl (6,9 mmol/l) -OGTT sonrası 2. saatte glikoz seviyesi ≥ 200 mg/dl (11,0 mmol/l) - Herhangi bir saatte glikoz seviyesi ≥ 200 mg/dl (11,0 mmol/l)

**OGTT:** Oral glikoz tolerans testi; **IFG:** Bozulmuş kan glikozu; **IGT:** Bozulmuş glikoz toleransı; **GDM:** Gestasyonel diabetes mellitus.

Tablonun ilk sütununda normal plazma glikoz konsantrasyonuna sahip kişilerin kan glikoz seviyesi ve oral glikoz testi sonrası 2. saatteki plazma glikoz konsantrasyon aralığı gösterilmektedir. 2, 3 ve 4. sütunlarda plazma glikoz konsantrasyonu normalin üstünde olan kişilerin plazma glikoz konsantrasyonları bulunmaktadır.

Tip I DM pankreasta bulunan insülin üretiminden sorumlu beta hücrelerin immün aracılı ya da idiyopatik yıkılımı sonucu plazmada insülin azlığı ya/ya da eksikliği ile seyreden kronik bir hastalıktır. İnsülinin azlığı ya/ya da eksikliği plazmada glikoz konsantrasyonunun yüksek

olmasıyla karakterizedir (54). Özellikle 7-15 yaş çocukluk çağında juvenil DM olarak görülmektedir.

Tip II DM en sık görülen diyabet tipidir. İnsüline bağımlı olmayan, farklı oranlarda insülin direnci, ilerleyici beta hücre disfonksiyonu ve bazı kişilerde mutlak insülin eksikliği ile karakterizedir.

Gestasyonel DM (GDM) gebeliğe özgü gelişmektedir. 100 gr glikoz yüklemesi ardından üçüncü saatte yapılan oral glikoz testi sonucunda plazma glikoz seviyesi 135 mg/dl olan gebelere GDM tanısı konmaktadır (55).

Diğer özel tipler kromozomal ve mitokondriyal DNA mutasyonları kaynaklı, ilaç ve kimyasallara bağlı, ekzokrin pankreatik hastalık ilişkili, Tip II DM varyantları, enfeksiyon kökenli olanlar ve genetik sendromlar olarak ayrılmaktadır.

Diyabette güncel tedavi yöntemleri ile kandaki glikoz seviyesinin kontrol edebilmek ve akut komplikasyon oluşum riskinin azaltabilmek ve hastanın yaşam kalitesinin artırılması amaçlanmıştır. İnsülinin tedaviye girmesi bu alanda çığır açmış, hasta yaşam kalitesi ve ömrünü uzatmıştır. Günümüzde hastalara diyabet tiplerine göre farklı içerikte tedavi modelleri uygulansa da genel olarak tedavide eğitim, tıbbi beslenme tedavisi, egzersiz ve medikal tedavi (oral anti diyabetik ilaçlar, karbonhidrat emilimini inhibe eden ilaçlar, insülin duyarlılığını arttıran ilaçlar, insülin salgılatıcı ilaçlar, insülinomimetrik ilaçlar, insülin) olmak üzere dört yöntem kullanılmaktadır. Ancak tedavi yöntemleriyle hastaların yaşam sürelerinin artması hastalığın yıllar içinde kronik mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar meydana getirmesine neden olmuştur. Ayrıca, hastalığın tedavi süresinin uzunluğu, yüksek bütçeli tedavi masrafları hastalara, ailelerine ve topluma maddi manevi sorumluluk yüklemektedir. Bu sebeple daha etkin ve özgül tedavi gereksinimi doğurmuştur.

### **DİYABETTE ENDOTEL İŞLEV KAYBI ve VASKÜLER PATOFİZYOLOJİLER**

Diyabette görülen yüksek glikoz, insülin direnci ve artan serbest yağ asit salınımı gibi metabolik anormallikler endotel işlev kaybı kaynaklı vaskülopatilerin komponentleridir. Kan plazmasındaki artmış glikoz ve/veya insülin konsantrasyonu hücrel aktivasyon, metabolik stres ve iskemi-reperfüzyona uzanan patolojik süreçlere yol açmaktadır. Metabolik stresin oluşması ile endotel hücrelerin enerji metabolizmasında, yangısal aracılarn ifadelenmesinde ve antioksidan relaksasyon mekanizmalarında değişiklikler meydana gelmektedir (56, 57).

Hücre içinde serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı her zaman bir denge içerisinde (58). Hiperglisemi ve/veya hiperinsülinemi gibi stresler

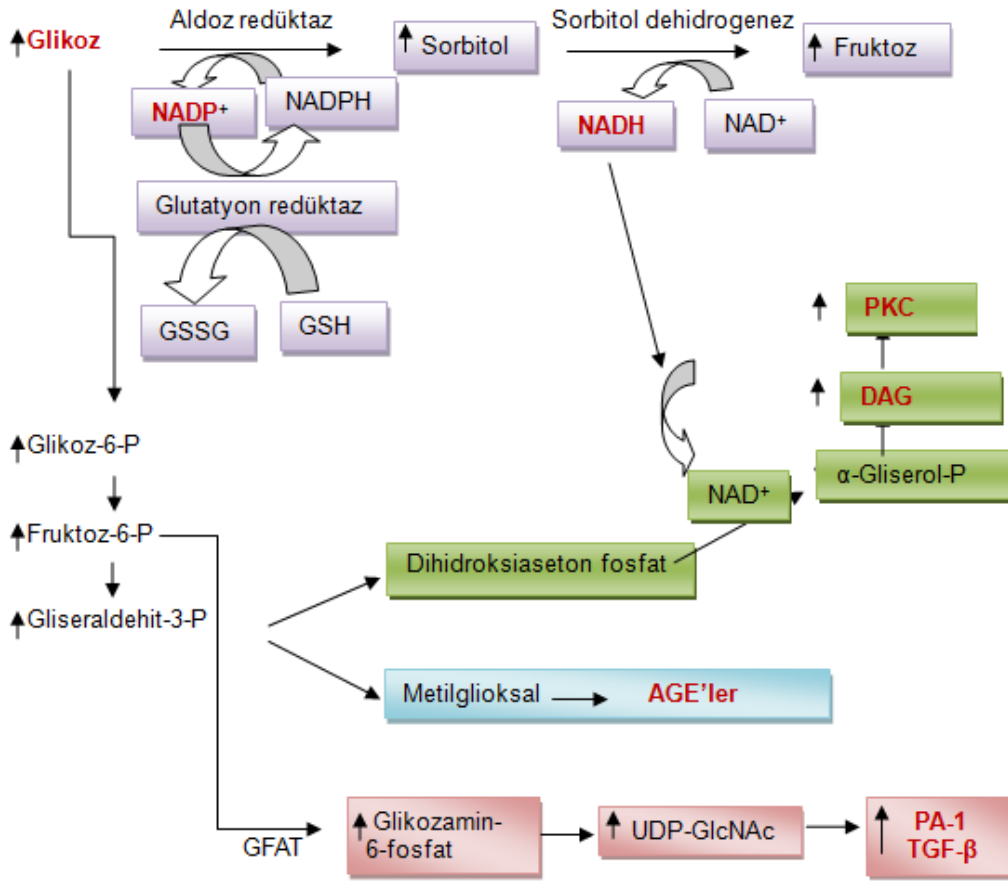
karşısında organizma ilk savunma düzeneği olarak enzimatik olan veya olmayan reaksiyonlarla hücrede serbest oksijen radikalleri (ROS) yapımını arttırmaktadır. Hiperglisemi ve/veya hiperinsülinemi streslerinin kronikleşmesi bu radikallerin hücre içinde birikmesine ve hücre içi oksidatif stresin oluşmasına sebep olmaktadır. Oksidatif stres artışı endotelyumdan vazokonstriksiyon faktörleri salınımını, yangıda rol alan kemokin, sitokin ve adezyon moleküllerinin ifadelenmesini, hiperkoagülasyon ile trombosit aktivasyonunu arttırmaktadır. Sonuçta endotelyumun denge işlevleri bozulmaktadır. Hemostazdaki dengesizlik endotel hücre ve mikroçevresinde bulunan immün sistem elemanlarını fevkalade aktive etmektedir. Endotel hücrede sentezlenen IL-8 sitokini ve intracelluler adhesion molecule-1 (ICAM-1) adezyon moleküllerinin lökositlerin adezyonunu arttırdığı gösterilmiştir (31). Ancak endotel hücreye yapışan lökosit profilinin diyabetin farklı tiplerinde ne şekilde olduğuna dair bulgular elde edilmiştir, ancak, olası kombinasyonların mekanizması aydınlanmamıştır.

Endotel hücre işlev kaybı vazokonstriksiyon ve vazodilatasyonun arasındaki dengenin vazokonstriksiyon yönünde bozulması, vasküler geçirgenliğin, trombosit aktivasyonunun inflamatuvar yanıtın ve çoğalma faktörlerinin ifadelene artması ile karakterizedir (59, 60). Endotel hücrelerin diyabetteki gibi yüksek glikoz konsantrasyonuna maruziyet sonrası diyabet ve komplikasyonlarının meydana gelme sürecinin ilk basamağı serbest oksijen radikallerinin (ROS) oluşumu ile oksidatif stres artışıdır.

Diyabetli kan plazmasında görülen yüksek şeker konsantrasyonunun metabolizması oksidatif stres artışı ile sonlanan biyokimyasal reaksiyonlara sebep olmaktadır (Şekil 7).

Plazmada glikoz konsantrasyonunun artmasıyla gerçekte glikoza karşı düşük afinite gösteren aldoz reduktaz enzimini glikoz ile reaksiyona girerek poliol yolağını aktive etmektedir. Bu reaksiyon nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) bağımlıdır (63). NADPH konsantrasyonu azalırken hücre içi bir antioksidant olan glutasyonu baskılanmaktadır. Glutasyonun baskılanması hücre sel relaksasyon mekanizmalarından olan glutasyon peroksidaz-glutasyon redüktaz sisteminin bozmaktadır. Bununla birlikte azalan glutasyon konsantrasyonu hücre içinde patolojik düzeyde NO üretilmesine de sebep olmaktadır. Fazla miktardaki NO sitozolde patojenik reaktif oksijen türlerinden peroksinitrite dönüşmekte ve ürün olarak ROS açığa çıkmaktadır. İlintili olarak hücre içi ROS ürünleri birikimi hücre sel oksidatif stresi arttırmaktadır (64). Artan oksidatif stres ile endotel bağımlı gevşeme işlevi yeniden bozulmaktadır. Böylelikle hücre sel relaksasyon mekanizmasının tamamen safdışı kalmaktadır.





### Şekil 7. Yüksek glüköz metabolizması

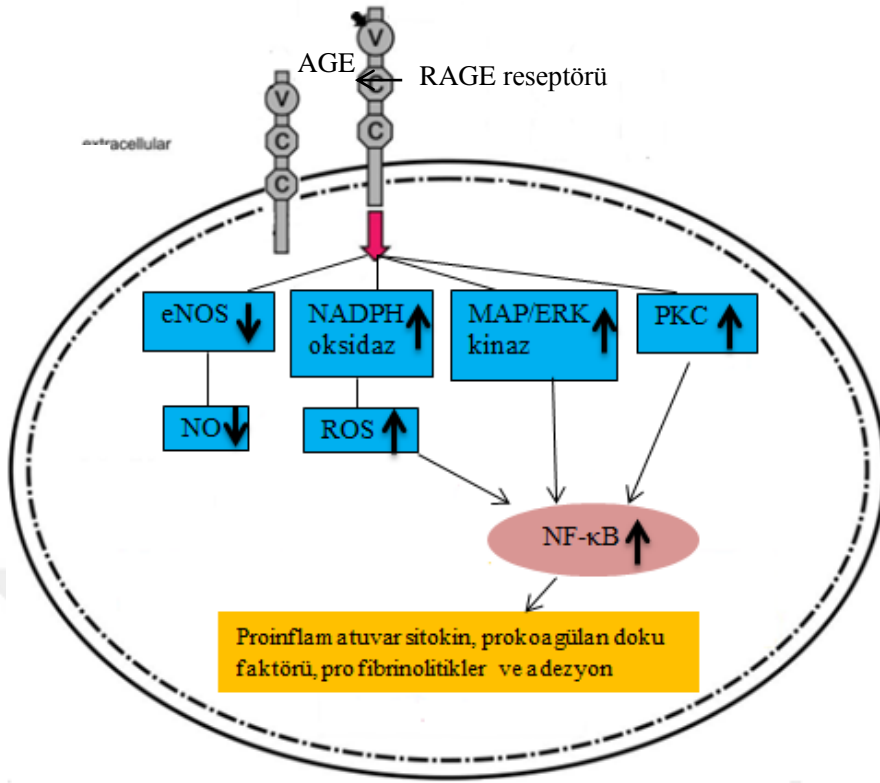
Endotel hücreler yüksek glüközü metabolize ederken patolojik son ürünler açığa çıkmaktadır. Aşırı glüköz bir taraftan gliseraldehit-3-fosfat'a parçalanırken diğer taraftan aldoz redüktaz enzimi ile reaksiyona girmektedir. Reaksiyon sonrasında hücresel relaksasyon mekanizması olan glutasyon disülfidin (GSSG) glutatyona dönüşümünü baskılanmaktadır (61). Açığa çıkan sorbitol früktoza çevrilmektedir. Bu reaksiyon PKC yolağı aktivasyonu için öncül olan dihidroksiaseton fosfatın  $\alpha$ -gliserolfosfata dönüşmesini sağlamaktadır. Gliseraldehit-3-fosfat ileri glükasyon son ürünleri öncülü metilglioksal, PKC yolağı öncülü dihidroksi aseton fosfat ve heksosamin yolağı öncülü glüköz-6-fosfata dönüşmektedir. Glukozamin früktoz-6-fosfat amidotransferaz enzimi ile insülin direnci ve glüköz toksisitesine yol açan üridin difosfat-N-asetilglüköz amin sentezi arttırmaktadır (62).

NADPH konsantrasyonundaki azalma ikincil olarak yine hücresel oksidatif stresin artmasında etkin olan protein kinaz C (PKC) yolağını tetiklenmektedir (65). Polioliol yolağının ikinci reaksiyonunda ilk ürün olan sorbitol früktoza dönüşmekte ve reaksiyon sırasında NADH açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan NADH proteinaz K sinyal yolağının ikincil mesajcısı diaçilgliserolun novo sentezinde kullanılmakta ve PKC yolağını aktive etmektedir (66). Diyabetteki DAG-PKC sinyal yolağının aktivasyonu, bozulmuş vasküler geçirgenlik, vasokontraksiyon, hücre dışı matriksin sentezi ve yenilenmesi, hücre büyümesi ve apoptozu,

angiogenez, anormal sitokin aktivasyonu, monosit ve lökositlerin adezyonu gibi endotel işlev bozukluklarıyla ilişkilendirilmiştir (67).

Hücreiçi ROS üretimi için önemli bir faktör olan ileri glikasyon son ürünleri (AGE), redüklenmiş şeker ve proteinlerin birbirini izleyen glikasyon ve oksidasyon reaksiyonları sonucu oluşmaktadır. Hücreiçi ve hücre dışı proteinlerin amino grupları yüksek glikoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında herhangi bir enzimin aracılığına gereksinim duymadan glikozun reaktif indirgeyici karbonil grubu bağlanarak kontrolsüz glikasyon reaksiyonlarına meydana getirirler. AGE metabolizması glikozdan türemiş dikarbonil öncüllerinin hücre içinde oto-oksidasyonu ile glioksala dönüşmesiyle başlar. Şekerin karbonil grubu ile proteinin Schiff bazı olarak adlandırılan serbest amino grubunun aldehitik karbon oksijen çift bağı glikoza bağlanır ve Amodori (glikozdan türemiş 1- amino-1 deoksifruktoz lizin) ürünleri hızla açığa çıkar (67). Amodori ürünleri oluşana kadar reaksiyon geri dönüşümlüdür. Sonrasında Amodori ürünleri ayrışarak 3-deoksiglukozon açığa çıkar. Ardından ürün glikoksal, 3-deoksiglukozon ve metilglikoksal olmak üzere AGE öncüllerine ayrılır (66). Metilglikoksal AGE'leri meydana getirirken, dihidroksiasetonfosfat mikrovasküler patolojilerin oluşumunda rol oynayan protein kinaz C (PKC) sinyal yolağını aktive etmektedir.

Hücreiçi AGE öncül ürünleri hücreleri üç genel mekanizma ile hasarlamaktadır. Birinci mekanizmada; AGE öncülleri hücre dışı matriks proteinlerine çapraz bağlanarak bu proteinlerinin yapılarını ve işlevlerini bozmaktadırlar. İkinci mekanizmada, bozulmuş matriks proteinleri, diğer matriks proteinleri ile hücre yüzeyindeki matriks protein reseptörlerine (integrin) bağlanarak hücre dışı matriks yapısını bozmaktadırlar. Üçüncüsü mekanizma da ise AGE öncülleri ile plazma proteinleri kompleksi, serbest oksijen radikalleri ile indüklenmiş endotel hücre üzerindeki AGE reseptörüne (RAGE) bağlanmaktadır. AGE'lerin reseptörleri RAGE'ye bağlanması p21ras, ERK 1, ERK 2, protein kinaz (MAPKs), SAPK (stress-activated protein kinase)/JNK (c-Jun n-terminal kinase), Rho, GTPases, PI3K, JAK (Janus kinase)/STAT (signal transducer and activator of transcription) ve Cdc42 hücreiçi sinyal yolaklarını uyararak NF-κB ve diğer yolakları aktive etmektedir (Şekil 8). NF-κB transkripsiyon faktörü aktivasyonu, pro-inflamatuvar sitokinlerin, prokoagulan doku faktörünün ve VCAM-1, ICAM gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonlarını arttırmaktadır (68, 69). Yüksek glikoz aynı zamanda gelişmiş glikasyon son ürünü reseptörü (RAGE) üretimini artırır (70). RAGE aktivasyonu ROS üretiminde etkin NADPH-oksidaz yolağını da uyarmaktadır (33, 71).



**Şekil 8. RAGE aracılı NF-κB sinyal yolağı aktivasyonu**

Glikozilasyon son ürünü olan AGE'nin reseptörü RAGE'ye bağlanması hücre içinde NF-κB transkripsiyon faktörünün çeşitli sinyal yolaklarının aktive olmasına sebep olmaktadır. NF-κB aktivasyonu hücrede VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, TNF-α, IL-1 ve IL-6 salınımı ile inflamatuvar yanıtı uyarırken TGF-β1, CTGF (connective tissue growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) salınımı ile prokoagülan, hücre proliferasyonu ve migrasyon yanıtlarını uyarılmaktadır.

AGE'ler nefropati, nöropati ve retinopati gibi uzun dönem diyabet sonucu oluşan mikrovasküler komplikasyonların sebebi olarak gösterilmektedir (72-75). Hastalarda amadori ürünlerinin oluşumu kanda hemoglobin A1c seviyesinde artışla takip edilmektedir.

Diabetes Mellitus hastalığı çeşitli patolojik süreçler sonucunda gelişmektedir. Ancak vasküler patolojilerin temel sebebi damarları kaplayan ve kan ile dokular arasında bir bariyer görevi gören endotel hücrelerin yüksek glikoza maruz kalması sonucu aktiflenerek kronik yangısal yanıt oluşturmalarıdır. Bu kronik yangısal yanıt periferik ve koroner arter hastalıkları gibi makrovasküler, nöropati, nefropati, retinopati gibi mikrovasküler hastalıklara neden olmaktadır.

Diyabetlilerde dengeleyici düzenleme fonksiyonlarını yitirmiş olan endotel hücre ateroskleroz için elverişli bir mikroçevre oluşturmaktadır. Vasküler yapıda NO biyoyararlanımının azalması, yerine antagonisti olan endotelin-1 aktivasyonunun artması vasküler tonusu bozmakta, yüksek tansiyona neden olmakta ve makrovasküler hastalıklarının

gelişiminde rol oynayan aterosklerotik plak oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Aterosklerozun gelişimi ile damar duvarında kemokin, sitokin ve adezyon moleküllerinin yapımının arttığı yangı süreci başlamaktadır. Bu süreci sırasıyla trombosit aktivasyonu, LDL partiküllerinden türeyen okside lipit birikimi, monosit infiltrasyonu ve köpük hücre oluşumu takip etmektedir (76). Oluşan köpük hücreler immün sistem hücreleri harekete geçirmektedir. Makrofaj ve T hücre saldırısına uğrayan damar duvarında kaçınılmaz olarak kronik yangısal yanıt ve endotel hasarı oluşmaktadır. Sonuçta düz kas hücre proliferasyonu tetiklenmekte ve damar yapısı bozulmaktadır. Dengeleyici işlev kaybı damarlarda vazospazm, tromboz ve ateroskleroz oluşumunu tetiklemektedir. Hiperglisemiye kronik maruziyette endotel hücre işlev kaybı diyabet hastasında retinopati, nefropati, nöropati, akut koroner sendrom gibi çeşitli makro ve mikro immünovasküler hastalıklar gelişebilmektedir (77-80).

Diyabetlilerde görülen mikrovasküler hastalıkların patogenezi AGE ürünleri, polioliol yolağı aktivasyonu, sonrası hücreiçi ROS birikimi ile artan oksidatif stresle ilişkilendirilmiştir. Özellikle retinopati oluşumundaki mekanizmasının aşırı glikozun aldoz reduktaz enzimi ile reaksiyonu sonucu sorbitole dönüşerek hücrelerde birikmesi ve hücrede oksidatif stresin artması olduğu öne sürülmektedir (81).

### **ENDOTEL KORUYUCU GENLER ve ÜRÜNLERİYLE DRUG ÇALIŞMALARI**

Endotel hücrelerin uzun yıllar yüksek şeker ve/veya insülin konsantrasyonu ve mekanotransdüksiyona maruz kalmasına rağmen hastada belirtiler başladıktan sonra işlevini kısmen de olsa sürdürebilmesi bu hücrelerde koruyucu genetik bir düzenleme mekanizmanın var olabileceği fikrini doğurmuştur (82, 83). Söz konusu stres faktörlerinin endotel hücrelerde inflamatuvar yanıtını arttırırken aynı zamanda hücre koruyucu mekanizmaları da aktive ettiği gösterilmiştir. Endotel hücrelerinin stres karşısında A20, dört adet A1'ler (A1a, A1b, A1c ve A1d), HO-1, Bcl-2, Bcl-XL, KLF-2 (Kruppel like factor-2), sitokrom P450 1B1 (CYP1B1), DNMT1, HoxA5, Klf3 genlerini koruyucu genler olarak kullandığı bilinmektedir (82, 84-87). Sözü edilen genlerin aktivasyonunun transplantasyon sonrası endotel hücre aktivasyonunu azaltarak ksenograft rejeksiyonu uzatması önemli bir göstergedir (88, 89). *In vitro* çalışmalarda TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-  $\alpha$ ) sitokini aracılı apoptoz tetiklenmesi ardından endotel hücrelerin anti-apoptotik koruyucu genleri (damar koruyucu genler) ifade ettikleri gösterilmiştir (90-93).

Endotel hücrelerin diyabet kaynaklı strese karşı yangısal yanıtta NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa B*) sinyal yolağını tetiklemesi ve NF- $\kappa$ B transkripsiyon faktörü kilit rol üstlenmektedir

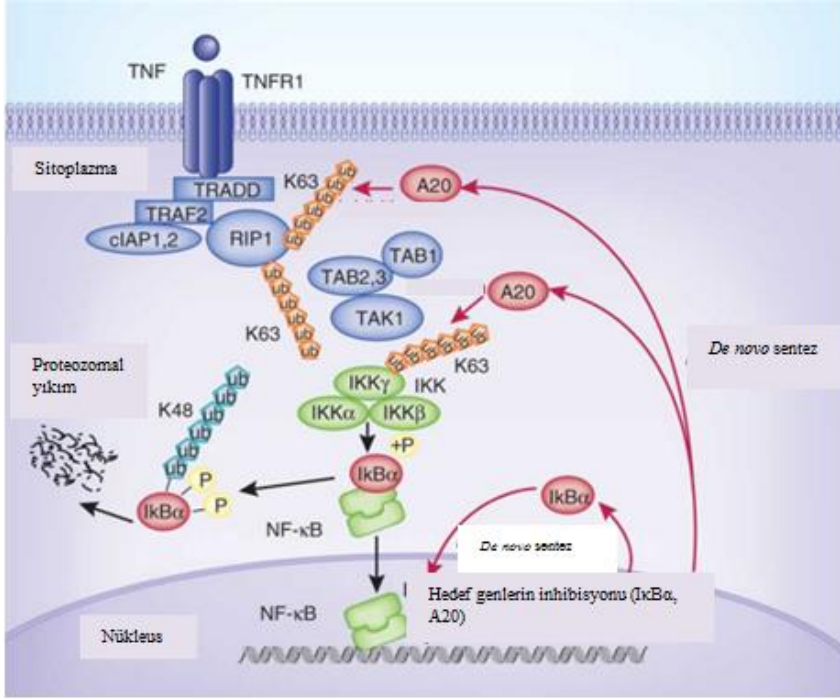
(94, 95). Aktive olan sinyal yolağı aynı anda hücresele strese karşı hem antiapoptotik genleri aktifleyerek yaşam yanıtını arttırmakta hem de sitokin, kemokin ve immünojenik moleküllerin ifadelenmesini de arttırarak yangısal yanıtı uyarabilmektedir. Çalışmalarda Bcl-2 gen ailesine mensup dört adet A1 geni, A20 (TNFAIP3) geni ve bir ısı şok proteini olan HO-1 (Hsp-32) geni dikkat çekenlerdir (96-98).

Endotel hücrelerde NF-κB sinyalleşme yolağındaki kontrolsüz aktifleşme ayrıca nörojeneratif hastalıklar, kanser, otoimmünite gibi diğer hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir (99).

NF-κB sinyal yolağı klasik (kanonikal) ve alternatif (kanonikal olmayan) iki farklı yolakla aktive olmaktadır. Proinflamatuvar sitokinlerle hücresele uyarıda NF-κB klasik yolak aktivasyonu, NEMO (NF-κB essential modulator) ve RIP1 (receptor-interacting protein1) proteinleri LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) ile ubiquitinlenerek aktive edilmektedir (100). NF-κB sinyalleşmesi A20 deubikitinasyon enzimleri ile inhibe edilmektedir. Alternatif yolak aktivasyonu lenfoid organogenez, B-hücre oluşumu ve olgunlaşması, dendritik hücre aktivasyonu ve kemik metabolizması ilişkilendirilmiştir (101).

A20 geni Rel gen ailesine mensup olup insanda 6q23 ve farede 10 A3 kromozomda lokalizedir. A20 geni hücrelerin yangı, immünite, hücrenin yaşamsal etkinliği gibi hayati yanıtlarını düzenleyen NF-κB ve benzeri kontrol genlerinin ifadelenmelerinde rol oynamaktadır (102). NF-κB sinyal yolağını baskılamaktadır. Hücresele aktivasyon olmayan durumlarda sitoplazmada inhibe halde durmakta, inflamatuvar sitokinler, toll benzeri reseptör uyarıları, toksisite gibi hücrelerin stimule edildiği durumlarda aktive olmaktadır.

A20 N-terminal ucunda deubikitinasyon fonksiyonu olan OTU (Ovarian Tumor Domaini) ve C-terminal ucunda 7 adet Cys<sub>2</sub>/Cys<sub>2</sub> çinko parmak motifleri içermektedir (103). A20 proteinin yapısındaki çinko parmaklar OTU domeynin ubikütinasyon ve deubikütinasyonu için kullanılmaktadır. A20 proteini NF-κB sinyal yolağını inhibe etmektedirler (Şekil 9).



**Şekil 9. TNF- $\alpha$  ile aktiflenen NF-  $\kappa$ B sinyalinin A20 proteini tarafından baskılanması**

TNF- $\alpha$  sitokininin hücre membranındaki TNFR1'e bağlanması birçok hayati hücrel etkinliğin gerçekleşmesinde rol oynayan NF-  $\kappa$ B sinyal yolağını aktiflemektedir. TNFR1 hemen altında TRADD, TRAF2, cIAP1,2 ve RIP1 kompleksi ile sinyali iletmektedir. K63 zinciri ile ubikitinlenmiş RIP proteininin sitozoldeki IKK kompleksinin yıkılmasına ve I $\kappa$ B $\alpha$  aktivasyonuna imkan vermektedir. Böylelikle NF-  $\kappa$ B'nin translokasyonu ile hedef genler transkripte olmaktadır. A20 proteini bu yolda K63 zincirleri deubikitine etmekte ve RIP1 aktivasyonunu baskılamaktadır. Böylelikle sinyal yolda daha aşağılara inmeden durdurulmaktadır. Bununla birlikte I $\kappa$ B $\alpha$  proteinini K48 zinciri ile poliubikitine ederek proteinin yıkılmasına neden olmaktadır. Sitozolda konsantrasyonu düşen I $\kappa$ B $\alpha$  NF-  $\kappa$ B sinyal yolağını baskılanmasını sağlayacaktır (104).

A20 proteini, TNF- $\alpha$  sitokininin TNFR1 reseptörüne bağlanmasıyla aktive olan NF-  $\kappa$ B ve kaspaz-8 sinyal yolağının öncüllerinden olan RIP1 regülör proteinine OTU domeyni bağlanmaktadır. A20 proteini yapısındaki OTU domeyni RIP1 proteinini deubikütine ederken çinko parmakları ile K48 poliubikütin zinciri ekleyerek proteozomal degregasyonu başlatmaktadır (105). Böylece, IL-1R ve TNFR sinyal yolağı üzerindeki;

1. NF- $\kappa$ B translokasyonu için elzem ana ubikütin ligaz olan TRAF6 (TNF Receptor-associated Factor 6)/ UBC13 (Ubiquitin- conjugating Enzyme 13), cIAP1 ve cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis 1, -2) ve UBC13 sinyal proteinleri deubikütine edilmekte (106);
2. TRAF2'nin (TNF Receptor-associated Factor-2) lizozomal degregasyonu ve TRADD (TNFR1 associated death domain)/RIP1 adaptör proteinlerinin bir araya gelmesi engellenerek sinyal inhibe edilmekte (107, 108);

3. TRAF2, cIAP1, -2 ve LUBAC kompleksinde LUBAC adaptör proteine lineer poliubikitin bağlayarak proteinin proteozomal yıkım ile sinyal yolağını baskılanmaktadır (105).

Dört adet A1'lerin genleri Bcl-2 gen ailesine mensup olup insanda 15q24.3, farede 9 E3.1 kromozomda lokalizedir. Hücre içi membran ilişkili Bcl-2 proteinine yüksek benzerlik göstermektedir. A1 proteinleri Bcl-2 ailesinde olduğu gibi korunmuş hücresel yaşam yanıtını arttıran BH1 ve BH2 domainleri taşımakta özellikle proteinin N-terminal ucu yüksek dizi homolojisi göstermektedir (109). A1 genleri pro-inflamatuvar sitokinler (TNF alfa, IL-1), granülosit-makrofaj uyarıcı faktör (GM-CSF), CD40 (cluster of differentiation), forbol ester gibi hücre dışı sinyal molekülleri ve yangıya yanıtta aktive olan NF- $\kappa$ B ile ifadenmektedir. NF- $\kappa$ B transkripsiyon faktörünün baskılanmasıyla TNF $\alpha$ 'ye karşı yanıtta mikrovasküler endotel hücrelerin apoptoza girdiği A1 genlerinin bu apoptozu 24 saatten fazla inhibe edebildiği gösterilmiştir (99). A1'ler mitokondride lokalizedir ve pro-apoptotik yolda mitokondrinin depolarizasyonu ile sitokrom c molekülünün mitokondriden salınmasını baskılayarak kaspaz 9, BID (BH3 interacting-domain death agonist) ve poli (ADP-riboz) aktivitelerini durdurmaktadır (98).

Hemoksijenaz (HO) enzimi mikrosomal bir enzim olup bir gen düzenleyici olan demir iyonu; bir antioksidan olan biliverdin; bir hem ligandı ve anti apoptotik vazodilatör olan karbon monoksitten (CO) oluşmaktadır (110). Enzim hemoglobin, sitokromlar, katalazlar gibi birçok proteinin yapısında bulunun hemin fizyolojik yıkımında görev almaktadır. Serbest hem hücresel oksidatif stresi arttırarak hücrenin yaşamsal belirtilerini baskılayabilmektedir. Ayrıca insülin üretimini ve glikoz metabolizmasını arttırmaktadır (111). Hemin katabolizması sonucu güçlü bir antioksidan olan biliverdin öncül molekülü bilirubin, CO ve demir açığa çıkmaktadır (112). Açığa çıkan ürünler (demir iyonları, CO ve biliverdin) immün yanıtın bastırılmasında, apoptoz ve oksidatif stresin yatıştırılmasında etkindir. Hemoksijenaz enzimi indüklenebilir form HO-1 ve temel form HO-2 olmak üzere iki izoforma sahiptir. HO-3 olarak tanımlanmış diğer bir form ise sadece farelerde bulunmaktadır ve HO-2 transkriptinden türetilmiş bir yalancı gendir (113).

HO-1, 32 kDa ağırlığında mikrosomal bir ısı şok proteinidir. Hücresel metabolizma ve yanıt düzenlenmesinde hücre koruyucu, proanjiojenik ve antiapoptotik işlev görmektedir. HO-1 geni Nrf2 (nuclearfactorerythroid 2-related factor) transkripsiyon faktörü ile ifadenmektedir. Endotel hücrelerde yüksek glikoza karşı savunmada antioksidan yanıt kaskadı Nrf2 transkripsiyon faktörünün aktive olmasıyla başlamaktadır (114). Nrf2 küçük

Maf proteini ile bağılı heterodimer yapıda, oksidatif ve elektrofilik stres yanıtında HO-1 enziminin de bulunduğu önemli detoksifikasyon enzimlerinin ifadelenmesinde regülatör görevi yapan ARE bağımlı cis-acting element bir transkripsiyon faktörüdür (115). Dinlenme halinde Nrf2 sitoplazmada Keap1 (Kelchlike ECH-associated protein-1) ve Keap1'in adaptör proteini Cul3-bağımlı E3 ubiquitin ligaz ile kompleks halde bulunmaktadır (116). Keap1, Nrf2 transkripsiyon faktörünün düzenleyici proteinidir ve hücrel stresin dengeleyicisi gibi çalışmaktadır. Normal koşullarda Keap-1 ve adaptör proteini olan E3 ubiquitin ligaz Nrf2'yi ubiquitininde rol almaktadır. Oksidatif ve elektrofilik stresin artması sonucu hücre sitoplazmasında yüksek konsantrasyona ulaşan reaktif metabolitler (ROS, elektrofilikler) Keap-1'e bağlanmaktadır. Bu bağlanma kompleksin yapısal değışime uğratmaktadır. Keap-1'in kompleksten ayrılarak Nrf2 transkripsiyon faktörünün nükleusa göç etmesini sağlamaktadır.

*In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda HO-1 enziminin endotel hücrelerde CO, bilirubin, süperoksit dismutaz, katalaz ve eNOS yapımını indükleyerek süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) konsantrasyonun azaltıp vasküler relaksasyonu arttırdığı gösterilmiştir (117, 118). Endotel hücrelerin sitokin kaynaklı (TNF- $\alpha$  ve seramid) proapoptotik kaspaz-3 sinyal yolağı aktivasyonu ile apoptoza sokulması sonrasında hücrelere HO-1 transfekte edilmiş ve hücrel canlılık artırılmıştır (119). Diyabet kaynaklı endotel hücre apoptozunda ise HO-1 aşırı üretiminin apoptoza karşı koruduğu saptanmıştır (61, 120-122). Yine aşırı glikozun glikasyon ürünleri olan AGE'ler endotel hücrelerde HO-1 ifadelenmesini arttırmaktadır (123).

Koruyucu genlerle yapılan genetik druglar ve gen terapi yöntemlerine çalışmaları gelecek için ümit vaat etmektedir (124-128). DM'e karşı gen terapisi koruyucu genlerin gen ürünlerinin ya da doğrudan genin hücreiçi transferi ile ön plandadır. Bunun yanında son yıllarda miRNA'lar yeni bir teröpatik ajan olarak ortaya çıkmaktadır.

miRNA'lar gen ifadesinin düzenlenmesinde rol alan 21-23 nükleotit uzunluğunda RNA zinciridir. mRNA'ları 3'UTR bölgelerindeki dizilerin tamamlayıcı dizilerine bağlanarak mRNA'yı translasyonel aşamada durdurmaktadır (129). Endotel koruyucu genlerle yapılabilecek genetik tedavide güçlü bir seçenektir.

Endotel hücre hasarına karşı endotel koruyucu gen çalışmaları HO-1 ve A20 genleri üzerine yoğunlaşmıştır. HO-1 transjenik fare DM modelinde HO-1 gen transferi ile hiperglisemi aracılı endotelyum hasarına karşı koruyuculuğu göstermiştir (118). Bunun yanında Tip I DM'de pankreatik beta hücrelerinin apoptozunun önlenmesine yönelik gen terapi ve genetik drug çalışmalarda da HO-1 ve A20 genleri öne çıkan genler arasında



görülmektedir (130-133).

HO-1 proteini oksidatif hasara karşı antioksidan ve endotel koruyucu bir proteindir. HO-1 proteinin diyabetteki vasküler komplikasyonlar ve endotel hücre hasarında koruyuculuğunu incelemek için yapılan çalışmada *Sprague-Dawley* sıçanlar insan HO-1 sense ve sıçan HO-1 antisense retroviral gen transferi ile transjenik hale getirilmiş ve streptozotolin ile Tip I DM modeli oluşturulmuştur (120). İnsan HO-1 sense ile aşırı miktarda HO-1 ifadeleyen, sıçan HO-1 antisense ile az miktarda HO-1 ifadeleyen ve kontrol grubu olmak üzere üç diyabetik grupta aortik HO aktivitesi, sirküleyondaki endotel hücre sayısı, üriner 8-epi-izoprostan  $PGF_{2\alpha}$  (8-Epi) seviyesi karşılaştırılmıştır. Aortik ve femoral arterlerin incelenmesiyle hipergliseminin vasküler HO aktivitesini azalttığı ve sirküleyondaki endotel hücre sayısını arttırdığı bulunmuştur. HO-1 geni az ifadelendiği ve diyabetik kontrol gruplarında  $O_2$  oluşumunun, sirküleyondaki endotel hücre sayısının ve 8-Epi seviyesinin arttığı buna karşın HO-1 geninin aşırı ifadelendiği grupta ise tüm parametrelerin azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar HO-1 geninin ya da gen ürünlerinin gen terapi ile diyabetik bireylerde uygulanması halinde diyabetteki vasküler komplikasyonlar açısından profilaktik olabileceğini düşündürmektedir.

İnsülin bağımlı Tip I DM beta hücrelerinin yıkılmasıyla karakterizedir ve bu hücrelerin apoptozunda sitokin aracılı NF- $\kappa$ B aktivasyonu rol oynamaktadır. Sıçan ve insan beta hücrelerinin *in vitro* IL-1 $\beta$  ve IFN- $\gamma$  sitokinleriyle indüklenmiş NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve apoptozunda A20 geninin bir inhibitör olup olmadığı araştırılmıştır (131). Buna göre A20 geninin transfekte edildiği hücre modellerinde transfeksiyon yapılmayan hücre modellerine göre antiapoptotik ve yangıya karşı yanıtın arttığı ve hücrelerde A20 geninin dolaylı olarak hücre koruyucu etkinliğe sahip NO'nun salınımını düzenlediği bulunmuştur. A20 geninin özellikle T hücre bağımlı beta hücre yıkımı ve transplantasyon sonrası komplikasyonlara karşı gene terapi çalışmalarında önemli bir aday olduğu öne sürülebilmektedir.

A20 proteinin yüksek glikozla zehirlenmiş endotel hücrelerde apoptotik ve yangısal yanıtı etkileri gösterebilmek için A20 geni ile transfekte HUVEC hücreleri ile transfeksiyon yapılmayan HUVEC hücreleri karşılaştırılmıştır (134). 2-24 saat yüksek glikoza maruz bırakılan hücrelerin apoptoza karşı yanıtı florasan mikroskopi ile incelendiğinde ilk grup hücrelerinin apoptoza direnç gösterdiği bulunmuştur. NF- $\kappa$ B ifadesinin artmasına rağmen birinci grup hücrelerde P selektin ifadesinin ikinci grup hücrelerine göre daha az ifade ettikleri saptanmıştır. Bu durum A20 proteininin DM lezyonlarının durdurulması için uygun bir drug olabileceğini düşündürmektedir.

Son dönemde HO-1 geni ile yapılan drug çalışmaları faz-2 seviyesinde sürdürülmektedir. A20 ve A1'ler genlerine yönelik klinik araştırmalar hali hazırda bulunmamaktadır.



## **GEREÇ VE YÖNTEMLER**

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2012-2015 yılları arasında TÜBAP 2012/72 numaralı proje olarak malzeme satın alımı için desteklenmiştir ve araştırmacı öğrencinin harcamaları kendi öz fonu ile karşılanmıştır. (Ek 2). Çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında yapılmıştır.

Gereç ve yöntemler aşağıdaki sırada sunulmuştur

- 1- Çalışmanın süreçlendirilmesi
- 2- Biyobilişim çalışmaları (gen yapıları, primer tasarımları, miRNA tahmini)
- 3- Çalışma modeli kurulması (endotel hücre kültürü, endotel hücre genomunda PZR ile gen saptama, diyabet stresli endotel hücreyi adezyon testi- IFA- dot blot ile belirleme)
- 4- Diyabet stresli endotel hücrenin mononükleer hücre yapıştırma yanıtını ölçme (adezyon testi)
- 5- Diyabet stresli endotel hücrenin koruyucu gen mRNA ifade yanıtını ölçme (RT-PZR ile ifade kinetiği ve seviye ölçme, qRT-PZR ile ifade seviyesi ölçme)

### **ÇALIŞMANIN SÜREÇLENDİRİLMESİ**

Çalışmanın süreçlendirilmesi Tablo 2'de gösterilmiştir. Buradaki hücre kültürü çalışmalarına Kasım 2013-Mayıs 2015 tarihleri arasında kesintisiz devam edildi.

Tablo 2. Çalışmanın süreçlendirilmesi

Tarih	Ağustos 2011- Ocak 2012	Şubat 2012	Mart- Haziran 2012	Haziran- Ağustos 2012	Doğum izni	Kasım 2013- Ocak 2014	Şubat- Haziran 2014	Temmuz -Ekim 2014	Kasım 2014- Ocak 2015	Şubat- Haziran 2015	Haziran 2015- Nisan 2016
Gen yapıları çalışması	X	X			-						
Literatür araştırması	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	
Proje yazımı	X	X									
Hücre temini	X				-	X					
Hücre kültürü		X	X	X	-	X	X	X	X	X	
miRNA tahmini			X		-						
Adezyon deneyi			X		-					X	
PZR					-	X					
RT-PZR					-		X	X	X	X	
qRT-PZR					-		X	X	X	X	
Tez yazımı					-		X	X	X	X	X

## **A1'ler, A20 VE HO-1 GEN YAPILARI, PRİMERLERİ VE miRNA'LARI İÇİN YAPILAN BİYOBİLİŞİM ÇALIŞMALARI**

### **Gen Yapıları**

A1'ler, HO-1 ve A20 gen fare dizileri gen veri tabanından toplandı (135,136). Genlerin kromozomdaki yeri, ekzon, intron ve ifade olunan CDS (Identification of Coding Sequences) bölgeleri belirlendi.

Dört adet A1 geninin aynı kromozom üzerinde art arda pozisyonda A1a, A1b, A1c ve A1d şeklinde yan yana bulunduğu ve birbirleriyle %99 homoloji göstermekte olduğu görüldü. Primerle çifti ile bu genleri birbirlerinde ayırt etmek mümkün olmadığından ve ayırt edilmeleri bu çalışmanın kapsamında bulunmadığından dört gen birlikte ortak primer çifti ile saptandı. Bu sebeple tezde “A1'ler” denilerek dört gen bir arada kastedilmektedir.

### **Polimer Zincir Reaksiyonu ve Gerçek Zamanlı PZR için Primer Tasarımı**

Primerlerin tasarımı uzaktan kumandalı Primer-blast isimli program aracını kullanmak üzere ilgili sörvıra programatik erişimle ulaşıldı (137, 138). Her bir gene ait polimer zincir reaksiyonu (PZR) ve gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu (qRT-PZR) için 50 adet primer çifti Tablo 3'de gösterilen seçenekler işaretlenerek elde edildi.

**Tablo 3. Primer tasarlama kriterleri**

<b>Programa Özgü Olası Primer Çifti Seçim Kriterleri</b>	<b>Seçilen Kriter</b>
PZR ürünü uzunluğu	PZR: 400-1000 bp arasında olmalı qRT-PZR: 150-250 bp arasında olmalı
Erime noktası	A1'ler ve HO-1 genleri için: 55C°-61 C° A20 geni için: 57C°-63 C° arasında olmalı
Primer çiftleri arasındaki erime noktası farkı	En fazla 3 C° olmalı
Primer çiftlerinin tüm fare genomuna karşı taranması	Evet
Programın önerdiği primerlerin hedeflenmeyen gen bölgesi dizileriyle uyumu	En fazla 4 bazlık uyum göstermeli
Programın önerdiği primerlerin 3'ucundaki son 6 nükleotidinin hedeflenmeyen gen bölgesi dizileriyle uyumu	En çok 3 tanesi uyum gösterebilir
Olası ürünlerde ekzon-ekzon sınırı	PZR: Yok qRT-PZR: Var
Hedeflenmeyen gen bölgelerine ait olası PZR ürünleri uzunlukları	4000 baza kadar çoğalan tüm olası PZR ürünlerini göstermeli

**PZR:** Polimer zincir reaksiyonu; **qRT-PZR:** Gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu

Tablonun sol sütununda primer bulma motorunda kullanılan ve primer seçim kriterleri, sağ sütununda ise primer seçim kriter özellikleri yer almaktadır.

Önerilen 50 çift primerden şu kriterler öncelik sırasında göre kullanılarak uygun olanlar seçildi:

1. Elektroforez sonrası jel üzerinde hedeflenemeyen dizilerden kolaylıkla ayırt edilebilecek PZR ürün uzunluğu olmalıdır
2. Erime noktaları istenilene çok yakın olmalıdır
3. Primerlerin 5' ve özellikle 3'uçta içerdikleri GC sayıları yüksek olmalıdır
4. Primerlerin 3'ucunun kendi kendine yapışma derecesi düşük olmalıdır

5. GC oranları görece yüksek olmalıdır

Geliştirilen ve tezde kullanılan primerler aşağıdaki Tablo 7’de verilmiştir.

### **miRNA Tahmini**

*Mus musculus* türüne ait A1’ler, A20 ve HO-1 gen ifadelerinin düzenlenmelerinde yer alan olası miRNA dizileri veri tabanından toplandı (139-142). Bunun için ilgili genlerin nükleotid veri bankasından indirilen mRNA dizileri (135, 136) üzerindeki 3’UTR bölgeleri arama dizisi olarak kullanıldı, ilgili genlere özgü miRNAlar saptandı.

## **ÇALIŞMA MODELİ İÇİN *IN VITRO* ENDOTEL HÜCRE KÜLTÜRÜ**

### **Hücreler**

Hücre kültürü çalışmalarında *Mus musculus* türüne ait dört hücre hattı kullanılmıştır. Bunlar, gromelüler endotel hücre (GENC) hattı, murin aortik endotel hücre (MAE) hattı, EL-4 CD4+ T lenfosit hücre hattı ve RAW 264.7 monosit/makrofaj hücre hatlarıdır. GENC ve MAE hücre hatları Doç. Dr. Neşe Akış Sansa tarafından, EL-4 T lenfosit hücre hattı Doç. Dr. Batu Erman (Sabancı Üniversitesi) tarafından ve RAW 264.7 hücre hattı Prof. Dr. Ümit Bağrıaçık (Gazi Üniversitesi) tarafından hediye edilmiştir. Hücre hatları sıvı azot içinde %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren dana serumu içinde saklanmıştır. Ayrıca yüksek glikozla endotel hücre aktivasyonunu inceleme ön çalışmasında araştırmacı kendine ait heparinize kandan izole ettiği lökositlerini kullanmıştır.

Hücrelerin deneylerde kullanımı şöyle gerçekleşmiştir: İlgili genler MAE ve GENC endotel hücrelerinde PZR ile aranmıştır. Endotel hücre aktivasyon koşulu, MAE endotel hücrelerinde kan lökosit ve RAW 264.7 monosit hattı kullanılarak belirlenmiştir. Adezyon profillemeye testleri RAW 264.7 monositlere ilaveten EL-4 T lenfosit mononükleer hücrelerinin GENC endotel hücreye yapışmasını incelemek üzere yapılmıştır. Burada MAE için saptanan aktivasyon koşullarının GENC’e uygulanabilirliği önceden belirlenmiştir. İlgili gen mRNA’ları aktiflenmiş MAE ve GENC hücrelerinde RT-PZR ile aranmış ve qRT-PZR ile GENC hücresinde profillenmiştir.

Aktivasyon deneylerinde lize edilerek kullanılan *Escherichia coli* (*E. coli*) hücreleri Trakya Üniversitesi Merkez Laboratuvarından temin edilerek çoğaltılmıştır.

### **Hücre Açılması ve Kültür**

Sıvı azot içinde donmuş hücre süspansiyonu 37 °C'de 1 dakika içinde eritildi ve 10 kat hacimde tüpte %10 fetal dana serumu (FCS) (12483020 Gibco, Invitrogen, ABD) ve 5,5 mM D-glikoz içeren “Dulbecco’s Modified Eagles’s Medium” (DMEM) (11885-084, Invitrogen, ABD) antibiyotiksiz besiyerine eklendi. 400 g'de santrifüj edildi. Yıkama genellikle bir kez daha tekrarlandı ve aynı besiyerine %30-35 kalabalık yapacak şekilde ekildi. Kültür 37 °C'de %10 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren kültür şartlarında yapıldı. Kültürün kalite kontrolü ve kontaminasyon varlığı gözlenerek yapıldı. Çalışma materyalinin canlılığı ve büyümesi morfolojik ve fizyolojik kriterler dahilinde günlük izleme periyotlarında takip edilmiştir. Kriterlerimize göre morfolojik açıdan parlak, sınırları belirgin, hücre-hücre bağlantısı kurabilen, yapışan hücreler için 5-7 gün içinde tam tabaka yapabilen, süspansiyon hücreler için çoğalan ve kümeleşebilen hücrelerin sağlıklı biçimde ürettiği kabul edilmiştir. Kalite kontrol açısından bir diğer kriter de besiyerinin gelincik kırmızısı rengini koruması ve şeffaflığı kaybetmemesidir.

### **Pasaj ve Adaptasyon**

%80-90 tabaka yapan MAE ve GENC hücreleri tripsin (T6567, Sigma, Almanya) çözeltisi (Ek 2) ile tripsinize edildi. Bunun için kültür şişeleri 5 ml PBS (Ek 2) ile yıkandı. 1ml tripsin eklendikten sonra hücreler 37 °C'de etüvde 2 dakika inkübe edildi. Tripsinin inaktivasyonu için şişelere 7 ml besiyeri eklendi, karıştırıldı ve süspansiyon hücreler 15 ml'lik tüpte toplandı, 400 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Besiyeri uzaklaştırıldı, tüpe 10 ml besiyeri eklendi ve hücreler süspansiyon edildi. Hücreler 1/7-1/10 oranında seyreltilerek yeni 25 cm<sup>2</sup> kültür şişelerine ekildi.

EL-4 ve RAW 264.7 hücreleri %60 oranında kalabalıklaştıklarında kazıyıcı yardımıyla kazındı ve toplanarak 400 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Besiyeri uzaklaştırıldı ve 10 ml besiyeri içinde hücreler süspansiyon edildi. Hücreler 1/10 oranda 25 cm<sup>2</sup> kültür şişelerine yeniden ekildi.

Dondurulmuş halden yeni açılan hücrelerin kültüre adaptasyonunda en az iki pasaj beklendi. İlk veya 2nci kültürden sonra besiyerine 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin eklenmeye başlandı.

EL-4 ve RAW 264.7 hücrelerinin orijinal %10 RPMI besiyerinden %10 DMEM besiyerine adaptasyonu kademeli olarak her seferinde 1/4 oranında RPMI'ın DMEM ile yer değiştirmesiyle sağlandı. DMEM besiyerine tam adaptasyonu için bir ek pasaj daha beklendi.



### **Kryoprezervasyon**

Tripsinize edilen ve/veya kazıyıcı ile kazınan hücreler 7 ml besiyeri ile 400 g'de 5 dakika soğukta santrifüjlendi. Besiyeri uzaklaştırıldı. Her bir hücre hattı 900 µl besiyerinde süspansiyon edildi, hızlıca 100 µl DMSO (D2650, Sigma, Almanya) eklenerek karıştırıldı ve -20 °C'de 4 saat ve bir gece -80 °C'de kalan hücreler ertesi gün sıvı azot tankına konuldu. Benzer işlem süspansiyon hücrelere de uygulandı.

### **Kültür Ortam Optimizasyonu**

Endotel hücrelerinin %2, %5 ve %10 CO<sub>2</sub> karbondioksitli etüvde ve ayrıca karbondioksitsiz etüvde oksijeni yakarak minimize edilmiş kapalı ortamda kültür verimliliği incelendi. Besiyeri formülasyonunun sebep olacağı osmolitenin hücrelere etkisi değişik besiyerleri kullanılarak incelendi. Besiyerinde 25 mM HEPES ve/veya %7,5'lik NaHCO<sub>3</sub>'den %10 ilavesinin pH stabilizasyonuna etkisi takip edildi.

## **ÇALIŞMA MODELİNDE KULLANILACAK *in vitro* ENDOTEL HÜCRE GENOMUNDA A1'LER, A20 VE HO-1 GENLERİNİN PZR İLE ARANMASI**

### **DNA İzolasyonu**

Tripsinize edilen MAE ve GENC hücrelerden High Pure PCR Template Preparation Kit (11796828001, Roche, İsviçre) kullanılarak prospektüsünde önerildiği gibi DNA izolasyonu yapıldı. Bunun için hücreler 200 µl PBS ile resüspanse edildi, 200 µl bağlanma tamponu ve 50 µl proteinaz K eklendi, hızlıca pipetle karıştırıldı. Karışım 30 dakika 65 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 100 µl izopropanol eklendi, vorteks yardımıyla karıştırıldı. Kit içeriğinde bulunan nükleik asit bağlama kolonu ve toplama tüpü birleştirildi ve örnek kolona yüklendi, 1 dakika 8000 g'de mikrosantrifüj ile santrifüjlendi, alt sıvıyı içeren toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir tüpe aktarıldı. Kolona 500 µl inhibitor removal tamponu eklendi, 1 dakika 8000 g'de santrifüjlendi, toplama tüpü değiştirildi, 500 µl yıkama tamponu kolona eklendi, 1 dakika 8000 g'de santrifüjlendi, toplama tüpü değiştirildi, kolon 13000 g'de 10 saniye santrifüjlenerek yarı-ıslak kurutuldu. 70 °C'ye ısıtılmış 200 µl elüsyon tamponu kolona eklendi, 1 dakika 8000 g'de santrifüjlenerek nükleik asitler kolondan söküldü ve tüpte toplandı. Buz üzerindeki DNA örneklerinin spektrofotometre ile saflık ve miktar tayini yapılarak -20 °C'de saklandı.

### **Nükleik Asit Miktar ve Saflık Tayini**

Bu çalışmanın başlangıcında 6 adet klasik spektrometre (Ek 3A) ve 2 adet nanodrop spektrofotometre cihazlarının performansı, optik dansitesi 0,100 ve 1,100 arasına ayarlanmış örnekler kullanılarak karşılaştırıldı. Bu tezde cihaz eki listesinde belirtilen klasik spektrofotometrenin kullanılmasına karar verildi.

Ölçümden önce kuvartz küvet 1 kez %70'lik etanol çözeltisi ile ve üç kez de distile su ile yıkandı. RNA örneklerin saflık ve tayini için 100 µl hacimli kuvartz küvet (105.201, Hellma, Almanya) kullanıldı. Spektrofotometre her bir absorbans değeri için önce kör okuma ile normalize edilmiştir. Miktar tayininde, elüsyon tamponu ile 1/10 seyreltilmiş örnek, elüsyon tamponuna karşı 260 nm ve 280 nm UV dalga boylarında 3 kez okundu ve alınan ortalamalar kullanıldı. Konsantrasyonun saptanması için 260 nm dalga boyunda okunan absorbans değeri aşağıdaki formülde kullanıldı:

Örneklerinin saflığı 260 nm'deki absorbans değerinin 280 nm'deki absorbans değerine oranı ile saptandı. A260/A280 oranının DNA için 1,8 olması örneğin saf olduğunu, 1,8'in altında olması protein kontaminasyonunun, 1,8'in üstünde olması RNA varlığını gösterdi. A260/A280 oranının RNA için 2 olması örneğin saf olduğunu, 2'in altında olması protein kontaminasyonunun, 2'in üstünde olması DNA varlığını gösterdi (143).

### **PZR ve Agaroz Elektroforezi**

A1'ler, A20 ve HO-1 genlerinin GENC ve MAE hücre genomlarında varlığı polimer zincir reaksiyonu yöntemi ile arandı. 100 nanogram (ng) DNA örneği, 5 µl 10X PZR tamponu (A1003, Biomatik, ABD), 0,4 µl dNTP (U1511, Promega, ABD), 25 (pmol/µl) ileri primer, 25 (pmol/µl) geri primer, 2,5 (µM/µl) MgCl<sub>2</sub> (A1003, Biomatik, ABD), 5 (ünite/µl) taq polimeraz (A1003, Biomatik, ABD) ve 33 µl distile su ile karıştırıldı. Kullanılan primerler Tablo 7'de gösterilmektedir. PCR profili 94°C'de 3 dakika, 25 döngü; 94°C'de 45 dakika, primerlerin erime noktasında 45 saniye, 72°C'de 90 saniye ve son döngü 72°C'de 10 dakika olarak uygulandı. Elektroforezde kullanılacak agaroz jel 100 ml Tris-borat-EDTA (TBE) (B52, Thermo Scientific, ABD) (pH=8,3) tamponu içinde %1,5 (ağırlık/hacim) agaroz (A9539, Sigma, Almanya) olacak şekilde mikrodalga fırınında (Ek 3A) ısıtılarak hazırlandı. Jel yaklaşık 50-60°C'ye geldiğinde 12 µl etidyum bromür (17896, Thermo Scientific, ABD) eklendi, karıştırıldı ve kasete döküldü, jel elektroforez tarağı yerleştirildi. Jelin döküleceği kaset önceden %70'lik etanol çözeltisi ile silindi ve yere paralelliği su saati ile sağlandı. Oda sıcaklığında polimerleşen jel kasetle birlikte içinde TBE tamponu bulunan elektroforez tankına (Ek 3A) yerleştirildi ve tarak jelden çıkarıldı. Elektroforez sistemi güç kaynağına (Ek

3A) bağlandı ve sistem önce boş olarak 5 dakika 10 mV/mm yürütüldü. Jel yükleme haritası oluşturuldu ve buna göre kuyulara 8-10 mikrogram ( $\mu\text{g}$ ) PZR örneği 1:6 oranında yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi. Kuyucuklarından en az birine bant ağırlıkları belli olan molekül ağırlık belirteci, üretici firmanın talimatlarına uyularak aktarıldı. Elektroforez 100 mV ve 400 mA akım ile başlatıldı. Elektroforez boyunca akımın sabit tutulması sağlandı. Örneklerin yürümesi takip boyasıyla takip edildi. Takip boyası jelin 2 cm ucuna yaklaştığında elektroforez sonlandırıldı. Jel üzerinde A1'ler, A20 ve HO-1 genlerine ait bantlar UV ışığı altında translüminatörde (Ek 3A) görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

### **DNA İzolasyonu ve PZR için Optimizasyon Ön Çalışmaları**

Purelink DNA Isolation Kit (K182000, Invitrogen, ABD) prospektüsü kullanılarak DNA izolasyon optimizasyonu yapıldı. Çalışma sonucunda yıkama çözelti miktarının %30 arttırılmasının, yıkama sayısının iki katına çıkarılmasının, spektrometrik ölçümlerin farklı spektrofotometrelerle kıyaslayarak yapılmasının, farklı izolasyon kitlerinin denenmesinin, çoklu inkübasyon süre ve sıcaklıklarının denenmesinin en verimli şartı bulmada gerekli olduğu anlaşıldı. Protein yıkım basamağı için 65 °C'de 20 dakika inkübasyon yapıldı. PZR optimizasyon çalışmaları sonucunda jeldeki A20 ve A1'ler gen bölgelerine ait özgül olmayan bantların eliminasyonu için primer konsantrasyonu 50 pmol/ $\mu\text{l}$ 'den 25 pmol/ $\mu\text{l}$ 'ye indirilmesinin, A1'ler genleri için primerin değiştirilmesinin uygun olduğu saptandı. PZR sonrasında yapılacak agaroz jel elektroforezinde, aradığımız gen dışında istenmeyen başka genlerin PZR ürünlerinin verebileceği bantların jelde gözükmesi  $\text{MgCl}_2$  ve primer konsantrasyonlarının ayarlanması, uzama ve polimerizasyon safhalarında döngü sürelerinin hızlandırılması optimizasyonları çalışmaları ile engellendi.

### **ÇALIŞMA MODELİNDEKİ "DİYABET STRESİNE YANIT VEREN ENDOTEL HÜCRE" ORTAMININ BELİRLENMESİ**

#### **Lökosit İzolasyonu**

PBS'de çözülmüş %2'lik Fikol-400'ün (F4375, Sigma, Almanya) 10:1 oranında meglumin ile veya PBS'de çözülmüş %2,6'lık nişastanın 10:8 oranında meglumin ile 1,077 g/ml yoğunluk sağlayan optimize faz ayırıcı karışım lökositlerin eritrositlerden ayırımında kullanıldı. Faz ayırıcı karışım üzerine yarı hacimde PBS ile yarı yarıya seyreltilmiş araştırmacının kendi heparinize kanı yayıldı. 25 dakika 350 g'de santrifügasyon ardından lökosit

içeren beyaz *buffy coat* toplandı, lökositler PBS ile 2 kez yıkanarak canlılıkları mikroskop altında trifen mavisi ile doğrulanıp kültüre alındı.

### **Pozitif Kontrol Lizatı Hazırlama**

*E. coli* hücreleri *Luria broth* (LB sıvı besiyeri) (Ek 2) besiyerine ekildi. 37°C'de çalkalayıcı su banyosunda gece boyu kültür edilmiştir. Ertesi gün 400 g'de, 5 dakika santrifüj edildi ve 10 ml çökelti 10 ml çökelti 25 ml PBS'de buz içinde 1 saniyelik 3 torluk vurgu 3 kez tekrar edilerek bakteriler homojenize edildi. Üst sıvı 13.000 g'de toplanıp porsiyonlanarak -20°C'de stoklandı.

### **Süspanse Hücre Sayımı**

RAW 264.7 hücreleri kazıyıcı ile kazındı ve 1/10 oranında % 4'lük trifen mavisi çözeltisi ile karıştırılarak 5 dakika boyandı, *Neubauer* kamarasına yüklendi, ışık mikroskobu (Ek 3A) altında 10 saha sayıldı ve ortalaması alındı.

### **Endotel Hücreyi Tip I DM Stresiyle Aktive Eden Glikoz Konsantrasyonunun Adezyon Testi ile Belirlenmesi**

6 çukurlu mikro kültür plağında %50-60 tabakalaşan MAE hücreleri 5 mM normal glikozu veya 33 mM yüksek glikozu (Tip I DM modeli) temsil eden konsantrasyonlarla taze besiyerinde 3 gün inkübe edildi. Normal besiyerinde %65 ve yüksek şekerli besiyerinde %85 tabakalaşan hücreler üzerine insan lökositlerinden 30.000 adet eklendi ve 4 saat kokültür yapıldı. Kokültür sonrası çukurlar soğuk PBS ile üç kez yıkandı, 20 dakika -20°C'de saklanmış soğuk %2'lik (ağırlık/hacim) paraformaldehit (Ek 2) çözeltisi ile oda ısısında fiske edildi. Fiksasyon sonrasında 10 dakika oda sıcaklığında Mayer'in hematoksileni ile boyandı, yıkandı, benzer endotel tabaka içeren rastgele 10 sahada yapışan lökosit sayısı invert mikroskop altında 20X objektifle sayıldı. Her bir lamelden elde edilen sayıların ortalaması alındı. Aktive edilmeyen endotel hücrelere lökosit yapışma sayıları, bulguların normalizasyonu için kullanıldı. Deney bulguları birbirinden bağımsız deneylerle doğrulandı.

Deney test modelinde kullanılacak RAW 264.7 monosit/makrofaj hücre hattı ile uygulanabilirliği açısından incelendi. Bunun için 24 çukurlu mikropłaktaki MAE hücre tabakası taze besiyerinde 3 gün inkübe edildi ve besiyerleri her 12 saatte bir yenilendi. Eş zamanlı olarak RAW 264.7 hücreleri de ayrı kültür şişelerine ekildi ve kültür edildi. Üç gün sonra tabaka yapısı %90-100 saptanan MAE hücrelerinin besiyeri, içinde RAW 264.7 hücrelerinden 40.000 adet içeren besiyeri ile sahaya eşit dağılım sağlayacak manipölasyonla

değiştirildi. Ayrıca (+) kontrol olarak kullanılacak çukurdaki tabakaya 50µl *E.coli* lizati eklendi. Hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem kültür şartlarında 3 saat kokültüre edildi. Kokültür sonrası çukurlar nazikçe 26°C'deki 1 kez PBS ile yıkandı, 20 dakika -20°C'de saklanmış soğuk %2'lik (ağırlık/hacim) paraformaldehit çözeltisi ile oda ısısında fiske edildi. Fiksasyon sonrasında çukurlar 1 kez PBS ile baş aşağı çevrilerek yıkandı. 25 dakika Wright boyası ile boyandı. Sonrasında çukurlar 1 kez PBS ile yıkandı, nemli halde iken invert mikroskopla 10X objektif altında 10x10 oküler mikrometre yardımıyla tüm saha incelenerek değerlendirildi. Endotel tabakalanmanın %90-100 olduğu bölgeler incelendiğinde çukurun merkezi ve periferinde farklı ama tutarlı lökosit dağılımı olduğu görüldü. 5'i perifer ve 5'i merkezde rastgele 10 alan sayıldı. Bölgesel alan sayılarının tutarlılığı izlendikten sonra her bölgenin sayılarının aritmetik ortalaması bulundu. Aktive edilmeyen endotel hücrelere RAW 264.7 hücrelerin yapışma sayıları aktive edilmişlerinkinden çıkartılarak bulguların normalizasyonu yapıldı. Deney bulguları birbirinden bağımsız iki deneyle doğrulandı.

### **Endotel Hücreyi Tip II DM Stresiyle Aktive Eden İnsülin Konsantrasyonunu Belirlenmesi**

Endotel hücreyi aktive eden insülin miktarının belirlenmesi için ilgili literatür (145-149) ve önceki çalışmalarımızdan elde edilen Bilgiler (150) doğrultusunda endotel hücre tabakası 10-1.200.000 uIU/ml arası değişik insülin konsantrasyonlarına maruz bırakılarak optimum konsantrasyon araştırılmıştır. Deneylerde besiyerine insülin degradasyonunu engellemek üzere 50 pmol proteaz inhibitör kokteyli eklendi.

**1- Lökosit adezyon testi ile belirleme:** 6 çukurlu plakalardaki lamellere ekilen MAE p35 hücreleri %2 CO<sub>2</sub>, 37°C ve %95 nem kültür şartlarında %10 FCS 5,5 mM D-glikoz içeren DMEM içinde %60 tabakalaştıktan sonra 10, 100, 1000, 2500, 10.000, 25.000, 100.000, 300.000 ve 1.200.000 µIU/ml domuz insülini (I 5523, Sigma, Almanya) ile 48 saat kültürde muamele edildi. RAW 264,7 monosit hücreler her bir çukura 30.000 eklenmiştir. 4 saat kültür sonrası kokültür lamelleri buz üzerinde %2'lik paraformaldehitte 20 dakika fikse edilmiş, 3 kez yıkandı, 10 dakika oda sıcaklığında Mayer'in hematoksileni ile boyandı ve invert mikroskop altında 20X objektifle yapışan lökositler 10 sahada sayıldı. Sayıların ortalaması alınarak karşılaştırma yapıldı.

**2- İndirekt immün floresans mikroskopi yöntemi ile CD62e ifadesi belirleme:** Test plağında lameller üzerinde kültüre edilen endotel tabakası PBS ile yıkandıktan sonra -20°C'de asetonla 5 dakika fikse edilip %2'lik BSA (A 2153, Sigma, Almanya) ile oda ısısında doyuruldu, 1/20 seyreltilmiş biyotin işaretli anti- fare CD62e (553750, Pharmingen, ABD) antikoru ile 90 dakika oda sıcaklığında boyandı, yıkandı, 90 dakika oda sıcaklığında 1/20 seyreltilmiş avidin-FITC ile inkübe edildi, her biri 5 dakika olmak üzere 6 kez yıkandı, mounting medyumla ve lamelle kapatılıp boyanan yüzeyler floresans mikroskopunda değerlendirildi.

**3- Dot-blot yöntemi ile IL-6 ifadesini belirleme:** Bir üst bölümdeki deneyde anlatıldığı gibi MAE hücreleri değişik konsantrasyonlarda insülinle muamele sonrası kültür üst sıvıları toplandı ve -80°C'de saklandı. Çoklu set hazırlanan nitrosellüloz membranda işaretlenen noktalardan her birine bu kültür üst sıvılarından her seferine 20 ul olmak üzere toplam 100 ul besiyeri yedirildi ve membranlar kurumaya bırakıldı. Membran setleri %4'lük BSA ile bloklandı, 1/20 seyreltilmiş biyotin işaretli tavşan anti-fare IL-6 antikoru (Biosource KMC-0061, ABD) ile 60 dakika oda sıcaklığında boyandı, yıkandı ve her bir set 1/100 seyreltilmiş streptavidin-AP, 1/100 seyreltilmiş anti-tavşan HRP, 1/100 seyreltilmiş avidin-FITC veya 1/150 seyreltilmiş streptavidin-teksas kırmızısı konjugelerinden biriyle boyandı, her biri 5 dakika olmak üzere 6 kez yıkandı. AP konjugatla boyanan set pNPP substratı ile ve HRP konjugatla boyanan set DAP ile renklendirilerek boyanmalar değerlendirildi. Floresans işaretli konjugatla boyanan setler mikroskop altında değerlendirildi.

## **FARKLI DİYABET STRESLERİNE KARŞI ENDOTEL HÜCRENİN MONONÜKLEER HÜCRELERİ BAĞLAMA YANITLARININ ARANMASI**

Adezyon profillemeye çalışması GENC endotel hücrenin farklı diyabetik stres koşullarında farklı mononükleer lökositleri farklı adeze etme kapasitesini anlamak için yapıldı. MAE için saptanan yüksek şeker ve insülin konsantrasyonunun GENC hücrelerinin de aktivasyonunu sağladığı ön çalışmalarda doğrulandı.

### **$\mu\text{m}^2$ Endotel Tabakada Endotel Hücre Sayısının Hesaplanması**

GENC hücreleri 24 çukurlu ve her biri 1,9 cm<sup>2</sup> alanında olan mikroplak çukuruna ekildi, tek tabaka oluştuğunda PBS ile 2 kez soyulmaya karşı nazikçe ve mikroskop altında izlenerek yıkandı, ve üzerine 2 ml % 4'lük trifan mavisi (Ek 2) eklendi, 20 dakika boyandı, 5

ml PBS ile 2 kez yıkandı. Islak çukurlardaki hücreler 10 sahada invert mikroskop (Ek 3A) 10X büyütmeli objektifte altında, 10X10 oküler mikrometre ile sayıldı. 10 sahaya ait verilerin ortalaması alındı ve 100  $\mu\text{m}^2$ 'deki hücre sayısı bulundu.

### **Endotel Hücreye Yapışan Mononükleer Hücre Sayısının Adezyon Testi ile Belirlenmesi**

24 çukurlu kültür mikroplağın çukurları fibronektin ile kaplandı. Her bir çukura GENC hücresi ekildi, kültür edildi. Eş zamanlı olarak EL-4 ve RAW 264.7 hücreleri de ayrı kültür şişelerine ekildi ve kültür edildi. Üç gün sonra %60 tabakalaşan GENC hücre besiyeri şu üç farklı aktive edici ortamın besiyeri ile değiştirilerek hücreler inkübe edildi: Tip I DM için yüksek glikozlu ortam (33 mM glikoz), Tip II DM için yüksek insülinli ortam (5,5 mM glikoz, 125 mikroiinternasyonel ünite ( $\mu\text{IU}$ ) insülin) ve IGT için hem yüksek glikozlu hem yüksek insülinli ortam (33  $\mu\text{M}$  glikoz, 125  $\mu\text{IU}$  insülin). Aktivasyon için 3 gün inkübasyon yapıldı ve besiyerleri her 12 saatte bir yenilendi.

Adezyon profillemeye testine başlama öncesi normal konsantrasyonlarda kültüre edilmiş çukurdaki tabakaya (pozitif kontrol) son 3 saat 50  $\mu\text{l}$  *E. coli* lizati eklendi ve kültür şartlarında inkübe edildi. EL-4 hücrelerinin sayımı yukarıda RAW 264.7 hücreleri için anlatıldığı gibi yapıldı. Adezyon profillemeye testine EL-4 veya RAW 264.7 hücrelerinden 40.000 adet ilgili test çukurlarına eklenerek başlandı. Hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem kültür şartlarında 3 saat kokültüre edildi. Kokültür sonrası çukurlar yukarıda “Endotel Hücreyi Tip I DM Stresiyle Aktive Eden Glikoz Konsantrasyonunun Adezyon Testi ile Belirlenmesi” bölümünün ikinci kısımdaki RAW 264.7 hücreleriyle yapılan testte anlatıldığı gibi yıkandı, boyandı ve mikroskopta sayıldı ve sayıların normalizasyonu yapıldı. Normalize sayılar 100  $\mu\text{m}^2$  plastik yüzeyde 87 adet endotel hücreye yapışan cinsinden hesaplanarak kullanıldı.

### **Optimizasyon Ön Çalışmaları**

Çalışmalarda; 1) deneye başlanacak tabaka % seviyesi; 2) tabakanın oluşturulacağı zemin materyal; 3) tabakaya eklenecek süspanse hücre adedi; 4) endotel hücre çeşidi; 5) fiksasyon şartı; 6) *Wright* boyası, hematoksilen ve Eozin, ve Giemsa arasından kullanılacak boya; 7) tabakayı zedelemeyen yıkama metodu; 8) 6, 12, 24, 48 ve 96 çukurlu mikro kültür plaklardan uygununun seçimi; 9) aktivasyon süresi; 10) kokültür süresi; 11) boyama süresi; 12) pozitif kontrol için kullanılacak lizat miktarının belirlenmesi; ve 13) okuma düzeninin belirlenmesi için 10 adet çaprazlama deneyler yapıldı. Okuma düzeninin belirlenmesi, yapışan hücrelerin çukurlara homojen dağılmaması sorununu gidermek üzere yapıldı. Buna göre,

çukurların tabaka görüntüsü 4X büyütmede 49 sanal alana bölündü. Her bir alanda yapışmanın çok yoğun, orta yoğun ve az yoğun olduğu bölgeler belirlendi ve koordinatları saptandı. Çok yoğun ve orta yoğun yapışma olan bölgeler kullanılarak 10X büyütme objektifi ve 10x10 oküler mikrometre ile rastgele 5'şer sahada yapışan hücreler sayıldı. Her yoğunluk grubundaki sayılar kendi içinde manuel tutarlı bulundu (ham veri) ve grupsal ortalamalar alındı.

## **FARKLI DİYABET STRESİNE KARŞI ENDOTEL HÜCRENİN KORUYUCU GEN mRNA'LARINI İFADELEME YANITLARININ ARANMASI**

RT-PZR çalışmaları aktiflenmiş MAE ve GENC endotel hücrelerinin, qRT-PZR çalışmaları ise aktiflenmiş GENC endotel hücrelerinin farklı diyabetik stres koşullarında A1'ler, A20 ve HO-1 koruyucu genlerini mRNA düzeyinde hangi oranlarda ifade ettiklerini anlamak için gerçekleştirildi. MAE için saptanan yüksek şeker ve insülin konsantrasyonunun GENC hücrelerinde de aktivasyon sağladığı yukarıda adezyon profillemesi yönteminde belirtilmişti. Endotel hücreler üç farklı aktive edici ortamın besiyeri ile farklı saatlerde muamele edilerek aktive edildi. Çalışmalar dört aşamalı yapıldı; (1) %80-90 tabaka endotel hücreleri Tip I DM için yüksek glikozlu ortamda (33 mM glikoz); Tip II DM için yüksek insülinli ortam (5,5 mM glikoz, 125 mikro internasyonel ünite ( $\mu$ IU) insülin) ve IGT için hem yüksek glikozlu hem yüksek insülinli ortam (33  $\mu$ M glikoz, 125  $\mu$ IÜ insülin) aktivasyonu; (2) Total RNA izolasyonu; (3) Total RNA'lardan tek döngü ters transkripsiyon reaksiyonu ile komplementer DNA (cDNA) sentezi; (4) Aranılan genlere ait cDNA'ların polimer zincir reaksiyonu ile çoğaltılması ve sonuçların karşılaştırılması. Sonuçların güvenilirliği en az iki bağımsız deneyde tutarlı sonuç elde edilmesiyle sağlandı. Bu deneylerde tüm tüp ve şişeler % 0,1 dietilpürokarbonat'lı (DEPC) (D5758, Sigma, Almanya) çözeltide 1 gece bekletildikten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.

### **Total RNA İzolasyonu**

Yukarıdaki adezyon profillemesi çalışmasında belirtilen üç farklı aktivasyon şartında ve belirlenen periyotlarda aktive edilen ve edilmeyen MAE ve/veya GENC (p21-24) hücrelerinden Purelink RNA Isolation Kit (12183018A, Invitrogen, ABD) kiti kullanılarak prospektüsünde önerildiği gibi total RNA izole edildi. Bunun için 1/7 veya 1/5 oranda ekilen ve 4 gün kültüre edilen endotel hücrelerin besiyerleri aktivasyon için değiştirildi ve hücreler aktive edildi. Aktivasyon süresi dolan hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve 25 cm kare



aktive tabakaya 990 µl liziz tamponu+10 µl beta merkaptotanol eklendi, kazıyıcı ile hücreler kazındı, steril enjektörle 12 kez homojenize edildi. Homojenata 1:1 oranında %70'lik etanol çözeltisi eklendi, vortekslendi, karışım kit içeriğinde bulunan nükleik asit bağlayıcı kolona yüklendi, kolon mikrosantrifüj ile 12800 rpm'de 45 saniye santrifüjlendi, alt sıvı atıldı ve kolona 350 µl yıkama tamponu I eklenerek 12800 rpm'de 45 saniye santrifüjlendi, 80 µl DNaz çözeltisi (18068-015, Invitrogen, ABD) eklendi ve kolon oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilerek DNA'lar yıkıldı. Kolon iki kez 500 µl yıkama tamponu II ile 12800 rpm'de 45 saniye santrifüjlenerek yıkandı, 13000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek yarı-ıslak kurutuldu. 25 µl DEPC'le muamele edilmiş ultra saf su eklendi, 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. 13000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek total RNA yeni toplama tüpüne elüe edildi. Kolonda elüsyon yeni su ile tekrar edildi. Hemen kullanılan örnekler için saflık ve miktar tayini yapıldı. Kullanılmayan örnekler -70°C'e kaldırıldı.

### **cDNA Sentezi**

İzole edilen total RNA örneklerine ait cDNA'lar, *First Strand cDNA Synthesis* kiti (K1612, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak prospektüsünde önerildiği gibi sentezlendi. Buna göre; 3 µg total RNA örneğine oligodT primer eklendi, DEPC'le muamele edilmiş ultra saf su ile hacim 11 µl'ye tamamlandı. Karışımındaki muhtemel kıvrılmış tek zincir RNA'ların açılması ve primerin RNA'ya rahatça bağlanabilmesi için karışım termal döngü cihazında 65°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası karışım 3 dakika buzda bekletildi, mini spin (Ek 3A) ile döndürülüp tekrar buz üzerine konuldu. Karışıma 4 µl reaksiyon tamponu, 1 µl RNaz aktivitesini inhibe eden *ribolock* RNase inhibitör (20 ünite/µl), 0,5 mM dNTP'ler ve 1 µl ters transkriptaz enzimi (200 ünite/µl) eklendi. Ters transkripsiyon, PZR termal döngü cihazında tek döngüde; 37 °C'de, 30 dakika, 45°C'de, 30 dakika; 70°C'de, 5 dakika profiliyle yapıldı. Reaksiyon sonrası sentezlenen cDNA'lar porsiyonlandı, -70°C'de saklandı.

### **Endotel Hücrede İfade Eden Koruyucu Gen mRNA'larının Ters Transkriptaz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile Belirlenmesi**

cDNA örnekleri A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA dizilerine özgü primerler kullanılarak ve yukarıda PZR ile DNA'da gen arama bölümünde açıklanan metotla termal döngü cihazında (Ek 3A) çoğaltıldı. PZR reaksiyonunda kullanılan primer çiftleri Tablo 7'de gösterilmiştir. 2 µl cDNA örneği, 5 µl 10X PZR tamponu, 0,4 (µM/ µl) dNTP'ler, 10 (pmol/ µl) ileri primer, 10 (pmol/ µl) geri primer, 2,5 (µM/µl) MgCl<sub>2</sub>, 5 (ünite/µl) taq polimeraz ve 33 µl distile su ile karıştırıldı. PZR profili 94°C'de 3 dakika, 35 döngü; 94°C'de 30 saniye, 58°C'de 30 saniye,

72°C’de 60 saniye ve son döngü 72°C’de 10 dakika olarak belirlendi. Elektroforez yukarıda aynı bölümde anlatıldığı gibi yapıldı ve görüntü alındı. Farklı olarak jel yoğunluğu %2 (ağırlık/hacim) olarak kullanıldı.

Optimizasyon tablosunda (Tablo 4) testlerimizin ön çalışmaları görülmektedir.

### **Koruyucu Gen mRNA’larının İfade Kinetiğinin ve Belirlenen Saatlerde Bağlı Seviyelerinin RT-PZR ile Saptanması**

Aktive endotel hücrede ilgili genlerin ifade kinetiğinin Tip I DM modelinde saptanmasında; (1) MAE hücrelerinin A1’ler, A20 ve HO-1 genleri 2, 4, 6, 9, 12, 24, 48 saat boyunca incelenmiştir; (2) GENC hücrelerin A1’ler ve A20 genleri için 2, 4, 6, 9, 12, 24, 48 saat ve HO-1 geni 4 ve 6 saat boyunca incelenmiştir.

Kinetiğin Tip II DM modelinde saptanmasında GENC hücreleri kullanılmıştır. A1’ler ve A20 genleri 2, 4, 6, 12, 24, 48 saat; HO-1 geni 2, 4, 6, 9 saat boyunca incelendi.

Kinetiğin IGT modelinde saptanmasında GENC hücreleri kullanılmıştır. A20 ve HO-1 genleri için 4. saat; A1’ler genleri için 6. saat ifadelenmeleri incelendi.

Agoraz jelde en keskin yoğun bant tek adet olduğunda o saat; birden fazla keskin ve yoğun bant varsa bunlardan literatüre uygun olanı bağlı seviyelerin saptanması deneyleri için seçilmiştir. Bunlar belirlendikten sonra ilgili genlerin bağlı mRNA ifade seviyeleri karşılaştırmalı olarak RT-PZR ile ölçülmüştür.

### **Endotel Hücrede İfade Eden Koruyucu Gen mRNA Bağlı Seviyelerinin Gerçek Zamanlı RT-PZR (qRT-PZR) İle Belirlenmesi**

GENC hücreleri ifade kinetiği çalışması ile belirlenen saatler kullanılarak deneyler yapıldı. A1’ler ve HO-1 genleri için tüm aktivasyon şartları 6 saat, A20 geni için Tip I DM ve IGT deney modeli aktivasyon şartları 4 saat, Tip II DM aktivasyon şartı 6 saat süre ile aktive edilmiş ve edilmemiş izole total RNA’ları ile elde edilen cDNA’lar kullanıldı. *Absolute* qPCR SYBR *Green ROX Mix* (AB1163, Thermo Scientific, ABD) mastır miksi kullanılarak prospektüsünde önerildiği gibi her bir gene ait tüplere 12,5 µl mastır miks, 70 nM ileri primer ve 70 nM geri primer, 7 µl distile su ve 2,5 µl cDNA örneği karıştırıldı. Karışımı plağa yükleme haritasına göre buz üzerindeki 96 çukurlu RT-PZR plağına triplike olarak yüklendi. Her bir genin tüpüne benzer şekilde hazırlanan ancak primerleri kontrol geni HPRT-1 içeren paralel set de plakta yer aldı. Plağın üstüne SYBR yeşili ve ROX boyasının emisyon ışımalarını geçirebilen, buharlaşmadan koruyucu şeffaf bir film yapıştırıldı. Isıdan kaynaklı oluşabilecek

kaçaklara karşı filmin plağa iyi yapışması sağlandı. Plak gerçek zamanlı termal döngü cihazına yerleştirildi. Elektrik kesintilerine karşı cihaz bir güç destekleyicisine bağlandı. 95°C’de 15 dakika, 40 döngü; 95°C’de 15 saniye, 57°C’de 1 dakika, 72°C 30 saniye profili ile reaksiyon gerçekleştirildi. Sonuçlar 3,54 versiyon “AnalysIcycler” programıyla elde edildi

### **İstatiksel Analiz**

Farklı diyabet streslerine karşı endotel hücrenin mononükleer hücreleri bağlama yanıtlarının aranmasında stres ve kontrol arasında anlamlı farklılık olup olmadığını test etmek için ANOVA istatistiksel testi uygulandı.

Farklı diyabet stresine karşı endotel hücrenin koruyucu gen mRNA’larını ifadeleme yanıtlarının aranmasında A1’ler, A20, HO-1 gen ifadesindeki farklanma REST 2009 programı kullanılarak yapıldı. Buna göre; bağımsız yapılan qRT-PZR testi sonrasında her bir gen için elde edilen üçlü CT değerlerinin ortalaması belirlendi ve bağımsız yapılan iki deneyin ortalama CT değerlerinin ortalamaları alınarak tek seri CT değeri elde edildi.  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  metoduna göre istatistiksel anlamlılık arandı.

### **RT-PZR ve qRT-PZR için Optimizasyon Ön Çalışmaları**

A1’ler, A20 ve HO-1 genlerinin diyabetik stres koşullarına yanıt ifade profillerini RT-PZR yöntemi ile saptamada 11 adet test parametresinin optimizasyonu 33 adet ön çalışma ile MAE ve GENC hücrelerinde gerçekleştirildi.

Ön çalışmaların dökümü toplu halde ve yapıma sırasıyla numaralandırılmış olarak Tablo 4’de ve ayrıntısı EK 4’de verilmiştir.

**Tablo 4. RT-PZR ve qRT-PZR optimizasyon deneylerinin dökümü**

TP no	Amaç	D no	İlgili optimizasyon deneyinde uygulanan veya kullanılan değişken																			
			Hüc	gen	kont gen	aktif	aktif sü (saat)	tot RNA (ug)	RNA izol kit	cDNA	profil (40 döngü)	ct	Ag EP	Denat EP	plak	cihaz	Master Miks	primer	DNaz	Yöntem		
1	Başlangıç total RNA veriminin artırılması ve miktarının saptanması	1	GENC	A1,A20, HO-1	HPRT	YG, Yİ, YG+Yİ	2, 24, 48	0,5	Roche	1/1	94°C'de 15 san, 57°C'de 1 dak	-				Fast start SYBR	30 pmol/ul		qRT-PZR			
		2		A20				1												10 pmol/ul		..
		3		A20						1												
		5	MAE	A1,A20, HO-1		YG	48		2	Roche ve Pure link		94°C'de 10 dak, 94°C'de 15 san, 57°C'de 1 dak									..	
		24	MAE	A20		YG	48		3													
2	PZR profili optimizasyonu	4	1. deney RNA'sı						Roche												..	
3	cDNA dilusyon oranının belirlenmesi	5	yukarıda 5. deney bkz							1/10, 1/100, 1/1000						Fast start SYBR				..		
		6	bir üstteki 5. deney tekrar																	..		
		7	MAE	A1		YG	24		2		Pure link											..
		9	GENC	A20		YG	48														..	
		10	MAE, GENC	9. deney doğrulama																		..
11	10. deney doğrulama																		..			
4	Kullanılan malzemelerin kalite kontrolü	5	yukarıda 5. deney bkz																		..	
		6	yukarıda 6. deney bkz																		..	
5	Gerçek zamanlı termal döngü cihazının kalite kontrolü	7	yukarıda 7. deney bkz																		..	
		8	7. deney doğrulama													Bioneer ve ABI, Bioneer O.K.					..	
6	Master miks değişimi/seçimi ve primer konsantrasyonunun belirlenmesi	12	MAE	A20		YG	48		2	Pure link	1/1	94°C'de 10 dak, 94°C'de 15 san, 57°C'de 1 dak					Fast start Absolute qPCR	300 nM		..		
		13	MAE	A20		YG	48		2				1/1								70 nM	
7	Optimize deney şartları kontrolü	14	MAE	A20		YG	48		2				1/1						Absolute qPCR	70 nM		..
		15	GENC	A20		YG	48		2		1/1											..
		16	MAE	A1,A20, HO-1		YG	48															
		17	bir üstteki 16. deney tekrar																			..
8	qRT-PZR profili optimizasyonu	18	MAE	A1,A20, HO-1		YG	48			Pure link											..	
		19	bir üstteki 18. deney A20 için tekrar																	..		
		20	MAE	A20		YG	48			Pure link											..	
9	RNA kalite kontrolü	21	20. deney materyali																		..	
		22	MAE	A20		YG	48			Pure link										var/ yok	..	
10	Optimize deney şartları kontrolü	23	22. deney doğrulama																		..	
		24	yukarıda 24. deney bkz																		RT	
11	İnternal kontrol kontrolü	30			HPRT ve GADPH																	

**TP:** Test parametresi; **D no:** Deney numarası; **hüc:** kullanılan hücre; **kont gen:** kontrol geni; **aktic:** aktivasyon koşulu; **aktif sü:** aktivasyon süresi; **tot RNA:** deneyde kullanılan RNA miktarı; **RNA izol kit:** kullanılan izolasyon kiti; **cDNA:** cDNA'nın seyreltilme durumu; **ct:** Delta CT ışımasının saptanma durumu; **Ag EP:** agaroz elektroforezinde saptanma durumu; **Denat EP:** Denatüre edici RNA elektroforezinde saptanma durumu; **plak:** deney plağının durumu; **primer:** kullanılan primer miktarı; **DNaz:** DNaz kullanıma durumu

Tabloda sol birinci ve ikinci sütunda numara ve amacı verilen 11 adet test parametresi üçüncü sütunda numaralandırılan 25 adet deneyle optimize edilmiştir. İçinde birden çok parametre test edilen deneyler tabloda birden çok amaç başlığı altında yer almaktadır. Aynı deneyler aynı renkte olmak üzere bunların numaraları renklendirilmiştir. Sonraki 18 adet sütunda gösterilen değişkenlerin adları ikinci satırdaki başlıkta verilmiştir.

Yapılan deneylerle, RT-PZR ve qRT-PZR çalışmalarında nükleik asit saflık ve miktar tayin yöntemi, cihaz ve test plak/tüp kaplayıcısı, total RNA ve cDNA depolama koşulu, deney boyutu, lizat homojenizasyon yöntemi, PZR profili, mRNA eldesinde kullanılacak total RNA ve cDNA miktarı, cDNA sentez inkübasyon koşulu, RNA izolasyon ve master-miks kitleri, primer konsantrasyonu ve tot RNA'nın DNA kontaminasyonu ön çalışmalarda incelendi ve optimize edildi. Sonuç olarak; 1) **RNA elde etmede verimin artırılması**, manipülasyon iyileştirme, etkin spektrometre şartının oluşturulması, kit değiştirme ve DNaz kullanım etkisinin denatüre edici jelde incelenmesi ile; 2) kullanılacak **optimum RNA miktarı ve cDNA miktarının saptanması** karşılaştırmalı çalışmalarla; 3) diyabetik strese karşı hücrelerde **ilgili genlerin ifade profilinin saptanması**, çoklu hücre hattı kullanımı, RT-PZR profilinin optimizasyonu, deneylerde bantların agaroz jelde takibinin yapılması ile; 4) **qRT-PZR yöntemiyle etkin profil elde edilmesi**, etkin gerçek zamanlı PZR cihazının ve test plağı koşulunun saptanması, etkin master miks ve primer konsantrasyonunun belirlenmesi, işler referans gene karar verilmesi ve qRT-PZR profilinin optimizasyonu ile sağlanmıştır. Optimizasyon deneyleri Ek 4'de gösterilmiştir.

## BULGULAR

Bulgular aşağıdaki sırada sunulmuştur:

- 1- Biyobilişim alışma bulguları
- 2- Çalışma modeli kurulması bulguları
- 3- Monosit-T hücre yapışma profilleri
- 4- A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA ifade kinetikleri ve profilleri

### **A1'ler, A20 VE HO-1 GENLERİ, PRİMERLERİ VE miRNA'LARI İÇİN YAPILAN BİYOBİLİŞİM ÇALIŞMA BULGULARI**

*Mus musculus* türünün A1'ler, A20 ve HO-1 genleri birbirinden farklı yapılar da ve farklı ailelerde yer alan genler olarak bulunmuştur. Bunlarla ilgili bilgiler Tablo 5'de ve devamında gösterilmiştir.

**Tablo 5. A1'ler, HO-1 ve A20 genlerinin pozisyonları ve genomik içerikleri**

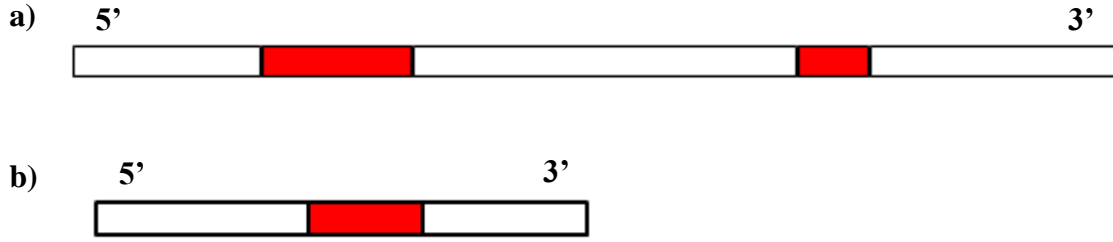
Gen	Kromozom/Pozisyon	Uzunluk (bç)	Ekzon sayısı	İntron Sayısı	CDS pozisyonu
A1a	9. kromozom 88962416-88956920	5497	2	3	132-650
A1b	9. kromozom 89199273-89207838	8565	2	3	88-606
A1c	9. kromozom 114330135-114330578	443	1	2	165-311
A1d	9. kromozom 88723288-88731850	8561	2	3	132-650
A20	10. kromozom 19000910-19015410	14501	9	10	274-2601
HO-1	8. kromozom 75093618- 75100593	6976	5	5	133-1002

**bç:** Baz çifti; **CDS (kodlanan DNA dizisi):** DNA üzerindeki genin mRNA transkript dizilerinden protein olarak kodlanan bölgesi

Tablonun sol sütununda aranılan genlerin isimleri verilmiştir. Bu genlerin hangi kromozomda olduğu, bulunduğu kromozomdaki pozisyonu (kromozomdaki nükleotid sırası), gen uzunlukları, ekzon, intron sayıları ve CDS bölgelerinin pozisyonları üst satırda başlıklar halinde verilmiştir. Genlerin genomik içeriği tabloda görülmektedir.

Bu çalışmada A1a geninin aynı kromozom üzerinde ardında A1b, A1c ve A1d genleri ile yan yana bulunduğu ve diğerleri ile %99 homoloji göstermekte olduğu görüldü. İlk üç gen birbirlerinden nokta mutasyonlarla ayrılmaktadır (134). Literatürde A1a, A1b, A1c ve A1d genlerinin birbirinden farklılandırılmadan ve A1 geni adı altında toplanarak incelendiği 105 adet çalışma görülmüştür. Sadece A1a geniyle yapılan 6 adet, A1a ve A1b genlerinin birlikte incelendiği 1 adet çalışma rapor edilmiştir. Seçtiğimiz RT-PZR primeri A1a, A1b, A1c ve A1d genlerinde aynı dizileri içeren ikinci ve üçüncü ekzon bölgelerinden seçilmiştir.

A1 lokusunda A1a, A1b ve A1d genleri iki ekzon ve üç intron bölgelerine sahiptir (Şekil 10a). A1c geni ise tek ekzonlu iki intronlu bir genidir (Şekil 10b).



### Şekil 10. *Mus musculus* A1a, A1b, A1c ve A1d gen haritaları

Yukarıdaki şekillerde A1a, A1b, A1c ve A1d genlerinin şematik gösterimi bulunmaktadır. **a)** A1a, A1b ve A1d genleri ortak genomik şeması. A1a, A1b ve A1d genleri iki ekzon ve üç intron bölgeleri sahiptirler. Aynı zamanda genlerin ekzon ve intron uzunlukları yaklaşık aynıdır. Şekilde kırmızı ile gösterilen bölge ekzon bölgelerini, beyazla gösterilen bölge ise intron bölgeleri temsil etmektedir. **b)** A1c geni genomik şeması. A1c geni tek ekzon ve iki intron bölgesine sahiptir. Geni uzunluğu, ekzon ve intron bölge uzunlukları diğer genlere göre daha kısadır. Önceki şekilde olduğu gibi kırmızı bölgeler ekzon, beyaz bölgeler intron bölgelerini ifade etmektedir.

A20 geni 9 adet ekzon ve 10 adet intron bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 11). Ayrıca, beş farklı olası promotor bölgesi bulunan gen kabul edilmiş üç alternatif poliadenilasyon bölgesine sahiptir. Gene ait 6 adet farklı alternatif *spliced* varyant ve 1 adet *spliced*lanmamış form tanımlanmıştır. mRNA'lar arasındaki farklılıklar; 5' uçtaki kısaltmalarla; 9 adet kaset ekzonun olup olmamasıyla; ekzonların farklı sınırlarla birleşmeleriyle ve intronlararası alternatif kıvrılmalarla oluşmaktadır. 6 adet *spliced* ve 1 adet *spliced*lanmamış mRNA, 7 adet olası protein izoformu kodlamaktadır. Üç izoform gösterilmiş olup geriye kalan izoformlar kısmen tanımlanmıştır. Seçtiğimiz RT-PZR primeri üçüncü ve dördüncü ekzonları içerdiğinden biz bu çalışmada tüm izoformları kodlayan mRNA'ları saptadık.

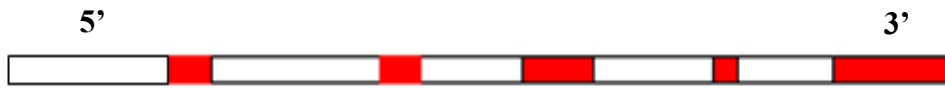


### Şekil 11. *Mus musculus* A20 gen haritası

Şekildeki şemada kırmızı ile gösterilen bölgeler A20 genine ait 9 adet ekzon bölgesini, beyaz ile gösterilen bölgeler ise 10 adet intron bölgesini göstermektedir.



HO-1 geni 5 adet intron ve 4 adet ekzon bölgesi içermektedir (Şekil 11). Gen üç alternatif *spliced* varyant ve bir *spliced*lanmamış varyant olmak üzere 4 adet farklı mRNA ifadelemektedir. Gene ait iki olası alternatif promotör bölgesi ve iki alternatif kıvrılmayan son ekzon bulunmaktadır. mRNA'lar arasındaki farklılıklar 3' uç kısaltmalarla ve ekzonların farklı sınırlarla birleşmeleriyle oluşmaktadır. Üç "spliced" mRNA olası üç protein izoformunu kodlamaktadır. Seçtiğimiz RT-PZR primeri ikinci ve üçüncü ekzonları içerdiğinden biz bu çalışmada tüm izoformları kodlayan mRNA'ları saptadık.



**Şekil 12. *Mus musculus* HO-1 gen haritası**

Şekildeki şemada kırmızı ile gösterilen bölgeler HO-1 genine ait 5 adet ekzon bölgesini, beyaz ile gösterilen bölge ise 4 adet intron bölgesini göstermektedir.

A1'ler, A20 ve HO-1 genleri için seçilen primerlerin özellikleri Tablo 6'da ve primerler Tablo 7'de gösterilmiştir.

**Tablo 6. A1'ler, A20, HO-1 genlerine ait PZR ve qRT-PZR primer çiftleri özellikleri**

Primer Çifti Özellikleri	PZR			qRT-PZR		
	A1'ler	A20	HO-1	A1'ler	A20	HO-1
PZR ürününün uzunluğu (bp)	376	776	146	166	215	127
5' uç GC sayısı	2	2	2	2	2	2
3' uç GC sayısı	3	3	3	3	2	3
İP aday erime noktası (°C)	60.33	60.04	61.08	58,81	57,34	60,04
GP aday erime noktası (°C)	60.32	59.96	60.32	59,42	56,50	58,51
İP GC oranı	%60	%55	%60	%57,89	%50	%60
GP GC oranı	%55	%55	%55	%57,89	%50	%60
İP 3' ucunun kendine yapışma derecesi	2/6	0	2	4/6	2/6	2/6
İP 5' ucunun kendine yapışma derecesi	4/6	6	4	4/6	5/6	3/6
GP 3' ucunun kendine yapışma derecesi	0/6	1	2	1/6	2/6	0/6
GP 5' ucunun kendine yapışma derecesi	6/6	6	5	3/6	0/6	5/6
Diğer olası PZR ürünlerinin uzunlukları	852, 998, 982, 932, 640, 956	1092	-	-	-	-

**İP:** İleri primer; **GP:** Geri primer; **bç:** Baz çifti; **GC:** Guanin/sitozin bazları; **°C:** Santigrat derece

Tablonun 1. sütununda primer çiftlerinin seçilme kriterleri başlıklar halinde verilmiştir. 2. sütunda PZR primer çiftlerinin, 3. sütunda qRT-PZR primer çiftlerinin özellikleri bulunmaktadır.

**Tablo 7. A1'ler, A20 ve HO-1 genlerine ait primer dizileri**

<b>Gen</b>	<b>PZR Primerleri</b>	<b>qRT-PZR Primerleri</b>
A1'ler	İP: CTCCTTGGCCTCTAGGTGGA	CCACAAGAGCAGATTGCC
	GP: AGGGCAATCTGCTCTTGTGG	GCAGAAAAGTCAGCCAGCC
A20	İP: GTCATGGCTGTGACGAAGGA	CCAATGGTGATGGAAACTGC
	GP: AAAAGCCAGGGTGATCAGGG	CCATTCGTCATTCCAGTTCC
HO-1	İP: CCTTCCCGAACATCGACAGC	TCCTCAGACCGCTTTTGCC
	GP: AGTGGGGCTCACCTCAATGT	ATCGCTAATCACGACGCTGG

**PZR:** Polimer zincir reaksiyonu; **qRT-PZR:** Gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu; **İP:** İleri primer; **GP:** Geri primer.

Yukarıdaki tabloda A1'ler, A20 ve HO-1 genlerine ait ileri ve geri primer dizileri gösterilmektedir. İlk sütunda genlerin isimleri, ikinci sütunda polimer zincir reaksiyonunda kullanılan ileri ve geri primer dizileri, üçüncü sütunda ise gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonunda kullanılan ileri ve geri primer dizileri bulunmaktadır.

Sonuçlarımız göstermektedir ki seçilen primerler DNA ve mRNA'da ürünü etkin biçimde saptayabilecek özelliklere sahiptir.

A1'ler, A20 ve HO-1 genleri için çoklu miRNA adayları veri tabanlarından çıkarılmış ve Tablo 8'de gösterilmiştir.

**Tablo 8. A1'ler, A20 ve HO-1 genleri için tahmini miRNA'ları**

<b>A1'ler</b>	<b>A20</b>					<b>HO-1</b>
miR291a-3p	miR7a	let7a	miR125b-5p	miR329	miR592	miR24
miR294	miR7b	let7b	miR125a-5p	miR362-3p	miR653	miR31
miR295	miR18a	let7c	miR185	miR340-5p	miR758	miR155
miR302a	miR18b	let7d	miR186	miR351	miR873	miR183
miR302b	miR19a	let7e	miR187	miR379	miR882	miR191
miR302d	miR19b	let7f	miR195	miR384-3p		miR218
miR326	miR23a	let7g	miR200b	miR429		miR365
miR330	miR23b	let7i	miR200c	miR488		miR377
miR382	miR33		miR217	miR497		miR379
miR494	miR98		miR320	miR504		miR505

Genlerin ortak düzenlenmesiyle ilgili miR-379'un A20 ve HO-1 genlerini ortak düzenlediği tabloda görülmektedir.

### **ÇALIŞMA MODELİNDE KULLANILAN ENDOTEL HÜCRE HATLARI GENOMUNDA A1'LERDEN EN AZ BİR, A20 VE HO-1 GENLERİ VARDIR**

Endotel koruyucu A1'ler, A20 ve HO-1 genlerin Mus musculus türüne ait MAE ve GENC hücre hatları genomlarında bulunup bulunmadığı PZR yöntemiyle araştırılmıştır.

#### **DNA Saflık ve Miktar Tayini**

MAE ve GENC hücrelerinden izole edilen DNA örneklerinin saflık ve miktar tayinine örnek birer okuma Tablo 9'da gösterilmiştir.

**Tablo 9. İki örneğe ait DNA spektrofotometrik ölçüm bulguları**

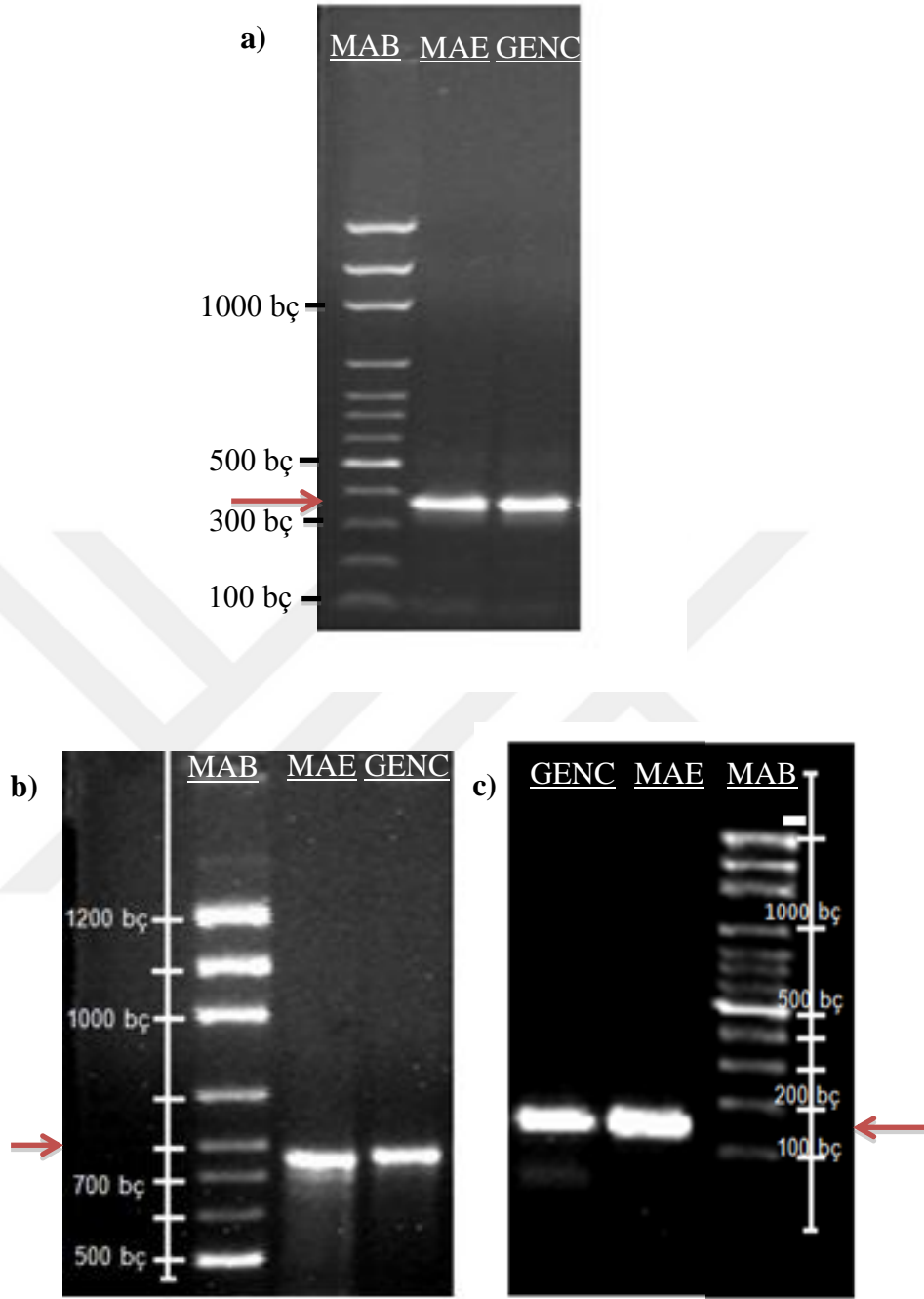
<b>Hücre</b>	<b>Seyreltme oranı</b>	<b>A<sub>260</sub> (ortalama)</b>	<b>A<sub>280</sub> (ortalama)</b>	<b>A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> (ortalama)</b>	<b>Miktar (µg/ml)</b>
MAE	1/50	0,500	0,275	1,81	1250
GENC	1/50	0,511	0,286	1,78	1277,5

A<sub>260</sub>/ A<sub>280</sub> (ortalama) değerlerinden anlaşıldığı gibi her iki örnekte de protein ve RNA kontaminasyonu gözükmemektedir.

### **PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Analiz Bulguları**

MAE ve GENC hücrelerinden izole edilen DNA örnekleriyle polimer zincir reaksiyonu yapılmış ve PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile jel üzerinde gösterilmiştir (Şekil 12). A1'ler genlerine özgü çoğalan bölge 376 baz çifti (bç) çifti uzunluğunda, A20 genine özgü çoğalan bölge 776 bç uzunluğunda HO-1 genine özgü çoğalan bölge ise 146 bç uzunluğundadır.





**MAB:** Moleküler ağırlık belirteci; **bç:** Baz çifti.

### Şekil 13. MAE ve GENC hücre hatlarında A1'ler, A20 ve HO-1 genlerinin jel görüntüleri

(a) 1. kuyuda moleküler ağırlık belirteci, 2. kuyuda MAE hücresine ait PZR ürünü, son kuyuda ise GENC hücresine ait PZR ürünü bulunmaktadır. Jelde 376 bç uzunluğundaki bant A1'ler genleri ürünlerine aittir. (b) 1. kuyuda moleküler ağırlık belirteci, 2. kuyuda MAE hücresine ait PZR ürünü, son kuyuda ise GENC hücresine ait PZR ürünü bulunmaktadır. Jel görünen 776 bç uzunluğundaki bant A20 gen ürününe aittir. (c) Jelde 1. kuyuda GENC hücresine ait PZR ürünü, 2. kuyuda MAE hücresine ait PZR ürünü ve 4. kuyuda moleküler ağırlık belirteci bulunmaktadır. 3. kuyu boş bırakılmıştır. Jelde 146 bç'de görülen bant HO-1 genine aittir. Şekillerde

görüldüğü gibi kullanılan hücre hatlarında A1'ler, A20 ve HO-1 genleri muhafaza edilmektedir.

## **DİYABET STRESİNE YANIT VEREN ENDOTEL HÜCRE ORTAMI BELİRLENEREK İŞLEVSEL ÇALIŞMA MODELİ KURULMUŞTUR**

Tip I DM ortamı için MAE endotel hücreyi patofizyolojik değerler ve literatürle uyumlu 33 mM glikoz konsantrasyonunun aktive ettiği adezyon testi ile saptandı. Bu konsantrasyonda kan lökositleri normal konsantrasyondakine göre % 90 fazla bağlanma göstermiş, RAW 264.7 hücreleri Tablo 10'da görüldüğü gibi % 77 daha fazla bağlanmıştır Endotel hücrelerde granülasyon artmaktadır. Bu sonuçlar, deney sistemimizde Tip I DM koşuluna maruz kalan endotel hücrelerinin aktive olduğunu göstermektedir.

**Tablo 10. MAE endotel hücrelerin normoglisemi ve Tip I DM modelinde bağladığı RAW 264.7 hücre sayıları**

<b>Tip I DM modelinde MAE hücreye yapışan hücre sayıları</b>	<b>Normoglisemi modelinde MAE hücreye yapışan hücre sayıları</b>
35, 36, 38, 32, 33, 11, 8, 9, 12, 15, 22, 9	19, 16, 22, 19, 20, 9, 2, 5, 7, 3

Yukarıdaki tabloda Tip I DM modeline 48 saat maruz bırakılan ve aktivasyona maruz bırakılmayan MAE endotel hücrelerinin yapılmış adezyon test verileri gösterilmektedir. Tip I DM modelinde MAE hücreler ortalama 23 monosit hücre bağlarken aktivasyona maruz bırakılmayan MAE hücreler 12 monosit hücre bağlamıştır. Buna göre Tip I DM aktivasyonunun MAE hücreleri aktive ederek monosit bağlama kapasitesini arttırdığı anlaşılmıştır.

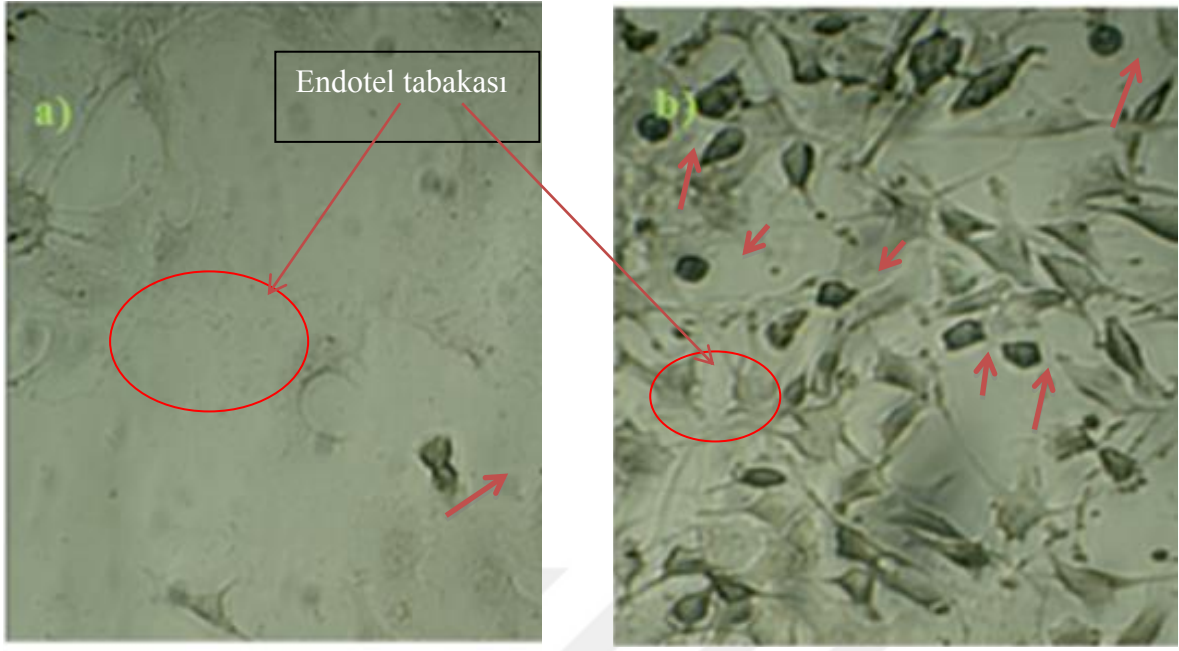
Tip II DM modeli için MAE endotel hücrenin yüksek insülin konsantrasyonu ile aktive olduğu üç farklı yöntemle yapılan inceleme sonuçlarının değerlendirilmesiyle belirlendi. Bunlarda lökositlerin aktiflenmiş MAE tabakasına yapışma sayıları Tablo 11'de görülmektedir. Burada endotel hücrelerin 100  $\mu$ IU/ml'den itibaren plato yapmaya başladığı ve 25.000  $\mu$ IU/ml'den itibaren hızlı artışa başladığı görülmektedir. Ayrıca, 10.000  $\mu$ IU/ml ve üstü insülin konsantrasyonlarında büyük ve granüllü lökositlerin endotel hücrelere tercihen daha fazla bağlandığı izlenmiştir (Şekil 13).

**Tablo 11. MAE endotel hücrenin artan insülin konsantrasyonuna karşı bağladığı ortalama kan lökosit sayıları**

<b>İnsülin miktarı (<math>\mu</math>IU/ml)</b>	<b>Endotel hücreye yapışan ortalama kan lökosit sayısı</b>
0	1,8
10	10,5
100	14,7
1000	15,9
2500	16,2
10.000	18,2
25.000	19,6
100.000	30
300.000	34,5
1.200.000	39,5

Tabloda başlıklar ilk sütununda verilmiştir. Bulgularda görüldüğü üzere endotel hücreye bağlanan lökositler fizyolojik değer olan 10  $\mu$ IU/ml insülinle başlamakta ve 1.200.000  $\mu$ IU/ml konsantrasyonuna kadar basamak basamak artış göstermektedir. İki noktada sıçrama fark edilmekte dir ki bunlardan biri aktivasyonun başladığı 100  $\mu$ IU/ml insülin değeri olup diğeri hücre için çok yüksek olan 25000  $\mu$ IU/ml insülinden sonraki artıştır. 0  $\mu$ IU/ml insülin miktarındaki değer deney hatası olduğundan değerlendirilmeye alınmamıştır.

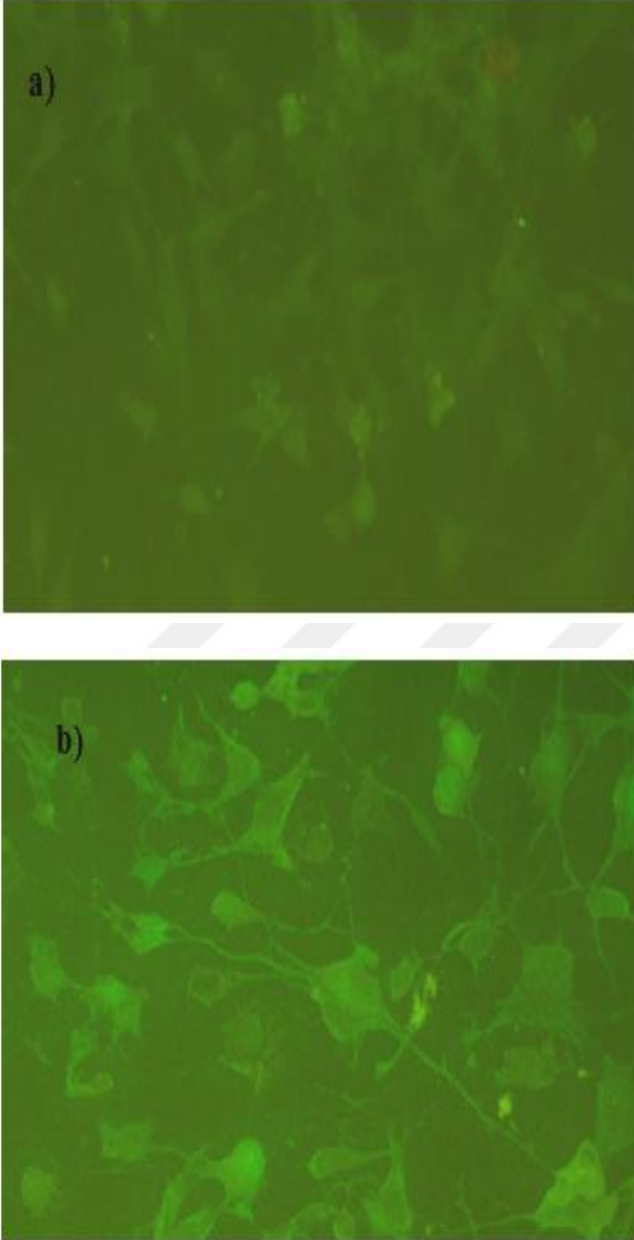




**Şekil 14. MAE endotel hücre tabakasının belli seviyeden sonra artan insülin konsantrasyonunda bağlanan büyük lökositler**

Şekilde (a) normal şartlarda aktive olmamış endotel tabakasını; (b) 10.000 µIU/ml insüline maruz kalmış endotel tabakasını göstermektedir. Her iki hücre tabakasına da bağlanmış lökositler kırmızı okla işaretlenmiş olup yuvarlak, farklı koyu renkli morfolojide görülmektedir. Şekil (b)'de görüldüğü gibi tabakaya bağlanan artmış lökositlerin morfolojisinde büyük lökositler hakimdir.

Tip II DM modeli ile aktiflenen MAE hücresinin insülin konsantrasyonu tayininde kullanılan diğer yöntem CD62e ifade artışı idi. Floresans mikroskopiyile yapılan çalışmada 25.000  $\mu\text{IU/ml}$  den itibaren belirgin bulunmuş ve sonuç düşük çözünürlükle elde edilmiştir (Şekil 14).



**Şekil 15. MAE endotel hücrelerin artan insülin konsantrasyonuna karşı CD62e ifadesinin floresans mikroskopi görüntüleri**

Şekilde 20X büyütme floresans mikroskopi görüntüleri bulunmaktadır. Şekil (a) normal şartlar aktive olmamış endotel tabakasını; (b) 25.000  $\mu\text{IU/ml}$  insüline maruz kalmış endotel tabakasını göstermektedir. Görüldüğü üzere Şekil (b)'de endotel hücre yüzeyinde artmış CD62e ifadesi gelişmiştir.

Tip II DM modelinde MAE hücrelerini aktifleyen insülin konsantrasyonu tayininde salgılanan IL-6 miktarı dot-blot yöntemiyle incelendi. Düşük çözünürlük nedeniyle 10.000  $\mu$ IU/ml insülin uyarısından sonraki varsa artışlar arasındaki fark ayırt edilemedi.

Eldeki bulgu, literatür bilgileri ve patofizyoloji değerler göz önünde bulundurularak MAE hücreyi optimum aktifleyen insülin miktarının 125  $\mu$ IU/ml olarak belirlendi.

## **ENDOTEL HÜCRE FARKLI DİYABET STRESLERİNE KARŞI MONONÜKLEER HÜCRELERİ FARKLI PROFİLDE BAĞLAMAKTADIR**

Tablo 12’de görüldüğü gibi Tip II DM ortamında endoteller monosit ve T lenfositlerin her ikisini de Tip I DM ortamının endotellerine göre %51 $\pm$ 4 daha fazla bağlamaktadır. IGT ortamında her iki mononükleer hücrenin denk miktarda ve diğer diyabetlerle elde edilen sayıların arasında seviyede bağlandığı bulunmuştur. Ham veriler EK 6A tablosunda bulunmaktadır. Sonuçların 10X büyütme objektif görüntüleri Tablo 13 ve Tablo 14’de gösterilmektedir. Bu bağlanmalarda monositler T lenfositlerin 1,4 $\pm$ 1 katı fazladır. Bu bulgular GENÇ endotel hücrelerinin 3 gün Tip I DM, Tip II DM veya IGT ortamı temsil eden aktifleyici besiyerlerine maruz kaldığında değişik profilde monosit/makrofaj ve T lenfosit adezyonu yaptıklarını ortaya koymaktadır. Burada yüksek konsantrasyonda insülinin mononükleer hücre adezyonunu yüksek glikoza göre daha arttırdığı ve bu artışı yüksek glikozun geriye döndürdüğü (IGT ortamında görüldüğü gibi) anlaşılmaktadır. Veriler normalize % artış olarak Şekil 16’daki grafikte ayrıca gösterilmektedir.

**Tablo 12. GENÇ hücrelere Tip I, Tip II DM ve IGT diyabet modellerinde yapışan mononükleer hücre sayılarının ortalamaları**

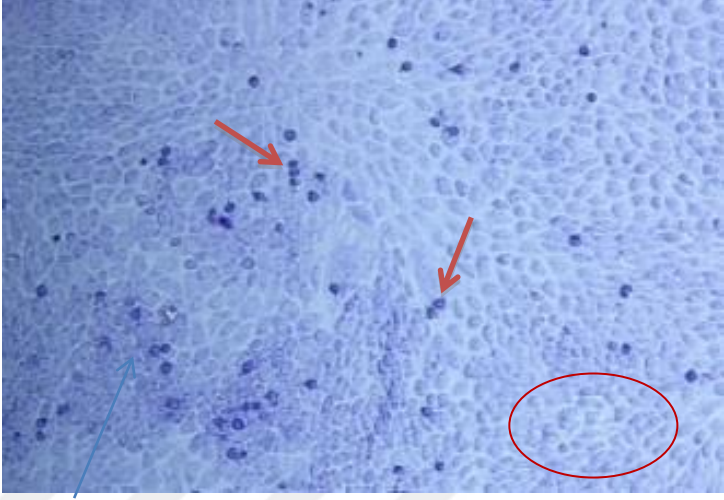
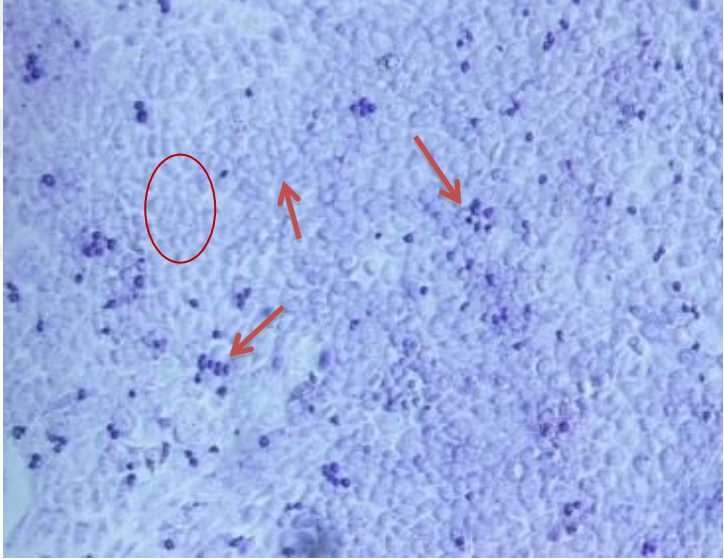
<b>Deney modeli</b>	<b>RAW 264.7</b>	<b>EL-4</b>
Tip I DM	28,5	23,8
Tip II DM	38,6	33,2
IGT	30,9	31,6
(+) kontrol	37,6	31,1
Normoglisemi	16	15,5

**DM:** Diabetes Mellitus; **IGT:** Bozulmuş glikoz toleransı

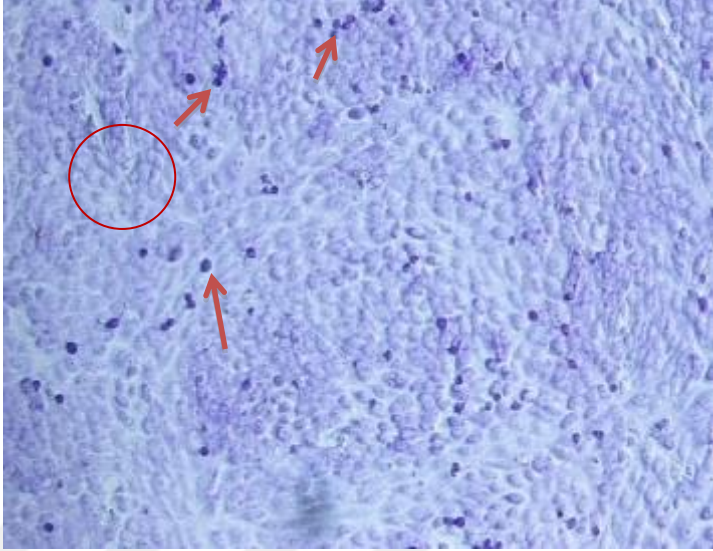
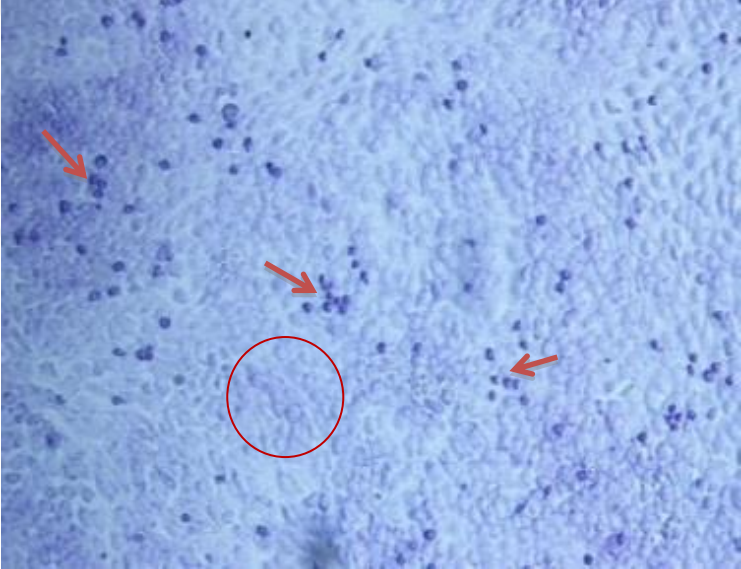
$p < 0,01$  anlamlılık düzeyinde tüm stres uygulamaları kontrole göre anlamlı bulunmuştur.

Tablonun birinci sütununda deney modeli, ikinci ve üçüncü sütunlarda yapışan hücre hattı belirtilmiştir. Tablodaki veriler birbirinden bağımsız 3 deneyin ortalamasıdır. Bulgulara bakıldığında modeller arasında adeze olan hücre cins ve sayısı açısından profilin farklı olduğu görülmektedir.

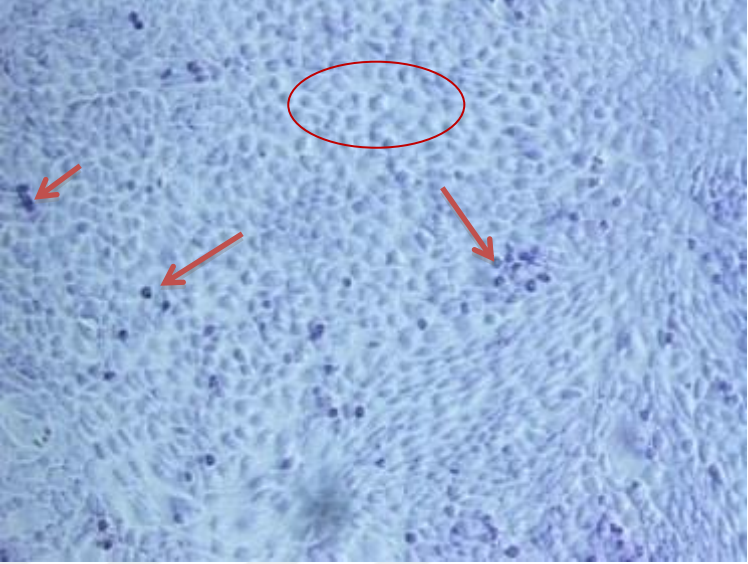
**Tablo 13. Monosit/makrofaj hücrelerine ait GENC adezyon test görüntüleri**

Aktivasyon Şartı	10X Büyütme
Tip I DM	
Tip II DM	

**Tablo 13. Monosit/makrofaj hücrelerine ait GENC adezyon test görüntüleri- devam 1**

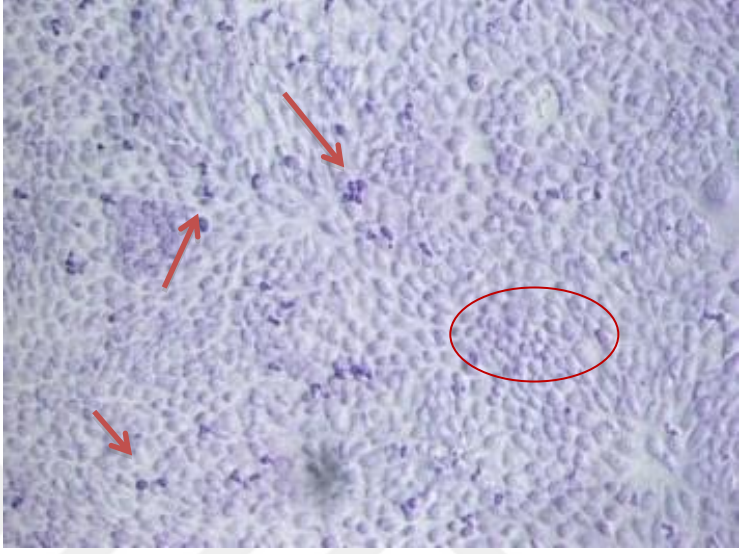
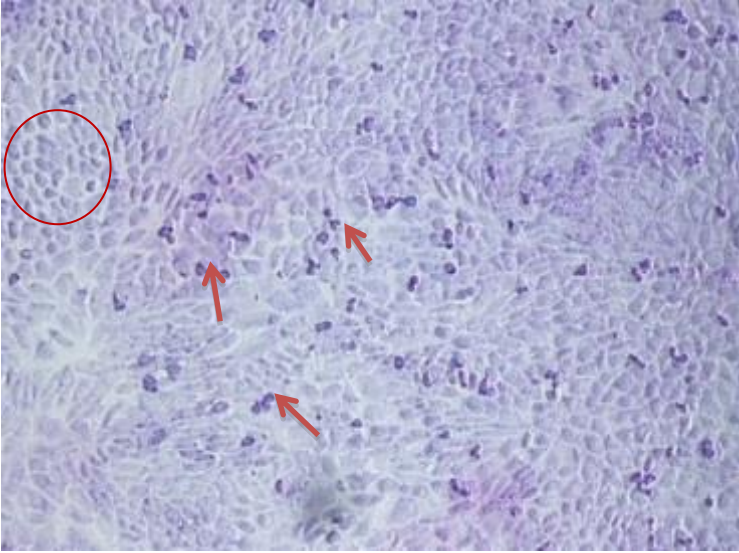
Aktivasyon Şartı	10X Büyütme
IGT	
(+) kontrol	

**Tablo 13. Monosit/makrofaj hücrelerine ait GENC adezyon test görüntüleri- devam 2**

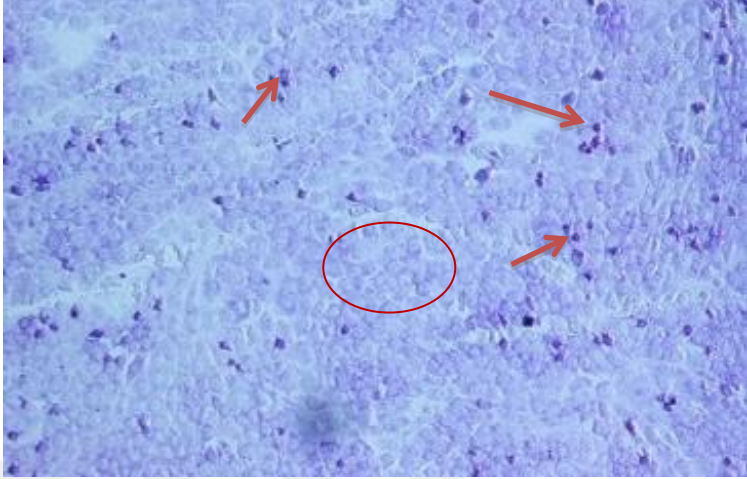
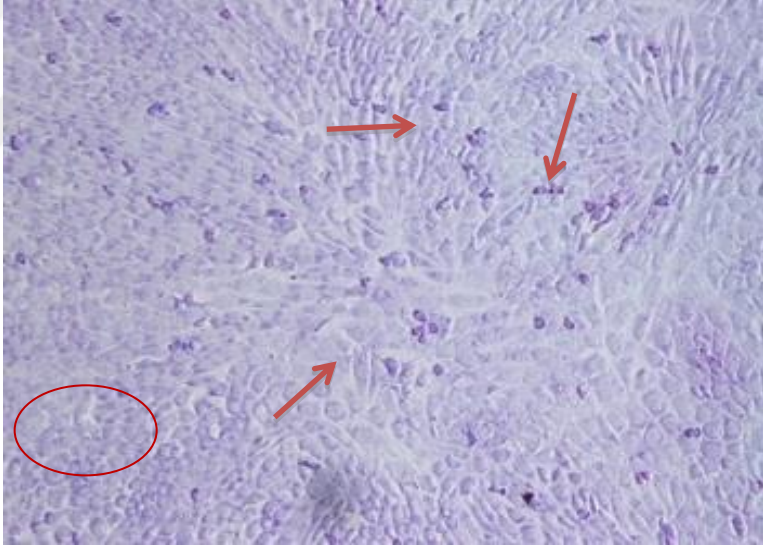
Aktivasyon Şartı	10X Büyütme
(-) kontrol (Normoglisemi)	

Tablonun birinci sütununda endotel hücre tabakasının maruz bırakıldığı aktivasyon şartları başlık halinde verilmiştir. İkinci sütunda adezyon testinde aktive edilen ve edilmeyen endotel hücre tabakasına yapışmış monosit/makrofaj hücrelerinin fotoğrafları görülmektedir. Fotoğraflarda kırmızı okla gösterilen koyu ve sınırları daha belirgin hücreler T lenfosit hücreleridir. Endotel tabakaları yuvarlak ince kırmızı belirteçle gösterilmiştir.

**Tablo 14. T lenfosit hücrelere ait GENC adezyon testi görüntülemeleri**

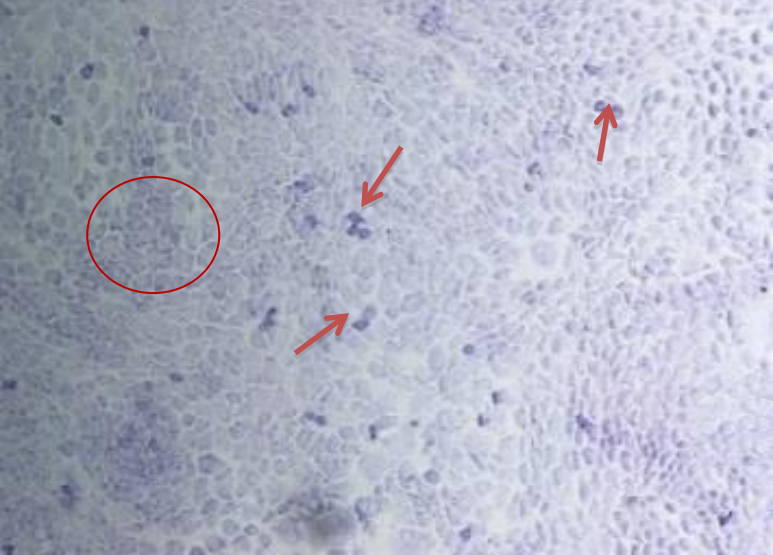
<b>Aktivasyon Şartı</b>	<b>10X Büyütme</b>
Tip I DM	
Tip II DM	

**Tablo 14. T lenfosit hücrelere ait GENC adezyon testi görüntülemeleri- devam 1**

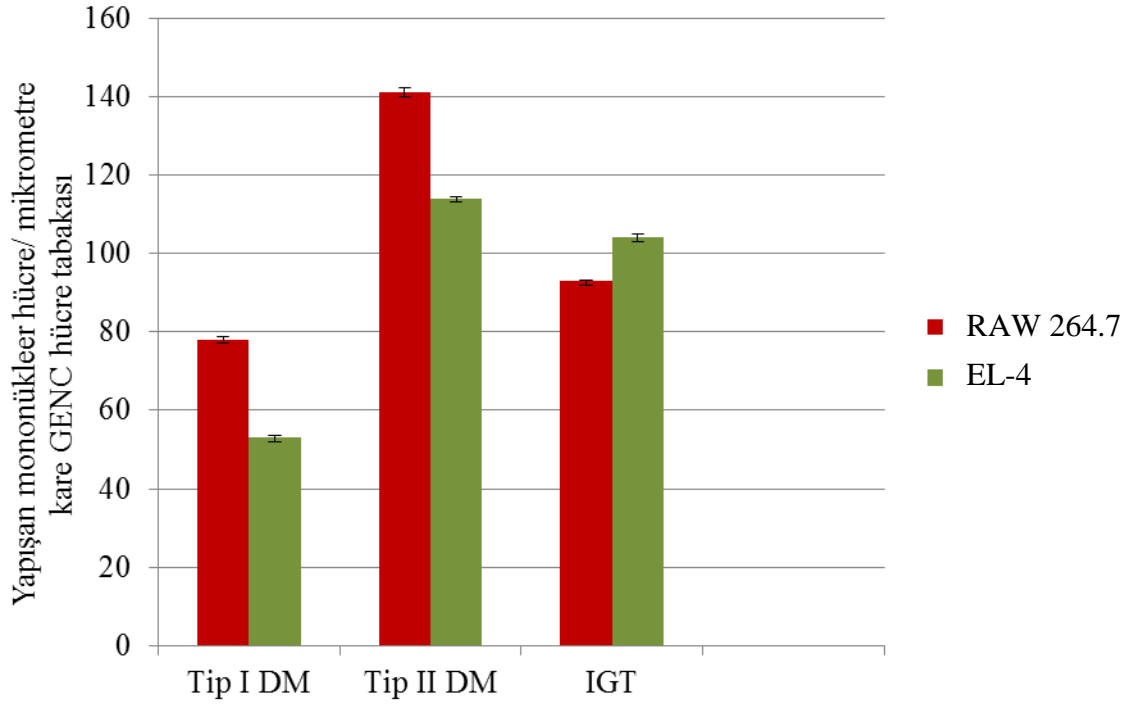
<b>Aktivasyon Şartı</b>	<b>10X Büyütme</b>
IGT	
(+ ) kontrol	



**Tablo 14. T lenfosit hücelere ait GENC adezyon testi görüntülemeleri- devam 2**

Aktivasyon Şartı	10X Büyütme
(-) kontrol (Normoglisemi)	

Tablonun birinci sütununda endotel hücre tabakasının maruz bırakıldığı aktivasyon şartları başlık halinde verilmiştir. İkinci sütunda adezyon testinde aktive edilen ve edilmeyen endotel hücre tabakasına yapışmış T lenfosit hücrelerinin fotoğrafları görülmektedir. Fotoğraflarda kırmızı okla gösterilen koyu ve sınırları daha belirgin hücreler T lenfosit hücreleridir. Endotel tabakaları yuvarlak ince kırmızı belirteçle gösterilmiştir.



**Şekil 16. RAW 264.7 monosit/makrofaj hücre ve EL-4 T lenfosit hücrelerin GENC hücrelerine bağlanma yüzdeleri**

Bar grafiğin ordinatı yapışan mononükleer hücre sayısını, apsisi endotel aktivasyon şartını gösterilmektedir. Mononükleer hücre çeşitleri farklı renklerde verilmiştir. Sonuçlar aktive edilmeyen çukurlardaki yapışma sayılarıyla normalize edilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi sadece IGT modelinde yapışan monosit sayısı T lenfositten fazla değildir.

GENC hücresi ve MAE hücresinin adezyon deney bulgularının karşılaştırmaları için MAE hücrenin Tip I DM modelindeki lökosit bağlanma, Tip I DM modelindeki RAW 264.7 monosit/makrofaj bağlanma ve Tip II DM modelindeki RAW 264.7 monosit/makrofaj bağlanmaların Ek 7'deki normalize edilmiş verileri kullanılabilir.

## **ENDOTEL HÜCRE FARKLI DİYABET STRESLERİNE KARŞI KORUYUCU GENLERİNİ FARKLI PROFİLDE İFADE ETMEKTEDİR-1**




### **Koruyucu Genlerin İfade Kinetikleri**

Diyabet stresleri altındaki MAE ve GENC hücrelerinde A1'ler, A20 ve HO-1 genlerinin en yüksek mRNA ifadesi zaman serisi içerisinde incelenmiştir. Elde edilen bulgular toplu incelendiğinde diyabet stresi altındaki endotel hücrelerinde ilgili gen mRNA ifadelerinin her gen için farklı kinetikte olmak üzere arttığı görülmektedir. GENC hücre aynı geni farklı diyabet stresi altında farklı kinetikle ifade etmektedir. Tip I DM stresi altındaki GENC ve MAE hücreleri her geni yine farklı kinetikte ifade etmektedir.

GENC hücrelerinde Tip I DM modelinde A1'ler mRNA'ları Şekil 17'de görüldüğü gibi 4. ve 6. saatlerde; A20 mRNA'sı 2. ve 4. saatlerde (Şekil 18); ve HO-1 mRNA'sı test edilen 2-6 saat boyunca (Şekil 19 ve Ek 5) ifade edilmektedir. En yüksek ifadenin A1'ler için 6. saatte, A20 için 4. saatte ve HO-1 için 4. saatte olduğu saptanmıştır.

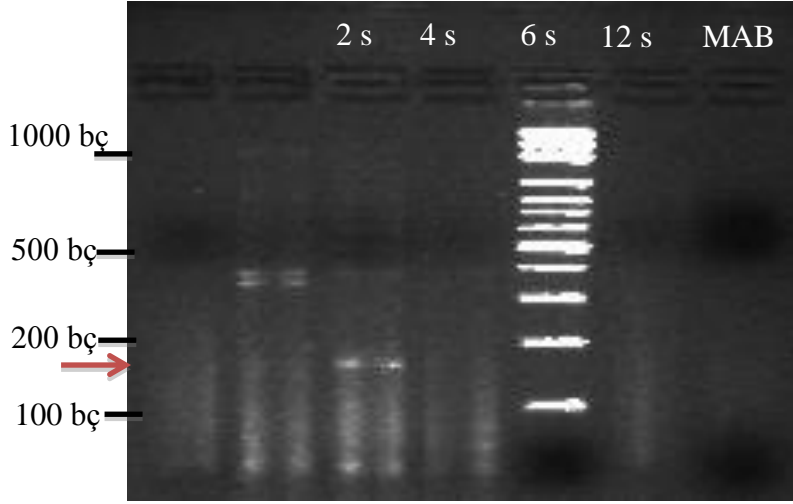
MAE hücrelerinde Tip I DM modelinde A1'ler mRNA'sının 2, 6. ve 24-48. saatlerde; A20 mRNA'sının 6. ve 24-48. saatlerde; HO-1 mRNA'sının 2, 6 ve 12-48. saatlerde ifade ettiği saptanmıştır. Tablo 15'deki ilgili görüntülerde en yüksek ifadelerin A1'ler ve A20 için 6. saat, HO-1 için 6. ve 48. saatler olduğu görülmektedir.

**Tablo 15. Tip I DM modelinde MAE hücresinde koruyucu genlerin mRNA ifade kinetiği**

Gen	Aktivasyon görüntüsü
A1'ler	2s 4s 6s 9s 12s 24s 48s 
A20	2s 4s 6s 9s MAB 12s 24s 48s 
HO-1	2s 4s 6s 9s 12s 24s 48s 

**MAB:** Moleküler ağırlık belirteci; **s:** Saat.

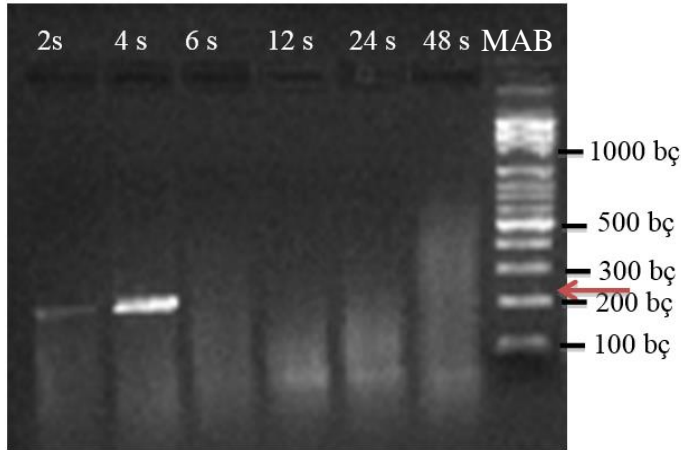
Tablonun ilk sütununda Tip I DM modelinde MAE hücresinde ifade kinetik çalışması genleri, ikinci sütunda aktive edilen endotel hücrelerin RT-PZR jel görüntüleri yer almaktadır. Jel görüntülerinin üst kısmında endotel hücrenin hangi periyotlarda aktive edildiği belirtilmiştir. Fotoğraflarda görüldüğü gibi MAE hücrelerinde A1'ler ve A20 mRNA'ları 6. ve 24-48 saatlerde; HO-1 mRNA'sı 2, 6, 12-48. saatlerde ifadenmektedir. Jellerde artefaktlara bağlı görüntüler olduğundan jel görüntüleri kesilmiştir



**MAB:** Moleküler ağırlık belirteci; **bç:** Baz çifti; **s:** Saat

### Şekil 17. Tip I DM modelinde GENC hücresinde A1'ler mRNA ifade kinetiği

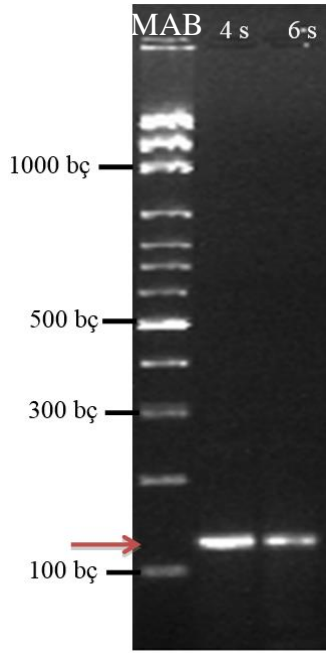
Şekilde endotel hücrelerin HO-1 mRNA ifadenmelerine ait jel görüntüsü gösterilmektedir. Endotel hücrelerin aktivasyon süreleri jel görüntüsünün üst kısmında bulunmaktadır. A1'ler mRNA'sının 4 ve 6. saalarda ifadelendiği görülmüştür. Deney 6. saat için bağımsız doğrulama deneyi ile doğrulanmıştır. Saatleri doğrulama deney görüntüleri Ek 5'de verilmiştir.



**MAB:** Moleküler ağırlık belirteci; **bç:** Baz çifti; **s:** Saat

### Şekil 18. Tip I DM modelinde GENC hücresinde A20 mRNA ifade kinetiği

Şekilde endotel hücrelerin HO-1 mRNA ifadenmelerine ait jel görüntüsü gösterilmektedir. Endotel hücrelerin aktivasyon süreleri jel görüntüsünün üst kısmında bulunmaktadır. A20 mRNA'sının 2-4. saatte ifadelendiği saptanmıştır. Deney 2-6. saatler için doğrulama deneyi ile doğrulanmıştır. Doğrulama deney görüntüsü Ek 5'de bulunmaktadır.



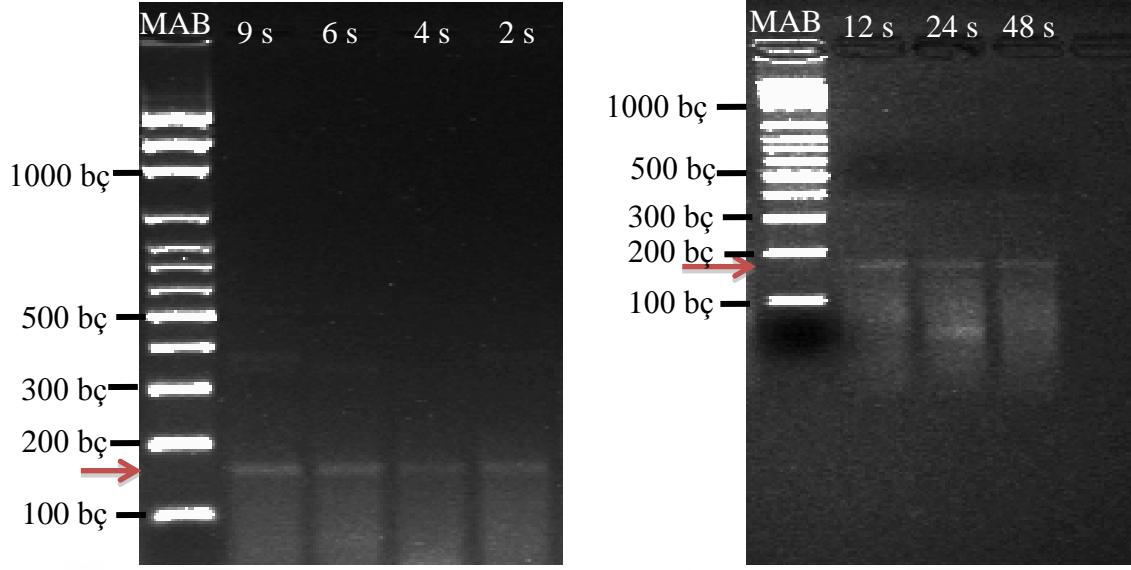
**MAB:** Moleküler ağırlık belirteci; **bp:** Baz çifti; **s:** Saat

### Şekil 19. Tip I DM modelinde GENC hücresinde HO-1 mRNA ifade kinetiği

Şekilde endotel hücrelerin HO-1 mRNA ifadelenmelerine ait jel görüntüsü gösterilmektedir. Endotel hücrelerin aktivasyon süreleri jel görüntüsünün üst kısmında bulunmaktadır. Şekildeki jel görüntüsü HO-1 mRNA ifade kinetiği birinci deneyine aittir. Buna göre HO-1 mRNA'sının 4-6. saatte ifadelendiği saptanmıştır. Ek 5'de 4-6. saatler için doğrulama deneyi gösterilmektedir. Bu deneyde ek olarak 2. saat aktivasyonu da bulunmaktadır.

GENC hücrelerinde Tip II DM modelinde A1'ler mRNA'sının 2-48. saatlerde (Şekil 20); A20 mRNA'sının 4-6. saatlerde (Şekil 21) ve HO-1 mRNA'sının test edilen 2-9. saat boyunca ifade ettiği (Şekil 22) saptanmıştır. A20 ifadesinin 6. saatte ve HO-1 ifadesinin 2-6. saatte en yüksek olduğu saptanmıştır. A1'lerde bir fark izlenmemiştir.

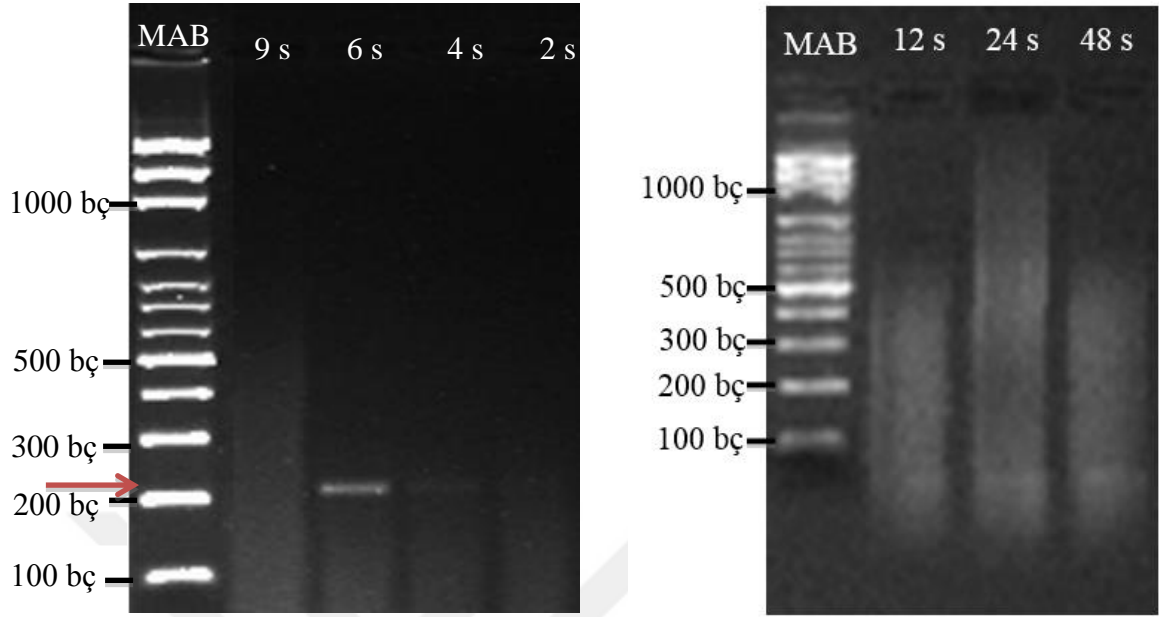
Verilerdeki ortak nokta, Tip I DM stresi altındaki GENC hücredeki A20 ifadesi hariç, genlerin 6. saatte endotel hücrelerde mutlaka ifade edildiğidir. Burada dikkat çeken bir nokta yüksek insülin konsantrasyonunun GENC hücrede Tip I modeline göre mRNA ifadelerini daha geniş süreye yayması, A1'lerin ifadesini 48 saate kadar uzatması ve en yüksek yanıtı burada izin vermemesi, A20 ve HO-1 ifadelerinin en yüksek yanıtlarını 2 saat geciktirmesidir. MAE ile ilgili dikkat çeken nokta ise genlerin MAE hücresinde erken ve geç olmak üzere mutlaka iki fazlı ifade edilmesi, ayrıca, en yüksek yanıt saatlerinin GENC'e göre A20'de 2 saat ve HO-1'da 4 saat gecikmesidir.



**MAB:** Moleküler ağırlık belirteci; **bç:** Baz çifti; **s:** Saat.

### **Şekil 20. Tip II DM modelinde GENC hüresinde A1'ler mRNA ifade kinetiği**

Şekilde endotel hücrelerin A1'ler mRNA'ları ifadenmelerine ait jel görüntüleri gösterilmektedir. Endotel hücrelerin aktivasyon süreleri jel görüntüsünün üst kısmında bulunmaktadır. A1'ler mRNA'sının aktivasyon sürelerinde ifade farklanması yapılmadığı görülmüştür.

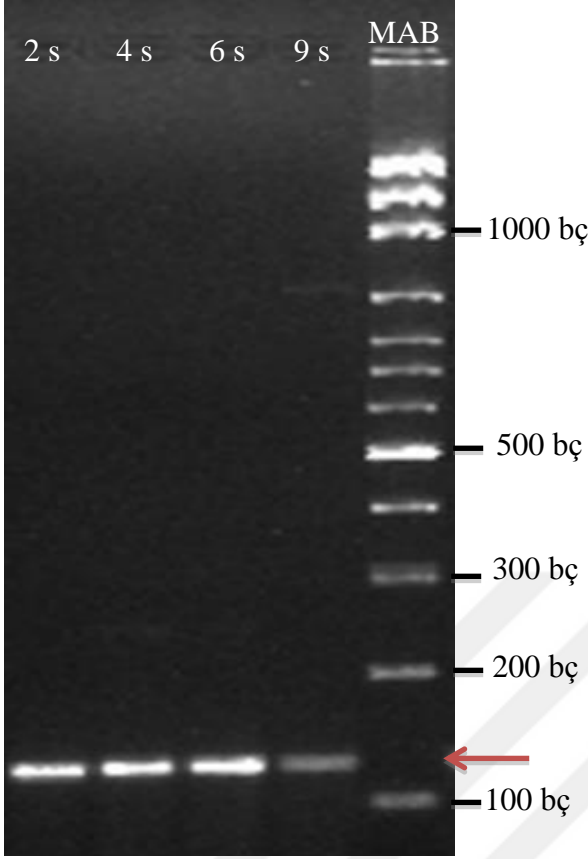


**MAB:** Moleküler ağırlık belirteci; **bç:** Baz çifti; **s:** Saat.

### Şekil 21. Tip II DM modelinde GENC hücresinde A20 mRNA ifade kinetiği

Şekilde endotel hücrelerin A20 mRNA ifadenmelerine ait jel görüntüleri gösterilmektedir. Endotel hücrelerin aktivasyon süreleri jel görüntüsünün üst kısmında bulunmaktadır. A20 mRNA ifadenmesinin 4. ve 6. saatlerde artmaktadır. Ancak 6. saatte güçlü bir ifadenme saptanırken 4. saatte ifadenmenin oldukça zayıfladığı bulunmuştur.





**MAB:** Moleküler ağırlık belirteci; **bç:** Baz çifti; **s:** Saat.

### **Şekil 22. Tip II DM modelinde GENC hücresinde HO-1 mRNA ifade kinetiği**

Şekilde endotel hücrelerin HO-1 mRNA ifadelenmelerine ait jel görüntüsü gösterilmektedir. Endotel hücrelerin aktivasyon süreleri jel görüntüsünün üst kısmında bulunmaktadır. HO-1 geninin Tip II DM’de 2, 4, 6 ve 9. saatlerde ifadelendiği ancak 9. saatteki ifadesinin çok daha az olduğu bulunmuştur.

Kinetik çalışmalarından elde edilen sonuçlar değerlendirilerek RT-PZR ile ifade saptama deneylerinde kullanılacak strese maruziyet saatleri belirlenmiştir. Pik saatler doğrudan kullanılırken Tip II DM stresinde A1’lerde bir fark gözükmediğinden literatürle uyumlu olarak 6. saat ve HO-1 için literatürle uyumlu olarak 4. saat seçilmiştir. IGT stresi için saatler de buna göre belirlenmiş ve A20 için Tip I DM modelindeki ifadenin daha güçlü olmasına dayanarak 4. saat seçilmiştir. Belirlenen saatler Tablo 15’te verilmiştir.

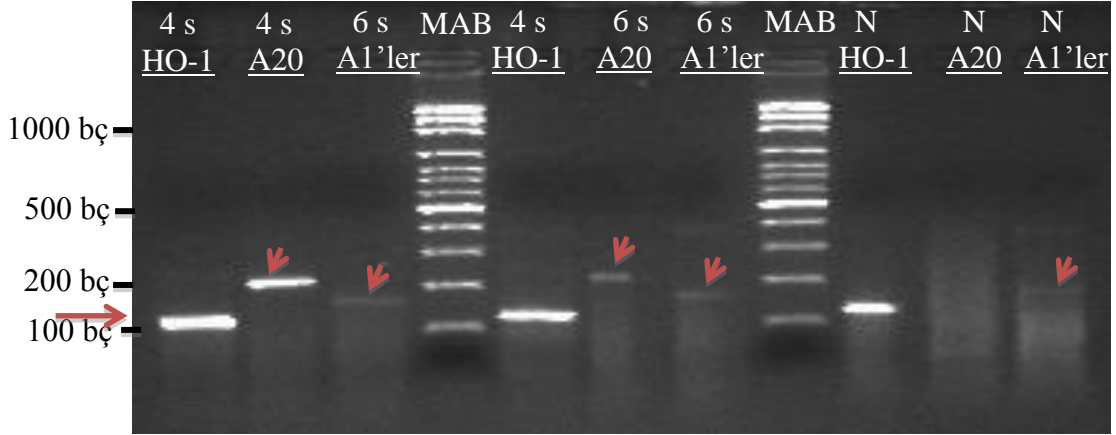
### **mRNA ifade seviyelerinin birbirleriyle RT-PZR yöntemi kullanılarak karşılaştırılması**

Her bir diyabet stresi başına her bir gen için belirlenen saatler kullanılarak endotel hücreler aktive edilmiş ve ilgili gen mRNA ifade seviyeleri paralel incelenmiştir. GENC hücresiyle elde edilen jel sonuçları Şekil 23’te gösterilmiştir. Burada görüldüğü gibi HO-1

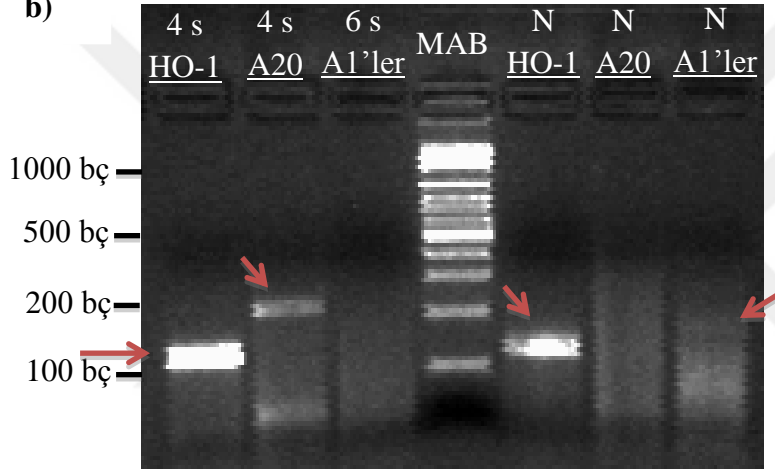
mRNA'sı tüm koşullarda, normoglisemik koşul dahil, diğerlerine göre yüksek düzeyde ifade edilmektedir. A20 mRNA'sının Tip I DM modelinde diğer modellere göre daha fazla ifade edildiği; A1'ler mRNA'sının Tip I ve Tip II DM'de, normoglisemik dahil, hafif ifade edildiği ve IGT modelinde ifadenin tamamen kaybolduğu gözlenmektedir.



a)



b)



**MAB:** Moleküler ağırlık belirteci; **bç:** Baz çifti; **s:** Saat; **N:** Normoglisemi

### Şekil 23. GENC hücrelerinin farklı diyabet modellerinde A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'larının ifade seviyelerinin karşılaştırılması

Şekil (a) GENC hücrelerinin Tip I, Tip II DM ve normoglisemik deney modellerinde A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'ları ifadelerini göstermektedir. Jel üzerinde tip I DM modelinde A1'ler için 6 saatlik, A20 ve HO-1 mRNA'ları için 4 saatlik aktivasyonu sonrası; Tip II DM modelinde A1'ler ve A20 mRNA'ları için 6 saatlik, HO-1 mRNA'sı için 4 saatlik aktivasyonu sonrası ifadelenmeleri ve her bir mRNA'nın normoglisemik koşuldaki ifadelenmeleri gösterilmiştir. Örneklere ait jel yükleme haritası jel görüntüsü üzerinde görülmektedir. Buna göre HO-1 mRNA'sının normoglisemi, Tip I DM ve Tip II DM şartlarında ifadelendiği ancak ifadelenenin Tip I DM ve Tip II DM'de normoglisemiye göre artış gösterdiği bulunmuştur. A20 mRNA'sının normalde ifade edilmediği Tip I DM'de ise Tip II DM'ye göre daha fazla ifadelendiği görülmüştür. A1'ler mRNA'larına bakıldığında ise ifadelenmede önemli bir değişime rastlanmamıştır. (b) GENC hücrelerinin IGT ve normoglisemik deney modellerinde A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'ları ifade kinetiklerini göstermektedir. Şekildeki jel üzerinde A1'ler için 6 saatlik, A20 ve HO-1 mRNA'ları için 4 saatlik aktivasyonu sonrası ifadelenmeleri ile her bir mRNA'nın normoglisemik koşuldaki ifadelenmeleri gösterilmiştir. Örneklere ait jel yükleme haritası jel görüntüsü üzerinde bulunmaktadır. Buna göre IGT'de HO-1 ve A20 mRNA'larının normale göre arttığı ancak A1'ler mRNA'sının ise mevcut ifadesinin kaybolduğu görülmektedir.

Normalize edilmiş sonuçları toplu olarak değerlendirildiğinde Tablo 16'daki bulgular elde edilmektedir. Buna göre, Tip II ve IGT modellerindeki yüksek insülin konsantrasyonu GENC hücresinde A20 ve HO-1 mRNA ifadesini yüksek glikoz stresine göre daha az indüklemektedir. Bu etki IGT modelindeki yüksek D-glikoz konsantrasyonu ile birleştiğinde HO-1 ifadesini arttırmaktadır. Tip I DM modelinde GENC ve MAE sonuçları karşılaştırıldığında büyük bir fark olmadığı görülmektedir. Sonuç olarak endotel hücrelerin farklı diyabet koşuluna karşı koruyucu genlerini farklı profilde ifade ettiği anlaşılmaktadır.

**Tablo 16. GENC ve MAE hücrelerinin farklı diyabet modellerinde A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA ifadelerinin RT-PZR ile ölçüm sonuçları**

Hücre	Deney modeli	A1'ler	A20	HO-1
GENC	Tip I DM	++	+++++	++++
	Tip II DM	++	+	++
	IGT	-	+	+++
MAE	Tip I DM	++	++++	+++++

Tabloda ilk sütunda hücre adı ve ikinci sütunda diyabet modeli yazılmıştır. Çapraz kutularda modele göre karşı gelen genin mRNA ifade miktarı verilmiştir. Miktar ölçümü RT-PZR ürünlerinin jeldeki bant yoğunlukları 1 ile 6 arasında artan skalayla manuel olarak göreceli değerlendirilmesiyle yapılmıştır. Görüldüğü gibi GENC hücrenin Tip II DM modelinde genel olarak mRNA ifadeleri zayıf bulunurken diğer modellerde A20 ve HO-1 güçlü ifade yapmıştır. A1'ler mRNA'sının her modelde zayıf ifadesi dikkat çekicidir.

## **ENDOTEL HÜCRE FARKLI DİYABET STRESLERİNE KARŞI KORUYUCU GENLERİNİ FARKLI PROFİLDE İFADE ETMEKTEDİR-2**

Farklı diyabet stresleri altındaki endotel hücrenin özellikle A1'ler mRNA'larını ifade seviyeleri daha yüksek çözünürlüklü qRT-PZR yönteminin çözünürlüğü ile tam detaylandırmıştır. Bunun için belirlenen saatlerde aktive edilen GENC hücrelerdeki koruyucu gen mRNA ifadeleri paralel karşılaştırılmıştır. Tablo 17'de görüldüğü gibi (verilerin ham dökümü Ek 6B'de) A1'ler mRNA'ları Tip I DM modelinde 2,4 kat artış, Tip II DM modelinde 1,4 kat artış gösterirken IGT modelinde ifade azalmıştır.

Normoglisemik GENC hücrede A20 mRNA'sının ifade seviyesi de qRT-PZR yöntemiyle detaylandırılabilmiştir. Buna göre A20 mRNA'sı Tip I DM modelinde 22 kat artış, Tip II DM modelinde 8 kat artış ve IGT modelinde yine 22 kat artış göstermiştir. Bu veriler göstermektedir ki Tip II DM stresinde yer alan yüksek insülin konsantrasyonu GENC

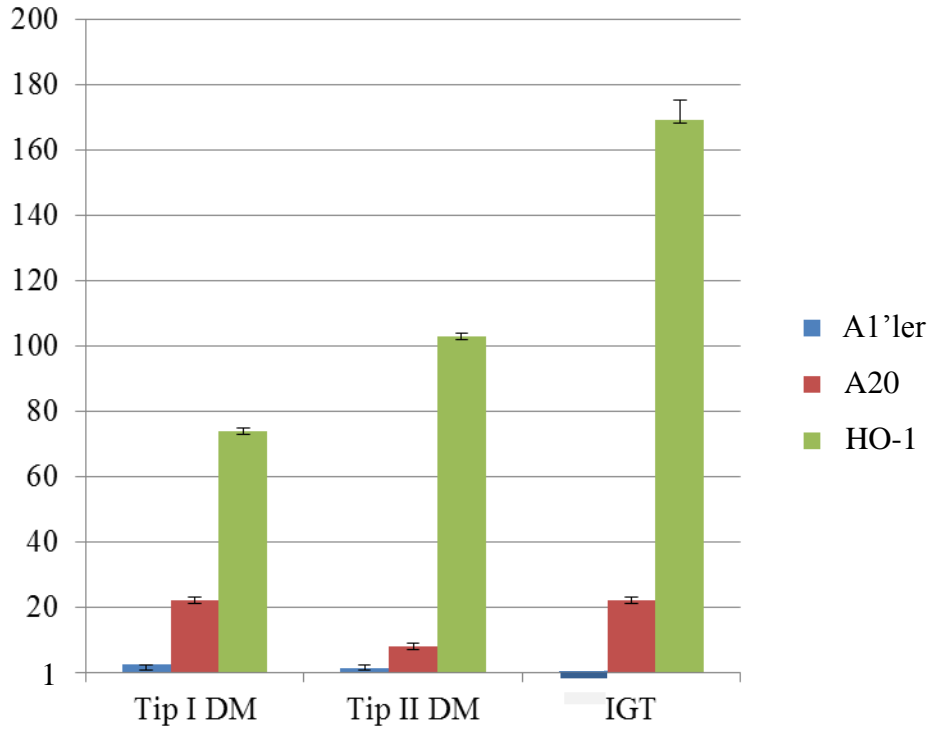
hücrelerinde A1'ler ve A20 mRNA ifadelerini Tip I DM stresine göre daha az indüklemektedir. Bu etki IGT modelindeki yüksek D-glikoz konsantrasyonu ile birleştiğinde A1'ler mRNA ifadesini bazal seviyenin de altına düşürmekte, A20 ifadesinin ise rekonstrüksiyonuna sessiz kalmaktadır. Yüksek insülin konsantrasyonu HO-1 ifadesi üzerinde ise tam tersine indüksiyon etkisi göstermektedir (Şekil 24). HO-1 mRNA'sı Tip I DM modelinde 74 kat, Tip II DM modelinde 103 kat ve IGT modelinde aditif 169 kat fazla ifade etmiştir.

**Tablo 17. GENC hücrede farklı diyabet modellerine göre A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'larının qRT-PZR ile ifade değişimi**

Diyabet modeli	Gen	Ortalama (kat artış)
Tip I DM	A1'ler	2,4
	A20	22
	HO-1	74
Tip II DM	A1'ler	1,4
	A20	8
	HO-1	103
IGT	A1'ler	0,7
	A20	22
	HO-1	169

$p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde tüm stres uygulamaları kontrole göre anlamlı bulunmuştur (A1'ler Tip II DM ve IGT hariç).

Tabloda Tip I, Tip II DM ve IGT diyabet modellerine göre GENC hücrelerdeki A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'larının ifade değişimleri gösterilmektedir. Tablodaki değerler HPRT-1 referans gen ile normalizasyon sonrası elde edilmiştir. Verilere göstermektedir ki A20 ve HO-1 genlerinin üç diyabet modelinde de koruyucu aktivite gösterirken A1'ler genleri ise Tip I ve Tip II DM modellerinde koruyucu aktiviteye zayıf katkısı bulunmaktadır. Bununla birlikte üç diyabet modelinde de HO-1 mRNA ifadelenmeleri A20'ye göre 2-3 kat fazladır.



**Şekil 24. GENC hücrede farklı diyabet modellerine göre A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'larının ifade değişimi**

Şekildeki bar grafiğin dikey ekseninde A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'larının diyabet modellerine göre artışları, yatay ekseninde diyabet modeli kısaltmaları gösterilmektedir. Grafikteki mavi bar A1'ler, kırmızı bar A20, yeşil bar HO-1 genini ifade etmektedir. Bar üzerinde verilerin standart sapma eğrileri bulunmaktadır. Grafiğe yansıtılan değerler referans gen HPRT-1'in mRNA ifadesi çıkarılarak normalize edilmiştir. Buna göre **HO-1 mRNA'sının** Tip I DM modelinde **74** kat, Tip II DM modelinde **103** kat, IGT diyabet modelinde **169** kat; **A20 mRNA'sının** Tip I DM modelinde **22** kat, Tip II DM modelinde **8** kat, IGT diyabet modelinde **22** kat; **A1'ler mRNA'sının** Tip I DM modelinde **2,4**; Tip II modelinde **1,4** kat arttığını bulunmuştur. A1'ler mRNA'sının IGT modelinde ise **0,7** kat azaldığı saptanmıştır. Grafiğe ait tüm veriler Ek 6B kısmında sunulmuştur.

Bu bulgular ışığında Tip I DM modelinde HO-1 mRNA'sı A20 genine göre 3 kat, A1'ler mRNA'larına göre ise 37 kat ve A20 geni A1'ler mRNA'larına göre 11 kat fazla ifadenmektedir. Tip II DM modelinde HO-1 mRNA ifadesinin A20 gen ifadesine göre 13 kat, A1'ler mRNA'ları ifadelerine göre 74 kat; A20 mRNA ifadesinin ise A1'ler mRNA'ları ifadelerine göre 6 kat arttığı görülmektedir. IGT modelinde ise HO-1 mRNA'sı A20 mRNA'sına göre 8 kat A1'ler mRNA'larına göre 241 kat ve A20 mRNA'sı A1'ler mRNA'larına göre 31 kat fazla ifade olmaktadır. Sonuç olarak qRT-PZR bulgularının da gösterdiği gibi endotel hücreler farklı diyabet streslerini birbirinden ayırt etmekte ve koruyucu genlerini buna göre farklı profilde ifade etmektedir.

## TARTIŞMA

Diyabet hastalarının kanında toksik miktarda glikoz ve/veya insülin bulunur ve her ikisi de endotel hücre zedelenmesine yol açar. *In vitro* artan mononükleer hücre adezyonu bulgularımızın da desteklediği gibi endotel hücre zedeleyiciyi içindeki veya dışındaki özgül resptörüyle tanır, aktiveşir ve stres yanıtı geliştirir. Hastalarda dolaşımdaki ve solid dokulardaki hücrelerin de diyabet streslerine stres proteinleri veya yangı ile tepki gösterdiği bilinmektedir. Bunun nedenlerinden birinin yüksek glikoz baskısının plazma ve matrikslerdeki moleküllerin glikozillenme pKa'sını değiştirmesi ve glikozillenerek eskimelerine yol açması olduğu gösterilmiştir. Sonuçta endotel hücreler zedeleyicinin süregen varlığına karşı yangı ve/veya apoptoz yanıtına ilerlerken eşzamanlı olarak diğer hücrelerin stres uyarılarına, değişen biyokimya ve fizyolojik sistem yanıtlarına da maruz kalır. Diyabet hastalıkları kronik seyrettiğinden fizyolojik sistem integratif olarak adaptif modda çalışmaktadır ve endotel hücreler de yanıtını adaptif modda damar lezyonu geliştirerek sürdürür. Diyabet hastalarının büyük kısmı yaşamını vasküler komplikasyonlardan yitirir (150). Hastalarda lezyon gelişiminin beklenenden yavaş olduğu dikkatleri çekmiş, yapılan çalışmalar sonunda endotel hücrelerin anti-oksidan, anti-yangısal ve anti-apoptotik etkili endotel-koruyucu genler aracılığıyla lezyon gelişimini yavaşlattığı gösterilmiştir (152, 153). Bu çalışmada A1'ler, A20 ve HO-1 endotel-koruyucu genlerin diyabet stresine yanıtta rol alması ilk defa birlikte araştırılmış ve özellikle A20 ve HO-1 genlerinin özgül ifade profillerinin yanıtta aktif rol aldığı gösterilmiştir. Bu ve benzeri bulgular heyecan vericidir, çünkü, koruyucu genleri hedefleyen drug kombinasyonları hastalarda vasküler komplikasyonları geciktirebilir.

Tip I ve Tip II DM stresi altındaki endotellerde HO-1 ve A20 genlerinin ifadesini arttırdığı diğer araştışıcılar tarafından gösterilmiştir (134, 152-154). Hou ve ark. yüksek glikoza maruz bırakılan HUVEC hücresinde A20 mRNA ifadesini 2. saatte göstermiş ve 24. saatte yok denecek kadar az olduğunu saptamıştır. HUVEC hücresine A20 genini transfeksiyonu ile A20 transfekte HUVEC hücresinde apoptozun gerilediğini göstermiştir (134). Abraham ve ark. Tip I DM hayvan modelinde HO-1 genini endotel hücresine kontrollü transfekte etmiş ve transfekte grupta endotel hücre zedelenmesinin azaldığını gösterilmiştir (118). Bu iki çalışma A20 ve HO-1 genlerinin Tip I DM'de endotel hücre koruyucu etkilerini açıkça göstermektedir. Çalışmamızda Tip I ve Tip II DM stres ifadeleri bulguları A20'nin ilkinde ve HO-1'in her ikisinde olmakla birlikte özellikle ikincisinde daha fazla koruma sağladığını saptamıştır. Çalışmamızda GENC hücresinde ayrıca A1'lerin mRNA'larında da artış gösterilmiştir. İfade seviyelerine toplu bakıldığında anti-apoptotik A1'ler mRNA'larının ortalama 2 katı civarı, yangı düzenleyici A20 mRNA'larının ortalama 15 kat civarı ve anti-yangısal HO-1 mRNA'larının HO-1 mRNA'sının ortalama 120 kat civarı seviyesini arttırdığı saptanmıştır. Diyabet stresi karşısında en fazla HO-1 ve daha sonra A20 mRNA'sının artması bu genlerin en fazla koruyucu olarak kullanıldığını düşündürmektedir. Bulgularımız literatürle bu açıdan uyumludur. Bu genlerinin ifadesinin miR379 tarafından belki ortak düzenlenmesi bu açıdan dikkat çekicidir.

Karsan ve ark. HUVEC hücresinin DAG analogu olan forbol esterlerle uyarılması sonucunda endotel hücresinde A1 mRNA'larının, 3. saat en yüksek olmak üzere, 3-6 saat ifade olduğunu göstermiştir (155). Duriez PJ ve ark ise TNF- $\alpha$  ile indüklenen endotel hücresinde A1'lerin çok daha yüksek seviyede ifade edildiğini göstermiştir (98). Bizim modellerimizde de teorik olarak yüksek glikozun tetikleyebileceği DAG sinyal yolağının ve NF- $\kappa$ B üzerinden TNF- $\alpha$  otokrin aktivasyonunun endotel hücresinde A1'lerin ifadenmesini arttırması beklenirdi. Ancak diğer araştışıcılar kullandıkları modellerde aktivatörleri suni olarak dışarıdan vererek endotel hücreyi aktive etmektedir. Oysa bizim modellerimizde yüksek glikoz dolaylı metabolik etkilerle endotel hücre aktivasyonu sağlamaktadır. Endotel hücreler stres tiplerini ayırt edebilme ve strese özđü yanıt verme davranışı göstermektedirler. Bu durumda çalışmaların karşılaştırılmasını uygun değildir. A1'ler genlerinin farklı uyarılarda ve hatta farklı yataktan gelen endotel hücresinde daha etkin iken diyabet streslerine karşı daha az etkin olduğunu düşündürebilir.

Farklı çalışmalarda endotel hücresinin Tip I DM ve/veya Tip II DM modellerindeki lökosit adezyonu incelenmiş ve çalışmamızla tutarlı olarak artan adezyon gösterilmiştir (156-



163). Diyabet hastalarında ve diyabet hayvan modellerinde ortama bağlı artan inflamasyon ile birlikte böbreğe monosit ve lenfosit infiltrasyonu saptanmıştır (156-167). Chow ve ark. *in vivo* Tip I ve Tip II DM çalışmalarında makrofaj infiltrasyonunun çoklu mekanizmalarla diyabetik nefropatiye yol açtığını göstermişlerdir (168, 169). Tip I DM, Tip II DM ve IGT diyabet hastalarında da çözünmüş adezyon moleküllerinden E-selektin ifadesinin arttığı ortaya konmuştur (170). Tüm bu bulgular diyabetik damar lezyonları ve diyabetik nefropatide vasküler adezyonun önemli rol oynadığını ve drug tasarımında hedeflenmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Endotel hücrenin farklı diyabet tipleri arasındaki farkı ne kadar ayırt ettiği ve koruyucu yanıtını ona göre ayarlayıp ayarlamadığı bir merak konusudur. Hastalarda farklı diyabet tiplerinde farklı vasküler lezyonların geliştiği izlenmiş, önceki çalışmalarımızda HUVEC hücrelerinin farklı diyabet tipleri ve farklı sigara kondesantlarına karşı özgül adezyon profili yaptığı göstermiş, ancak mekanizma tam açıklığa kavuşturulmamıştır (149, 171). Bu çalışmada endotel hücrenin Tip I DM, Tip II DM ve IGT diyabet stresi altındaki; (a) monosit ve T lenfosit adezyonu profilleri; ve (b) A1'ler, A20 ve HO-1 koruyucu genlerinin mRNA ifade profilleri karşılaştırmalı incelenmiştir. Çalışmamızın qRT-PZR verileri göstermektedir ki Tip I DM koşulunda incelenen her genin mRNA'sı farklı oranda artmaktadır. Tip II DM koşulundaki yüksek insülin konsantrasyonu A1'ler ve A20 mRNA ifadesini Tip I DM koşulu kadar arttıramamakta ancak HO-1 mRNA ifadesini daha fazla indüklemektedir. Bu etki IGT modelindeki yüksek D-glikoz konsantrasyonu ile birleştiğinde A1'ler ifadesi bazal seviyenin altına düşmekte, Tip I DM'deki A20 ifadesi tekrar yakalanmakta ve HO-1 ifadesi aditif artmaktadır. A20 geni hücre içinde ubiquitinasyon ve deubikütinasyon yollarını beraber kontrol etmektedir. A20'nin bu özgül davranışı Tip I DM'de diğer modellere göre stres yanıt algoritmasında birden çok gen ile birlikte çalıştığını düşündürebilir. IGT modelinde A20'nin artışı bu görüşü desteklemektedir. IGT modelinde HO-1 ifadesindeki aditif artışın A20'de görülmemesi bu modelde farklı koruyucu genlerin çalıştığını düşündürmektedir. A1'ler genlerinin bazal ifadesinin azalması bu görüşü desteklemektedir.

Çalışmamızın gen ifade kinetiği verileri göstermektedir ki yüksek insülin konsantrasyonu GENC hücresinde Tip I modeline göre ifadeleri biraz daha uzun süreye yaymakta, A1'ler ifadesini 48 saate kadar uzatmakta, A20 ve HO-1 ifadelerinin pik yanıtlarını 2 saat kadar gecikmeye yaymakta ve A1'ler pik yanıtına ilk 48 saat içinde yol vermemektedir.

Adezyon raporları ve verilerimize bakıldığında bir çalışmada Tip II DM hastalarının plazmasında VCAM-1 ve ICAM-1 miktarı Tip I DM ve IGT hastalarınınkine göre arttığı saptanmıştır (170). Biz de Tip II DM modelinde en yüksek mononükleer hücre bağlanmasını elde ettik. Bu bulgular düşündürmektedir ki Tip II DM hastaları böbrek lezyonlarına infiltrasyon açısından daha yüksek risk altındadır (172). Ayrıca çalışmamızda Tip I DM ve Tip II DM streslerinin GENC hücresinde monosit/makrofaj adezyonunu CD4+ T lenfosit adezyonuna göre arttırdığı, ancak bu artışın IGT stresinde ortadan kalktığı gösterilmiştir. Bu da IGT'de glomerüler lezyonlardan CD4+ T lenfositlerinin de sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Çalışmada saptadığımız gibi Tip II DM stresi altındaki aortik endotel hücrenin Tip I DM modeline göre daha az lökosit adezyonu yapması, Tip I DM hasta arterlerinde köpüksü hücreye daha sık rastlaması ile uyumludur.

Sonuçlar toplu değerlendirildiğinde Tip I DM hastalarında monositlerin yardımcı T lenfositlerine göre mikro ve makro vasküler yataklardaki endotel hücre apikal yüzeyine infiltrasyon olasılığı majör olabilir. A20 ve HO-1 genlerinin ve özellikle A20 geninin geç dönemde koruyucu rolü majör olabilir. Tip II DM hastalarında ise mikro vasküler yataklarda yardımcı T lenfositlerinin ve makrovasküler yataklarda monositlerin endotel hücre apikal yüzeyine infiltrasyon olasılığı majör olabilir. Bunda HO-1 geninin koruyucu rolü majör önemde düşünülebilir. IGT hastalarında mikrovasküler yataklarda yardımcı T lenfositlerinin Tip II DM hastalarındakine göre endotel hücre apikal yüzeyine çok daha yüksek miktarda infiltrasyonu majör beklenebilir. IGT'de A20 ve HO-1 genlerinin birlikte koruyucu olduğu ve özellikle HO-1 geninin majör önemde olduğu düşünülebilir.

Bulgularımız diyabette endotel hücrenin her diyabet koşuluna farklı profilde yanıt verdiğini, bu nedenle koruyucu drug tasarımında diyabetin tipine özgül yaklaşımların sergilenmesi gerektiğini düşündürmektedir. Bir araştırmacı tarafından streptozotosin ile indüklenmiş Tip II DM diyabetik sıçanlarda endotelyuma bağımlı vasküler relaksasyon anormalitelerinin HO-1 indüksiyonu ardından iyileştiği gösterilmiştir (154). Yüksek glikoza maruz bırakılan insan koroner endotel hücrelerinin ve A20 gen defektli transgenik ve A20 gen defektsiz diyabetik sıçanların inflamatuvar uyarılarla uyarıldığında *in vitro ve in vivo* yüksek A20 mRNA ve daha az seviyede A20 protein ifadesi yaptıkları saptanmıştır (148). Bu sonuçlar diyabetik nefropatiye veya diğer vasküler patolojilere karşı koruyucu genler veya gen ürünleri kombinasyonlarının terapötik olarak tasarlanabileceğini düşündürmektedir. Paralel olarak tip I hastalarında intimaya infiltre CD4+ T hücreleri tarafından makrofajların köpüksü hücrelere dönüştürülmesine ve ortaya gecikmiş tip aşırı duyarlık reaksiyonu

çıkmasına karşı hedefleyici tedavi tasarımları ele alınabilir. Tip II DM ve IGT hastalarında ise apikal yüzeye göç eden yardımcı T hücrelerinin muhtemel DAMP'lara karşı gelişecek edinsel hümmoral yanıtı yol vermemesi için hedefleyici tedavi tasarımları öncelikle düşünölebilir.

Çalışmamızdaki koruyucu genlerle etkili hedefleyici tedavi tasarımları düşünölrken Tip I DM hastaları için A1'ler/A20/HO-1 ifade oranlarının 1/10/30; Tip II DM hastaları ve IGT hastaları için A20/HO-1 ifade oranlarının sırasıyla 1/10 ve 1/7 olarak tasarlanabilir. Doz olarak da Tip I DM ve IGT hastalarına, Tip II DM için düşünölebilecek dozun iki katı planlanabilir. Şüphesiz daha geniş koruyucu gen paneli ile yapılacak tasarımlar daha ümit vaat edici olacaktır.

Endotel koruyucu genlerin ifadelerinin düzenlenmesiyle ilgili miRNA çalışmaları kısıtlıdır ancak ilaç tasarımı açısından ümit vaat edicidir. A20 geninin Tip I DM modelinde miR125 ve/veya miR417 ile düzenlendiğı gösterilmiştir (173, 174). Çalışmamızda genlerin miRNA'ları incelenmiş ve farklı düzenleyicilerle düzenlendiğı, ancak, miR-379'un A20 ve HO-1 genlerini birlikte düzenlediğı görölmüştür. Bu genlerin miR-379 ile sadece diyabet stresinde mi düzenlendiğı bilinmemektedir.

Farklı vasköler yataklardaki endotel hücrelerin aynı uyarıya bazen farklı yanıt verdiğı gösterilmiştir (175). Çalışmamız böbrek glomeröler endotel hücre (GENC) modelinde yapılmış, gerektiğinde karşılaştırma için aortik endotel hücre (MAE) kullanılmıştır. Bazı koruyucu genlerin tüm vasköler yataklardaki endotel hücreler için tüm streslere karşı ortak koruyucu olabileceğı değışik araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (82, 89, 157), ancak ortak olmayan koruyucu genler yatağı özgü olabilir. Tip I DM stresi altındaki MAE hücrelerinde koruyucu gen mRNA ifadelerinin, GENC hücredekilerden farklı olarak, iki fazlı yapıldığı ve pik ifade seviyelerine farklı saatlerde ulaşıldığı görölmektedir. Benzer şekilde Tip I DM modelindeki adezyon sonucumuz MAE'nin GENC'e göre monositleri %32 daha fazla bağıladığını göstermektedir. Diğer çalışmalardaki gibi bulgularımız farklı yataklardaki endotel hücrelerin bazen farklı yanıt verdiğini göstermiştir. Bunların sebebi farklı vasköler yataklardaki endotellerin farklı sinyal algoritmaları kullanarak farklı yangı tarzlarını koruyucu benimsemesi olabilir. Sonuçlar endotel hücre hedefleyici drug geliştirirken vasköler yatağı da eş zamanlı hedeflenebileceğini düşöndürmektedir.

## SONUÇLAR

1. Endotel hücrenin farklı diyabet streslerini birbirinden ayırt ederek her birine farklı yanıt profili geliştirdiği çalışmada ortaya konmuştur. Bu bulgu orijinaldir ve drug tasarımını yönlendiricidir. Karşılaştırmalı yanıt bulguları toplu halde Ek 7’de görülmektedir.
2. Bu çalışmada, mikrovasküler GENC ve makrovasküler MAE endotel hücre hatlarıyla Tip I DM, Tip II DM ve IGT streslerine yanıt veren fare *in vitro* araştırma modelleri geliştirilmiştir. Hatların yanıtla ilgili özellikleri karakterize edilmiştir. Özellikle IGT ve Tip II DM stresine yanıt ölçme tasarımı orijinaldir ve ileriki araştırmalara katkı sağlar.
3. Çalışmada, kan lökosit izolasyonunda kullanılabilir pratik ve ucuz yoğunluk gradienti sağlayan yeni ayıraç geliştirilmiştir.
4. Çalışmanın bilişim bulguları A20 ve HO-1 gen ifadelerinin miR379 tarafından ortak düzenlenebilme olasılığını ortaya koymuştur.
5. Çalışmada, farklı vasküler yatlardan gelen endotel hücrelerin aynı diyabet stresine karşı farklı yanıt geliştirebildiği gösterilmiştir

## ÖZET

Tez çalışmamızda endotel hücrelerin farklı diyabet streslerine özgül yanıtlarında literatürde henüz aydınlatılmamış iki noktaya odaklanılmıştır. Bu noktalar hangi diyabet stresinin endotel hücreyi hangi lökosit kombinasyonunda infiltrasyona iteklediği ve hangi koruyucu gen ifadesine sürüklendiğidir. Bu çalışmada olarak adezyon testi ile monosit ve T lenfosit hücrelerin glomerüler endotel tabakalara *in vitro* yapışma profili ve RT-PZR yöntemiyle A1'ler, A20, HO-1 koruyucu gen mRNA'larının endotel hücrelerde ifade profili karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre; (1) endotel hücrelere monositlerin Tip I DM modelinde sırasıyla Tip II DM ve IGT modellerine göre 0,5 ve 0,8 kat, T lenfositlerin ise sırasıyla Tip II DM ve IGT modellerine göre 0,4 ve 0,5 kat daha az yapıştığı; A1'ler/ A20/ HO-1 mRNA'larının hücrelerde sırasıyla 2,4/ 22/ 74 kat fazla ifade edildiği; (2) monositlerin Tip II DM modelinde Tip I DM modeline göre 1,8 kat, IGT modeline göre ise 1,1 kat, T lenfositlerin Tip I DM modeline göre 2 kat, IGT modeline göre 1,5 kat daha fazla yapıştığı; aynı mRNA'ların hücrelerde sırasıyla 1,4/ 8/ 103 kat fazla ifade edildiği; (3) monositlerin IGT modelinde Tip I DM modeline göre 1,1 kat fazla, Tip II DM modeline göre 0,6 kat az yapıştığı, T lenfositlerin IGT modelinde Tip I DM modeline göre 1,9 kat fazla, Tip II DM modeline göre ise 0,9 kat az yapıştığı; aynı mRNA'ların hücrelerde sırasıyla 0,7/ 22/ 169 kat fazla ifade edildiği bulunmuştur. Koruyucu gen ifade yanıtının glomerüler hücrelerde tek ve aortik hücrelerde iki fazlı geliştiği belirlenmiştir. Elde edilen bulgular değişik tipte diyabet stresinin mononükleer hücre adezyon ve adaptif yanıtını endotel hücrelerde nasıl farklı uyardığını göstermiştir. Özellikle glomerüler lezyon gelişimini engelleyici ve modifiye edici farmakoterapötiklerin geliştirilmesi düşünüldüğünde hangi

lökosit ve koruyucu genin hangi diyabet tipinde öncelikli hedeflenmesi gerektiği ortaya konmuş, antagomir drug tasarımında hedeflenebilecek olası miRNA'lar saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** endotel hücre, diyabet, koruyucu gen



# **MONONUCLEAR CELL BINDING AND PROTECTIVE GENE EXPRESSION RESPONSES OF THE ENDOTHELIAL CELLS UNDER DIFFERENT DIABETES STRESSES**

## **SUMMARY**

In this dissertation stress specific responses of the varied diabetes stresses in endothelial cells were studied by focusing two points which had not been lightened yet in literature. These points are, which diabetes stress push endothelial cells which type of infiltrative leukocyte combination, and which type of protective gene expression. In the study, *in vitro* adhesion profiles of the monocytes and T lymphocytes on the aortic and glomerular endothelial cell layers, which were activated by varied types of diabetes stress, and, mRNA expression profiles of the A1s, A20, HO-1 protective genes again in the same endothelial cells under similar activation conditions have been identified. According to the findings obtained; (1) in type I DM model, monocytes adhere to the endothelial cells 0,5 and 0,8 times less compared to type II and IGT models respectively; while T lymphocytes adhere 0,5 and 0,8 times less compared to type II and IGT models respectively, A1s/ A20/ HO-1 mRNAs are expressed 2,4/ 22/ 74 times more in cells respectively; (2) monocytes adhere 1,8 times more in type 2 DM model compared to type I DM model, and 1,5 times more compared to IGT model; the same mRNAs are expressed 1,4/ 8/ 103 times more in cells respectively, the same mRNAs are expressed 1,4/ 8/ 103 times more (3) monocytes adhere 1,1 times more in IGT model compared to type I DM model, and 0,6 times less compared to type II DM model, while T lymphocytes adhere 1,9 times more in IGT model compared to type 1 model, and 0,9

times less compared to type II DM model; the same mRNAs are expressed 0,7/ 22/ 169 times more in cells respectively. The results revealed that which molecules in which ratio should be targeted for inhibition of varied pathological process in endothelial cells in response to varied diabetes stress, and modifying the adaptif response. These results will enlighten the adjustments of drug combinations when concerned about development of relevant pharmacoterapeutics.

**Key words:** endothelial cells, diabetes, protective genes.





## KAYNAKLAR

- 1- Grundy SM, Benjamin IJ, Burke, GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV et al. Diabetes and cardiovascular disease a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1999;100:1134-1146.
- 2- Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Circulation* 2003;108:1527-1532.
- 3- Shi W, Haberland ME, Jien ML, Shih DM, Lusis AJ. Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice. *Circulation* 2000;102:75-81.
- 4- Messner B, Frotschnig S, Steinacher-Nigisch A, Winter B, Eichmair E, Gebetsberger J, et al. Apoptosis and necrosis: two different outcomes of cigarette smoke condensate-induced endothelial cell death. *Cell Death Dis* 2012;3:e424.
- 5- Davies PF, Polacek DC, Handen JS, Helmke BP, DePaola N. A spatial approach to transcriptional profiling: mechanotransduction and the focal origin of atherosclerosis. *Trends in Biotechnology* 1999;17:347-351.
- 6- Suschek CV, Schnorr O, Hemmrich K, Aust O, Klotz LO, Seis H et al. Critical role of L-arginine in endothelial cell survival during oxidative stress. *Circulation* 2003;107:2607-2614.
- 7- Berk BC, Abe JI, Min W, Surapısıtchat J, Yan C. Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:93-111.
- 8- Yaylalı YT, Küçükaslan M. Endotel disfonksiyonu. *Pamukkale Tıp Dergisi* 2011;4(3):152-157.

- 9- Yazır Y, Dalçık H. Vasküler patolojilerin araştırılmasında önemli bir araç: endotel hücre kültürü. *Koşuyolu Kalp Dergisi* 2011;15:137-142.
- 10- Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology*. 10th ed. International Edition. New York, Mc Graw-Hill Co; 2003:215-31.
- 11- Gottlieb A, Langille B, Wong M, Kim D. Structure and function of the endothelial cytoskeleton. *Lab Invest* 1991;65:123.
- 12- Sugahara K, Mikami T, Uyama T, Mizuguchi S, Nomura K, Kitagawa H. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol* 2003;13:612-620.
- 13- Mertens G, Cassiman JJ, Van den Berghe H, Vermylen J, David G. Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. *JBC* 1992;267:20435-20443.
- 14- Henry CB, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol* 1999;277:508-514.
- 15- Van Neck J, Bloemers H. Molecular aspects of pathological processes in the artery wall. *Mol Biol Rep* 1993;17:1-15.
- 16- Guyton AC, Hall, JE (Çev: Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ). *Tıbbi Fizyoloji*, 11. Basım. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi; 2007.
- 17- Shier D, Butier J, Lewis R. *Student Study Guide for Hole's Human Anatomy and Physiology*. 7th edition, Wm C Brown Publishers; 1996.
- 18- Sakai T, Hosoyamada Y. Are the precapillary sphincters and metarterioles universal components of the microcirculation? An historical review. *J Physiol Sci* 2013; 63(5): 319-331.
- 19- Rovenska E, Rovenski J. Lymphatic vessels: structure and function. *IMAJ* 2011; 13(12): 762-8.
- 20- Dejana E. Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest* 1996;98:1949.
- 21- Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *The FASEB Journal* 1995;9:910-918.

- 22- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 1992;99:683-690.
- 23- Oldenburg J, Rooij Jd. Mechanical control of the endothelial barrier. *Cell Tissue Res* 2014;355:545-555.
- 24- Köksel T, Güteryüz A. Kan-Beyin Bariyeri. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2012;2:94-99.
- 25- Prasain N, Stevens T. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res* 2009;77:53-63.
- 26- Lum H, Malik AB. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74:787-800.
- 27- Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell* 2013;26:441-454.
- 28- Jones JC, Hopkinson SB, Goldfinger LE. Structure and assembly of hemidesmosomes. *Bioessays* 1998;20:488-494.
- 29- Schwartz EL. Antivascular actions of microtubule-binding drugs. *Clin Cancer Res* 2009;15:2594-2601.
- 30- Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 2004;93:105-113.
- 31- Beckman J. Pathophysiology of vascular dysfunction in diabetes. *Cardiology Rounds* 2004;8(10):99-105.
- 32- Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006;86:279-367.
- 33- Hirose A, Tanikawa T, Mori H, Okada Y, Tanaka Y. Advanced glycation end products increase endothelial permeability through the RAGE/Rho signaling pathway. *FEBS letter* 2010;584:61-66.
- 34- Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:10417-10422.

- 35- Moncada S, Palmer R, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Phar Rev* 1991;43:109-142.
- 36- Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 2001;106:675-683.
- 37- Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. In: Pinsky MR, Brochard L, Mancebo J, Antonelli M (Eds.). *App Physiol Int C Med* 2. 3<sup>rd</sup> ed. Springer; 2012; p.237-249.
- 38- Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, Houston DS. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann Rev Physiol* 1986;48:307-320.
- 39- Björk J, Hedqvist P, Arfors KE. Increase in vascular permeability induced by leukotriene B4 and the role of polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 1982;6:189-200.
- 40- Gezer S. Vasküler endotel fonksiyonu ve fibrinolitik aktivite. *Türk Hematoloji Derneği Hematolog* 2012, 2;2, 112-123.
- 41- Lorant DE, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-acting factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cell by promoting leukocyte adhesion. *Semin Cell Biol* 1995;6:295-303.
- 42- Işık M, Güven GS, Haznedaroğlu İC. Antikoagülan tedavi: klinik yaklaşımlar. *İç Hastalıkları Dergisi*, 2005;12(2):10-24.
- 43- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-3561.
- 44- Brinkman HJM, Mertens K, Holthuis J, Zwart-Huinink LA, Grijm K, Mourik JAV. The activation of human blood coagulation factor X on the surface of endothelial cells: a comparison with various vascular cells, platelets and monocytes. *Br J Haematol* 1994;87:332-342.
- 45- Rosenberg R, Rosenberg J. Natural anticoagulant mechanisms. *J Clin Invest* 1984;74:1-6.
- 46- Woolkalis MJ, DeMelfi Jr TM, Blanchard N, Hoxie JA, Brass LF. Regulation of thrombin receptors on human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:9868-9875.
- 47- Tollefsen DM, Pestka CA. Heparin cofactor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure. *Blood* 1985;66:769-774.

- 48- Yılmaz M, Cengiz M, Çeray Y, Ramazanoğlu A. Travma ve Koagülasyon. J Turk Soc Int C 2011;9:71-76.
- 49- Kato H. Regulation of Functions of Vascular Wall Cells by Tissue Factor Pathway Inhibitor Basic and Clinical Aspects. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2002;22:539-548.
- 50- Roelofs JJ, Rowshani AT, Van den Berg JG, Claessen N, Aten J, Berge IJ et. al. Expression of urokinase plasminogen activator and its receptor during acute renal allograft rejection. Kidney Int 2003;64:1845-1853.
- 51- Schmaier A, McCrae K. The plasma kallikrein–kinin system: its evolution from contact activation. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2007;5:2323-2329.
- 52- Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. Br J Haematol 2005;129:307-321.
- 53- A.D.Association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2013;36:S67-S74.
- 54- Abacı A, Böber E, Büyükgebiz A. Tip 1 Diyabet. Güncel Pediatri 2007;5:1-10.
- 55- Akalın S, Günay T. Gebelikte Diyabet ve Balçova Deneyimi. Sürekli Tıp Eğitim Dergisi 2002;11:366-368.
- 56- Baynes JW. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. Diabetes 1991;40:405-412.
- 57- Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. Diabetes 1999;48:1-9.
- 58- Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. Türk Biyokimya Dergisi 2006;31:51-56.
- 59- Vanhoutte P, Shimokawa H, Tang E, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. Acta Physiol 2009;196:193-222.
- 60- Durier S, Fassot C, Laurent S, Boutouyrie P, Couetil JP, Lacolley P et al. Physiological genomics of human arteries quantitative relationship between gene expression and arterial stiffness. Circulation 2003;108:1845-1851.

- 61- Li T, Tian H, Zhao Y, An F, Zhang L, Zhang J et. al. Heme oxygenase-1 inhibits progression and destabilization of vulnerable plaques in a rabbit model of atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology* 2011;672:143-152.
- 62- Copeland RJ, Bullen JW, Hart GW. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am J Physiol Endocrinol M* 2008;295:E17-E28.
- 63- Zhang Z, Apse K, Pang J, Stanton RC. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:40042-40047.
- 64- Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicology Letters* 2003;140:105-112.
- 65- Park JY, Ha SW, King G. L. The role of protein kinase C activation in the pathogenesis of diabetic vascular complications. *Peritoneal Dialysis International* 1999;19:222-227.
- 66- Browlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complication. *Nature* 2001;414:813-820.
- 67- Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1992;15:1835-1843.
- 68- Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T et al. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1997;46:1481-1490.
- 69- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptor/binding proteins. *J Biol Chem* 1994;269:9889-9897.
- 70- Moncada S, Higgs A. The L- arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993;329:2002-2012 .
- 71- Wautier MP, Chappey O, Corda S, Sten DM, Schmidt A M, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by RAGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:685-694.
- 72- Basta G, Schmidt AM, De Caterina R, Advanced glycation end products and vascular inflammation: implication for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 2004;63:582-592.
- 73- Cooper ME. Importance of advanced glycation end products in diabetes-associated cardiovascular and renal disease. *Am J Hypertens* 2004;17:315-385.

- 74- Stirr AW, Frizzell N, Thorpe SR. Advanced glycation and advanced lipoxidation: possible role in initiation and progression of diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des* 2004;10:3349-3360.
- 75- Rolo AP, Palmeria CM. Diabetes and mitokondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006;212:167-178.
- 76- Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical Diabetes* 2008;26:77-82.
- 77- Worthley MI, Holmes A, Willoughby SR, Kucia AM, Heresztyn T, Stewart S et al. The deleterious effects of hyperglycemia on platelet function in diabetic patients with acute coronary syndromes: mediation by superoxide production, resolution with intensive insulin administration. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;49:304-310.
- 78- Yavuzer S. Diyabetik retinopati. *Türkiye Klinikleri Journal of Family Medicine Special Topics* 2015;6:29-32.
- 79- Güldiken S, Bilir BE. Diabetik Nöropati. *Türkiye Klinikleri Journal of Physical Medicine Rehabilitation Special Topics* 2012;5:44-50.
- 80- Ha H, Kim KH. Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes Research and Clinical Practice* 1999;45:147-151.
- 81- Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, Klein R Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2004;27:2540- 2553.
- 82- Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;902:230-240.
- 83- Garcia-Cardena G, Comander JI, Blackman BR, Anderson KR, Gimbrone MA. Mechanosensitive endothelial gene expression profiles. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001;947:1-6.
- 84- Siow RC, Ishii T, Mann G. E. Modulation of antioxidant gene expression by 4-hydroxynonenal: atheroprotective role of the Nrf2/ARE transcription pathway. *Redox Report* 2007;12:11-15.
- 85- Van Thienen JV, Fredderus JO, Dekker RJ, Rohlena J, Van Ljzendoorn GA, Kootstra NA et al. Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization. *Cardiovascular Research* 2006;72:231-240.

- 86- Dekker RJ, van Soest S, Fontijn RD, Salamanca S, de Groot PG, VanBavel E et al. Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2). *Blood* 2002;100:1689-1698.
- 87- Dunn J, Qiu H, Kim S, Jjingo D, Hoffman R, Kim WC et al. Flow-dependent epigenetic DNA methylation regulates endothelial gene expression and atherosclerosis. *J Clin Invest* 2014;124:3187.
- 88- Bach FH, Ferran C, Soares M, Wrighton M, Anrather J, Winkler H et al. Modification of vascular responses in xenotransplantation: inflammation and apoptosis. *Nat Med* 1997;3:944-948.
- 89- Avihingsanon Y, Ma N, Csizmadia E, Wang C, Pavlakis M, Giralde M et al. Expression of protective genes in human renal allografts: a regulatory response to injury associated with graft rejection 1, 2. *Transplantation* 2002;73:1079-1085.
- 90- Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF- $\kappa$ B that blocks TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:382-387.
- 91- Beyaert R, Heyninck K, Van Huffel S. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor- $\kappa$ B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem Pharm* 2000;60:1143-1151.
- 92- Badrichani A, Stroka D, Bilbao G, Curiel D, Bach F, Ferran C. Bcl-2 and Bcl-XL serve an anti-inflammatory function in endothelial cells through inhibition of NF- $\kappa$ B. *J Clin Invest* 1999;103:543.
- 93- Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF- $\kappa$ B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:17950-17961.
- 94- Mercurio F, Manning AM. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 1999;18:6163 – 6171.
- 95- Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J et al. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. *Diabetes* 2001;50:2792-2808.
- 96- Petersen B, Ramackers W, Lucas- Hahn A, Lemme E, Hassel P, Queisser AL, Herrmann D et. al. Transgenic expression of human heme oxygenase-1 in pigs confers resistance against xenograft rejection during ex vivo perfusion of porcine kidneys. *Xenotransplantation* 2011;18:355-368.



- 97- Guo S, Messmer-Blust AF, Wu J, Song X, Philbrick MJ, Shie JL et al. Role of A20 in cIAP-2 Protection against Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-Mediated Apoptosis in Endothelial Cells. *Int J Mol Sci* 2014;15:3816-3833.
- 98- Duriez PJ, Wong F, Dorovini-Zis K, Shahidi R, Karsan A. A1 functions at the mitochondria to delay endothelial apoptosis in response to tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 2000;275:18099-18107.
- 99- Yamamoto Y, Gaynor RB. Role of the NF- $\kappa$ B pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr Mol Med* 2001;1:287-296.
- 100- Tokunaga F. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- $\kappa$ B activation. *Nat Cell Biol* 2009;11:123-132.
- 101- Gilmore TD. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25:6680-6684.
- 102- Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- $\kappa$ B signalling. *Cell* 2008;132:344-362.
- 103- Opipari AW, Boguski MS, Dixit VM. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  encodes a novel type of zinc finger protein. *J Biol Chem* 1990;265:14705-14708.
- 104- Ruland J. Return to homeostasis: downregulation of NF- $\kappa$ B responses. *Nat Immunol* 2011;12:709-714.
- 105- Wertz IE. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- $\kappa$ B signalling. *Nature* 2004;430:694-699.
- 106- Shembade N, Parvatiyar K, Harhaj NS, Harhaj EW. The ubiquitin-editing enzyme A20 requires RNF11 to downregulate NF- $\kappa$ B signalling. *EMBO J* 2009;28:513-522.
- 107- He KL, Ting AT. A20 inhibit tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor 1 complex in Jurkat T cells. *Mol Cell Biol* 2002; 22:6034-6045.
- 108- Li L, Soetandyo N, Wang Q, Ye Y. The zinc finger protein A20 target Traf2 to the lysosomes for degradation. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:346-353.
- 109- Lin EY, Berger MS, Prystowsky MB. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* 1993;151:1979-1988.

- 110- Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Ann Rev Pharm Toxicol* 1997;37:517-554.
- 111- Tiwari S, Fomusi Ndisang J. The heme oxygenase system and type-1 diabetes. *Curr Pharm Des* 2014;20:1328-1337.
- 112- Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *The FASEB Journal* 1988;2:2557-2568.
- 113- Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y et al. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 2004;336:241-250.
- 114- Ungvari Z, Bailey-Downc L, Guatam T, Jimerez R, Losonczy G, Zhang C et al. Adaptive induction of NF-E2-related factor-2-driven antioxidant genes in endothelial cells in response to hyperglycemia. *AJP-Heart* 2011;300:1133-1140.
- 115- Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 2009;284:13291-13295.
- 116- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 2004;24:7130-7139.
- 117- Turkseven S, Kruger A, Mingone CJ, Kaminski P, Inaba M, Rodella LF et al. Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology AJP-Heart* 2005;289:701-707.
- 118- Abraham NG, Rezzani R, Rodella L, Kruger A, Taller D, LiVolti G et al. Overexpression of human heme oxygenase-1 attenuates endothelial cell sloughing in experimental diabetes. *AJP-Heart* 2004;287:2468-2477.
- 119- Liu X M, Peyton KJ, Shebib AR, Wang H, Korthuis RJ, Durante W. Activation of AMPK stimulates heme oxygenase-1 gene expression and human endothelial cell survival. *AJP-Heart* 2011;300:84-93.
- 120- Sacerdoti D, Olszanecki R, Volti GL, Colombrita C, Scapagnini G, Abraham NG. Heme oxygenase overexpression attenuates glucose-mediated oxidative stress in quiescent cell phase: linking heme to hyperglycemia complications. *Curr Neurovasc Res* 2005;2:103-111.

- 121- Rodella L, Lamon BD, Rezzani R, Sangras B, Goodman AI, Falck JR et al. Carbon monoxide and biliverdin prevent endothelial cell sloughing in rats with type I diabetes. *Free Rad Biol Med* 2006;40:2198-2205.
- 122- Ahmad M, Turkseven S, Mingone C, Gupte S, Wolin M, Abraham N. Heme oxygenase-1 gene expression increases vascular relaxation and decreases inducible nitric oxide synthase in diabetic rats. *Cell Mol Biol* 2005;51:371-376.
- 123- He M, Siow RC, Sugden D, Gao L, Cheng X, Mann GE. Induction of HO-1 and redox signaling in endothelial cells by advanced glycation end products: a role for Nrf2 in vascular protection in diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:277-285.
- 124- Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *Am J Res Cell Mol Biol* 2009;41:251-260.
- 125- Stocker R, Perrella MA. Heme oxygenase-1 a novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation* 2006;114:2178-2189.
- 126- Speeckaert MM, Speeckaert R, Laute M, Vanholder R, Delanghe J. R. Tumor necrosis factor receptors: biology and therapeutic potential in kidney diseases. *Am J Nephrol* 2012;36:261-270.
- 127- Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 2008;451:904-913.
- 128- Gracia-Sancho J, Villarreal G, Zhang Y, Garcia-Cardena G. Activation of SIRT1 by resveratrol induces KLF2 expression conferring an endothelial vasoprotective phenotype. *Cardiovasc Res* 2010;85:514-519.
- 129- Gracia-Sancho J, Villarreal G, Zhang Y, Garcia-Cardena G. Activation of SIRT1 by resveratrol induces KLF2 expression conferring an endothelial vasoprotective phenotype. *Cardiovasc Res* 2010;85:514-519.
- 130- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-297.
- 131- Grey ST, Longo C, Shukri T, Patel VI, Csizmadia E, Daniel S et al. Genetic engineering of a suboptimal islet graft with A20 preserves  $\beta$  cell mass and function. *J Imm* 2003;170:6250-6256.
- 132- Grey ST, Arvelo MB, Hasenkamp W, Bach FH, Ferran C. A20 Inhibits Cytokine-Induced Apoptosis and Nuclear Factor  $\kappa$ B-Dependent Gene Activation in Islets. *J Exp Med* 1999;190:1135-1146.

- 133- Tobiasch E, Günther L, Bach FH. Heme Oxygenase-1 Protects Pancreatic  $\beta$  Cells From Apoptosis Caused by Various Stimuli. *J Invest Med* 2001;49:566-571.
- 134- Hou C, Zhang W, Wei Y, Mi JH, Li L, Zhou ZH et al. Zinc finger protein A20 overexpression inhibits monocyte homing and protects endothelial cells from injury induced by high glucose. *Genet Mol Res* 2011;10:1050-1059.
- 135- National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Page names used: Gene, Nucleotid, tools/primer-blast/ [Internet]. Bethesda MD, 2016 [cited 2016 July 15]. Available from, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- 136- Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, et al. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(Database issue):D492-6.
- 137- Page names used: Gene, Nucleotid, tools/primer-blast/ [Internet]. Bethesda MD, 2016 [cited 2016 July 15]. Available from, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- 138- Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, et al. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(Database issue):D492-6.
- 139- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase [Internet]. Manchester, UK: The University of Manchester, June 2014 [cited 2011 September 23]. Available from, <http://www.mirbase.org/>.
- 140- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014 42:D68-D73.
- 141- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. microRNA.org - Targets and Expression [Internet]. New York, NY: Memorial Sloan Kettering Cancer Center, November 2010 [cited 2011 September 23]. Available from, <http://www.microrna.org/microrna/home.do>.
- 142- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 2008 Jan; 36(Database Issue): D149-53.
- 143- Gallagher SR, Desjardins P. R. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. In: Haines JL, Korf BR, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR (Eds). *Current Protocols in Human Genetics*. New York, Wiley Co., 2006:A.3D.1-A.3D.21.
- 144- Hatou S, Yamada M, Akune Y, Mochizuki H, Shiraishi A, Joko T et al. Role of insulin in regulation of  $Na^{+}/K^{+}$  dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(8):3935-3942.

- 145- Pott GB, Tsurudome M, Bamfo N, Goalstone ML. ERK2 and Akt are negative regulators of insulin and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  stimulated VCAM-1 expression in rat aorta endothelial cells. *J Inflamm* 2016;13:6.
- 146- Kida T, Oku H, Horie T, Matsuo J, Kobayashi T, Fukumoto M et al. NADPH Oxidase-Mediated ROS Proreleasduction Determines Insulin's action on Retinal Microvasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(11):6754-6761.
- 147- Lu M, Amono S, Miyamoto K, Garland R, Keough K, Qin W et al. Insulin-induced vascular endothelial growth factor expression in retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(13):3281-3286.
- 148- Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo a specific vascular action of insulin. *Circulation* 2000;101:676-681.
- 149- Akış N. Diyabet anjiyopatisinde bradikininin endotel-kan hücreleri etkileşimine tesiri (Doktoral Tez). İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 1994.
- 150- Fox CS, Coary S, Sorlie PD, Levy D, Meigs JB, D'Agostino RB et al. Trends in cardiovascular complications of diabetes. *J Am Med Assoc* 2004;292:2495-2499.
- 151- Song J, Sumiyoshi S, Nakashima Y, Doi Y, Lida M, Kiyohara Y, Sueishi K. Overexpression of heme oxygenase-1 in coronary atherosclerosis of Japanese autopsies with diabetes mellitus: Hisayama study. *Atherosclerosis* 2009;202(2):573-581.
- 152- Shrikhande GV, Salvatore TS, Cleide GS, Scott MD, Csizmadia E, Putheti P et al. O-glycosylation regulates ubiquitination and degradation of the anti-inflammatory protein A20 to accelerate atherosclerosis in diabetic ApoE-null mice. *PLoS One*. 2010;6:5(12):e14240.
- 153- Cao J, Sodhi K, Inoue K, Quilley J, Rezzani R, Rodella L et al. Lentiviral-human heme oxygenase targeting endothelium improved vascular function in angiotensin II animal model of hypertension. *Hum Gene Ther* 2010;22:271-282.
- 154- Wang Y, Ying L, Chen YY, Shen YL, Guo R, Jin KK et. al. Reprint of "Induction of heme oxygenase-1 ameliorates vascular dysfunction in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats". *Vasc Pharmacol* 2014;62:123-131.
- 155- Karsan A, Yee E, Kaushansky K, Harlan JM. Cloning of human Bel-2 homologue: inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells. *Blood* 1996;87:3089-3096.

- 156- Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hultén LM. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2003;166(2):387-394.
- 157- Richardson M, Hadcock SJ, DeReske M, Cybulsky MI. Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-selectin by the aortic endothelium of normolipemic and hyperlipemic diabetic rabbits. *Art Thromb* 1994;14(5):760-771.
- 158- Kim JA, Berliner JA, Natarajan RD, Nadler JL. Evidence that glucose increases monocyte binding to human aortic endothelial cells. *Diabetes* 1994;43(9):1103-1107.
- 159- Steiner M, Reinhardt KM, Krammer B, Ernst B, Blann AD. Increased levels of soluble adhesion molecules in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus are independent of glycaemic control. *Thromb Haemost* 1994;72(6):979-984.
- 160- Zhang L, Zalewski A, Liu Y, Mazurek T, Cowan S, Martin JL et al. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation* 2003;108:472-478.
- 161- Galkina E, Ley K. Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:368-377.
- 162- McLeod DS, Lefer DJ, Merges C, Luttly GA. Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid. *Am J Pathol* 1995;147:642.
- 163- Fasching P, Veitl M, Rohac M, Strelci C, Schneider B, Waldhäusl W, Wagner OF. Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association with microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(12):4313-4317.
- 164- Festa A, D'Agostino R, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000;102(1):42-7.
- 165- Wu CC, Sytwu HK, Lu KC, Lin YF. Role of T Cells in Type 2 Diabetic Nephropathy. *Experimental Diabetes Research* 2011; <http://dx.doi.org/10.1155/2011/514738>.
- 166- Ruster C, Wolf G. The role of chemokines and chemokine receptors in diabetic nephropathy. *Front Biosci* 2008;13:944-55.
- 167- Mensah-Brown EPK, Obineche EN, Galadari S, Chandranath E, Shahin A, Ahmed I et al. Streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: the role of inflammatory cytokines. *Cytokine* 2005;31(3):180-90.

- 168- Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Tesch GH. Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury. *Kidney Int* 2004; 65(1):116-28.
- 169- Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int* 2006; 69(1):73-80.
- 170- Blüher M, Unger R, Rassoul F, Richter V, Paschke R. Relation between glycaemic control, hyperinsulinaemia and plasma concentrations of soluble adhesion molecules in patients with impaired glucose tolerance or Type II diabetes. *Diabetologia* 2002;45(2):210-216.
- 171- Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002;51:2840-2845.
- 172- Lai KN, Ho RT, Li PK. Transforming growth factor-beta mRNA expression in CD4+ T cells from patients with primary glomerulonephritides. *Scand J Urol Nephrol* 1996;30(3):223-6.
- 173- Li D, Yang P, Xiong Q, Song X, Yang X, Liu L et al. MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells. *J Hypertension* 2010;28:1646-54.
- 174- Tiyekli ND, Akış N. Endothelial cells may develop different inflammatory response and different expression profiles of atheroprotective genes against high concentration of D-glucose and/or insulin. *Midwinter Conference 2015 Advances in Immunology* p18, Tirol, 2015.
- 175- Liu X-M, Peyton KJ, Shebib AR, Wang H, Korthuis RJ, Durante W. Activation of AMPK stimulates heme oxygenase-1 gene expression and human endothelial cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300: H84–H93

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### ŞEKİLLER

Şekil 1. Damarların histolojik yapısı .....	3
Şekil 2. Ven yapısı .....	4
Şekil 3. Kapiller sistem .....	5
Şekil 4. Endotel hücre molekül taşıma yolları .....	8
Şekil 5. Koagülasyon kaskadı .....	12
Şekil 6. Fibrinolitik sistem .....	13
Şekil 7. Yüksek glikoz metabolizması .....	18
Şekil 8. RAGE aracılı NF- $\kappa$ B sinyal yolağı aktivasyonu .....	20
Şekil 9. TNF- $\alpha$ ile aktiflenen NF- $\kappa$ B sinyalinin A20 proteini tarafından baskılanması ... ..	23
Şekil 10. <i>Mus musculus</i> A1a, A1b, A1c, A1d gen haritaları .....	49
Şekil 11. <i>Mus musculus</i> A20 gen haritası .....	49
Şekil 12. <i>Mus musculus</i> HO-1 gen haritası .....	50
Şekil 13. MAE ve GENC hücre hatlarında A1'ler, A20 ve HO-1 genleri jel görüntüleri.....	55
Şekil 14. MAE endotel hücre tabakasının artan insülin konsantrasyonunda bağladığı lökositlerin görüntülemesi .....	58
Şekil 15. MAE endotel hücrelerin artan insülin konsantrasyonuna karşı CD62e ifadesinin floransan mikroskopik görüntüleri .....	59
Şekil 16. RAW 264.7 monosit/makrofaj hücre ve EL-4 T lenfosit hücrelerin GENC hücrelerine bağlanma yüzdeleri .....	67
Şekil 17. Tip I DM modelinde GENC hücresinde A1'ler mRNA ifade kinetiği .....	70



<b>Şekil 18.</b> Tip I DM modelinde GENC hücresinde A20 mRNA ifade kinetiği .....	70
<b>Şekil 19.</b> Tip I DM modelinde GENC hücresinde HO-1 mRNA ifade kinetiği .....	71
<b>Şekil 20.</b> Tip II DM modelinde GENC hücresinde A1'ler mRNA ifade kinetiği .....	72
<b>Şekil 21.</b> Tip II DM modelinde GENC hücresinde A20 mRNA ifade kinetiği .....	73
<b>Şekil 22.</b> Tip II DM modelinde GENC hücresinde HO-1 mRNA ifade kinetiği .....	74
<b>Şekil 23.</b> GENC ve MAE hücrelerinin farklı diyabet modellerinde A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'larının ifade seviyelerinin karşılaştırılması .....	76
<b>Şekil 24.</b> GENC hücrede farklı diyabet modellerine göre A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'larının ifade değişimi .....	79

## TABLolar

<b>Tablo 1.</b> Sağlıklı kişilerin ve DM hastalarının plazma glikoz konsantrasyonları .....	15
<b>Tablo 2.</b> Çalışmanın süreçlendirilmesi .....	29
<b>Tablo 3.</b> Primer tasarlama kriterleri .....	31
<b>Tablo 4.</b> RT-PZR ve qRT-PZR optimizasyon deneylerinin dökümü .....	45
<b>Tablo 5.</b> A1'ler, HO-1 ve A20 genlerinin pozisyonları ve genomik içerikleri .....	48
<b>Tablo 6.</b> A1'ler, A20, HO-1 genlerine ait PZR ve qRT-PZR primer çiftleri özellikleri .....	51
<b>Tablo 7.</b> A1'ler, A20 ve HO-1 genlerine ait primer dizileri .....	52
<b>Tablo 8.</b> A1'ler, A20 ve HO-1 genleri için tahmini miRNA'ları .....	53
<b>Tablo 9.</b> İki örneğe ait DNA spektrofometrik ölçüm bulguları .....	53
<b>Tablo 10.</b> MAE endotel hücrelerin normoglisemi ve tip I DM modelinde bağladığı RAW 264.7 hücre sayıları .....	56
<b>Tablo 11.</b> MAE endotel hücre tabakasının artan insülin konsantrasyonuna karşı bağladığı ortalama kan lökosit sayıları .....	57
<b>Tablo 12.</b> GENC hücrelere tip I, tip II DM ve IGT diyabet modellerinde yapışan mononükleer hücre sayılarının ortalamaları .....	60
<b>Tablo 13.</b> Monosit/makrofaj hücrelerine ait GENC adezyon test görüntüleri .....	61
<b>Tablo 14.</b> T lenfosit hücrelerine ait GENC adezyon test görüntüleri .....	64
<b>Tablo 15.</b> Tip I DM modelinde MAE hücresinde koruyucu genlerin mRNA ifade kinetiği .....	69
<b>Tablo 16.</b> GENC ve MAE hücrelerinin farklı diyabet modellerinde A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA ifadelerinin RT-PZR ile ölçüm sonuçları .....	77

**Tablo 17.** GENC hücrede farklı diyabet modellerine göre A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'larının qRT-PZR ile ifade değişimi ..... 78



## ÖZGEÇMİŞ

**Nimet Dilek TİYEKLİ ÇELİK**

**Doğum tarihi:** 01.01.1980

### **EĞİTİM:**

**1986-1991:** Hatay, Ali Sayar İlkokulu

**1991-1994:** Hatay, Atatürk Ortaokulu

**1994-1998:** Hatay, Antakya Süper Lisesi

**1999-2003:** Eskişehir, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Kimya Lisans Programı

**2004-2006:** Eskişehir, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Programı

**2010- :** Edirne, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji Doktora Programı

### **Yayınlar ve Bildiriler:**

- 1- Tiyekli ND, Akış N. Endothelial cells may develop different inflammatory response and different expression profiles of atheroprotective genes against high concentration of D-glucose and/or insulin. Midwinter Conference 2015 Advances in Immunology p18, Tirol, 2015.
- 2- Deckert J, Gordon D, Karle H, Lackovic V, Lindgrien S, Martinez L, et al. (Çeviri: Say A, Güç D, Tiyekli D, İlhan F, Araslı M, Akış N). Avrupa'da Biyotip ve Sağlık Bilimlerinde PhD Eğitim Standartları. Akış N (Ed). [İnternet]. Zagreb, Hırvatistan: ORPHEUS; 2013 [2016 Temmuz 21'de erişim]. Erişim için,

[http://www.orpheus-med.org/images/stories/documents/ORPHEUS-AMSE-WFME\\_tur.pdf](http://www.orpheus-med.org/images/stories/documents/ORPHEUS-AMSE-WFME_tur.pdf).

- 3- Esendemir I Wittmann J, Tiyekli D, Jack H M, Akış N. Regulation of A20 gene expression bu miRNA in endothelial cells exposed to high concentration of glucose. 2nd International Congress of Molecular Biology Association of Turkey Abstract Book, İstanbul, 2013.
- 4- Tiyekli U, Çalıyurt O, Tiyekli D. Proinflammatory cytokine levels in patients with conversion disorder. ACTA Neuropsychiatrica 2013;5:137-143.
- 5- Varol F, Kıyak N, Sayın C, Kaplan P, Tiyekli D. Angiopoetins in the advanced ovarian cancer. The 14th World Congress Controversies in Obstetrics, Gynecology and Infertility Abstract Book 108; P337, Paris, 2011.
- 6- Tiyekli D, Akış N. Graduate students of health sciences experience significant troubles in Turkey. Conference of Orpheus PhD Quality Indicators Abstract Book p76, İzmir, 2011.
- 7- Tiyekli D, Akış N, Wojciechowska K, Rustamova G. Deney geliştirme: Nötrofil polarizasyonu ve kemotaksisi. 21. Ulusal İmmünoloji Kongresi Bildiri ve Özet Kitabı s 85, Antalya, 2011.
- 8- Tiyekli D, Akış N. Biyoterörizme karşı aşı hazırlıkları. 21. Ulusal İmmünoloji Kongresi, Muğla, 2011.
- 9- Tiyekli D, Çavuşlu Ş. Biyolojik silahlar ve aşı ile korunma. Ne kadar hazırız? 21. Yüzyılda Güvenlik Paneli. Harp Akademileri Özet Kitabı, İstanbul, 2011.

## **EKLER**

**EK 1: Etik Kurul Onayı ve Tez İsmi Düzeltme Kararı**

**EK 2: Kullanılan Ayıraç Formülleri**

**EK 3: Kullanılan Cihaz ve Malzemeler**

**EK4: Tablo 4’de verilen ön çalışmaların ayrıntısı**

**EK 5: Şekil 17, -18 ve -19’da elde edilen verileri geliştiren deney görüntüleri**

**EK 6: Ham Veriler**

**EK 6A. Tablo 12 ve Şekil 16’daki bulguların ham veri tablosu**

**EK 6B. Tablo 17 ve Şekil 24’deki bulguların ham veri tablosu**

**EK 7: Tüm bulgular toplu halde**

# EK 1: Etik Kurul Onayı

## T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-GOKAEK 2012/78				
	PROTOKOL ADI	Strese Karşı Yanıtta Endotel Hücreye Yapışan Mononükleer Lökositlerin ve Endotel Hücrede İfade Edilen Koruyucu Genlerin Profillenmesi				
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Neşe AKIŞ SANSA				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ					
	DESTEKLEYİCİ					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	<input checked="" type="checkbox"/> Tek Merkez <input type="checkbox"/> Ulusal	<input type="checkbox"/> Çok Merkez <input type="checkbox"/> Uluslararası				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 13/ 08					Tarih: 16.05.2012
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Neşe SANSA'nın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Doktora öğrencisi Nimet Dilek TİYEKLİ'nin tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın Girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurulu kapsamında olmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-GOKAEK Yönergesi					
<b>ÜYELER</b>						
Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Başkan	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan ÜMİT Başkan Yardımcısı	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<del>E <input checked="" type="checkbox"/></del> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik. D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Biyoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Tunç KUTOĞLU Üye	Anatomi	T.Ü.T.F. Anatomi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sedat ÜSTÜNDAĞ Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Burcu TOKUÇ Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Petek BALKANLI KAPLAN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<del>E <input checked="" type="checkbox"/></del> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Recep YAGIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Avukat Gülden ATILLA ÖZTÜRK Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

\*Araştırma ile ilişki  
\*\*Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Turan EGE  
Dekan

## EK 1: Tez İsmi Düzeltme Kararı

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI TARİHİ : 02.06.2016  
TOPLANTI SAYISI : 21

**KARAR 03:**

İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanlığının 01.06.2016 tarih ve 22073484-302.14.03-39932 sayılı yazısı ve ekleri görüşüldü.

İmmünoloji Anabilim Dalı doktora programı öğrencisi Nimet Dilek TİYEKLİ'ye Enstitü Yönetim Kurulunun 16.02.2012 tarih ve 05/08 sayılı kararı ile verilen "Strese Karşı Yanıtta Endotel Hücreye Yapışan Mononükleer Lökositlerin ve Endotel Hücrede İfade Edilen Koruyucu Genlerin Profillenmesi" konulu tezin başlığının "**Endotel Hücrenin Farklı Diyabet Stresleri Altında Mononükleer Hücreleri Bağlama ve Koruyucu Genleri İfadeleme Yanıtları**" Olarak değiştirilmesinin uygun olduğuna mevcudun oybirliği ile karar verildi.

ASLININ AYNIYIDIR  
  
Talat TASHKAN  
Enstitü Sekreteri

## **EK 2: Kullanılan Ayıraç Formülleri**

10X PBS (stok çözelti) (100ml): 8 gr NaCl (son konsantrasyon 1,37 M), 0,2 gr KCl (son konsantrasyon 27 mM), 1,44 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (son konsantrasyon 100 mM), 0,24 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (son konsantrasyon 18 mM) 80 ml ultra saf su içinde manyetik karıştırıcı ile çözünür. 1N HCl çözeltisi ile pH 7,2'ye ayarlanır. Çözelti oda ısısında saklanır. Hücre kültürü için kullanılacak PBS, 1X'e seyreltilir ve 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak kullanılır.

Tripsin çözeltisi: 0,5 gr tripsin, 0,2 gr EDTA 100 ml PBS içinde çözülür. Enjektör filtre ile sterilize edilir. Çözelti alikotlara ayrılır ve -20°C'de saklanır.

Paraformaldehit çözeltisi: 2 gr paraformaldehit 100 ml PBS içinde çeker ocak altında 60°C'de manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. 1N NaOH çözeltisi ile pH 7,4 olarak ayarlanır. Çözelti 4°C'de saklanır.

% 4'lük trifen mavisi çözeltisi (ağırlık/hacim): 0,4 gr trifen mavisi 10 ml PBS içinde çözünür. Çözelti huni yardımıyla süzgeç kağıdından süzülür. Oda ısısında saklanır.

LB besiyeri (1 lt): 10 gr bakto-tripton, 5 gr maya ekstraktı, 10 gr NaCl, 800 ml deiyonize su içinde çözülür. 1N NaOH çözeltisi ile pH 7,5'e ayarlanır. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanır.



### **EK 3: Kullanılan cihazlar**

Laminer akım cihazı

CO<sub>2</sub>'li etüv

İnvert mikroskop

Buzdolabı

-80 dondurucu

-20 dondurucu

Santrifüj cihazı

Su banyosu

Hassas terazi

pH metre

İnternet erişimli bilgisayar

Pipetör

Mikropipet (1000, 200, 10, 1)

PZR cihazı

Mini spin

Mikro santrifüj

Spektrofotometre

Elektroforez cihazı

Elektroforez tankı

Translüminatör

qRT-PZR cihazı

Mikrodalga fırın

### **EK 3: Kullanılan malzemeler**

Kültür şişesi

Cam serolojik pipet

Pipet ucu (1000, 200, 10, 0,5)

Kryotüp

Sıvı azot tankı

Üniversal tüp (50, 15, 1.5)

Lam

Lamel

6'lı kültür plağı

Kazıyıcı

Penset

Naeuber kamarası

Beher

Atık kabı (sivri ve kesiciler, biyolojik atıklar)

Kuvartz küvet

#### **EK4: Tablo 4’de verilen ön çalışmaların ayrıntısı**

##### **1, 2, 5. ve 24. deneylerle total RNA başlangıç miktarı belirlenmesi:**

1. deneyde; normoglisemik ortamda kültüre edilen ve Tip I DM, Tip II DM ve IGT aktivasyon şartlarına maruz bırakılan GENC hücre hattında A1’ler, A20 ve HO-1 mRNA’larının ifade profilleri arandı. İnternal kontrol geni olarak HPRT-1 geni kullanıldı. Aktivasyonlar 2, 24, 48 saatlik sürelerde yapıldı, aktivasyon sonunda hücrelerden total RNA izole edildi. 10 örneğin ikisinden yüksek miktarda RNA verimi alınırken geriye kalan 8 örnekten yeterli verim alınamadı. cDNA sentezinde her bir şart için azami miktar (0,5ug) total RNA kullanıldı. cDNA’lar dilue edilmeden, 40 döngü; 94°C’de 15 saniye, 57°C’de 1 dakika profilli ile qRT-PZR’de çoğaltıldı. Cihazda çoğalmayı gösteren herhangi bir Ct değeri saptanamadı

2. ve 3. deneyler; önceki deneyde kullanılan yeterli miktarda RNA ihtiva eden örneklerle tekrarlandı. cDNA sentezinde kullanılan total RNA 1ug’ a çıkarıldı, cDNA’lar dilue edilmeden A20 mRNA’sı için reaksiyona konuldu, reaksiyon sonunda Ct değerleri yine saptanamadı. Sonuçlar irdelendiğinde kullanılan PZR profilinin hatalı olduğu fark edildi.

5. deneyde öncesi; RNA izolasyonu optimize edilerek (RNA izolasyonu optimizasyon kısmında anlatıldı) verim sorunu çözüldü. Bu deneyde 48 saat Tip I DM ile aktive edilen MAE hücre hattındaki A1’ler, A20 ve HO-1 mRNA’ları ifade profilleri arandı. Bu deneyle başlangıç total RNA miktarı 2 ug olarak optimize edildi.

24. deneyde; MAE hücre hattı ile yapılan deneyde başlangıç total RNA miktarı 3 ug’a çıkarıldı, cDNA 1/1 oranında kullanıldı ve Tip I DM modeliyle aktivasyon sonrası A20 mRNA ifade profili jel üzerinde gösterildi. Başlangıç total RNA miktarı 3 ug ve cDNA dilusyonu 1/1 olarak optimize edildi.

##### **4. deneyde PZR profili düzeltildi:**

Bu deneyde; ilk deneyde kullanılan ve RNA miktarı yeterli örneklerden ikincisi kullanıldı. PZR profili 94°C’de 10 dakika, 40 döngü; 94°C’de 15 saniye, 57°C’de 1 dakika olarak düzeltildi, önceki deney tekrarlandı, gen ifade değişimi saptandı.

### **5, 6, 7. ve 9. deneylerle cDNA dilusyonu oranı belirlendi:**

5. deneyde 48 saat Tip I DM modeliyle aktive edilen MAE hücre hattındaki A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'larının ifade profilleri arandı. cDNA örneklerinin 1/10, 1/100 ve 1/1000 dilusyon oranları karşılaştırıldı. Elde edilen verilerde çukurlararası okuma hataları saptandı, hatalar dışlanarak Ct verileri değerlendirildi. Delta delta Ct analizi ile genlerin 48 saatlik yüksek glikoz aktivasyonu için ifade profilleri çıkarıldı.

6. deneyde; 5. deneyin tekrarı yapıldı. Deney sonucunda önceki deneyle tutarlı sonuçlar elde edilemedi. Ancak karşılaştırmalı cDNA sonuçlarına göre: A20 mRNA'sı için MAE hücre hattıyla yapılan qRT-PZR deneylerinde başlangıç RNA miktarının 2 ug, cDNA dilusyon oranının 1/1 olmasına karar verildi.

7. deneyde; 24 saat Tip I DM ile aktive edilen MAE hücre hattında A1'ler mRNA'sının ifade değişimi arandı. Şartlar değiştirilmeden yapılan deneyde 2ug total RNA ile sentezlenen cDNA örneğinin 1/10, 1/100 ve 1/1000 dilusyon oranları karşılaştırıldı. A1'ler mRNA'ları için MAE hücre hattıyla yapılan qRT-PZR deneylerinde cDNA dilusyon oranının 1/1 olmasına karar verildi.

9. deneyde; hücre hattı değiştirildi. GENC hücre hattı 48 saat Tip I DM ile aktive edildi. Bu deneyde A20 mRNA ifade değişimine bakıldı ve cDNA'nın 1/1 ve 1/10 dilusyon oranları karşılaştırıldı. GENC hücre hattı ile yapılan aktivasyonda A20 mRNA'sı için cDNA dilusyon oranının 1/1 olmasına karar verildi.

10. ve 11. deneylerde; 48 saat Tip I DM ile aktive edilen MAE ve GENC hücre hatlarında A20 mRNA'sının ifade değişimi için optimize deneyleri tekrarlandı.

### **6-8. deneylerde kullanılan malzemelerin ve gerçek zamanlı termal döngü cihazının kalite kontrolü yapıldı:**

5. deneyde çukurlararası elde edilen aşırı farklı Ct değerlerinin sebebi araştırıldı. Örneklerin konulduğu plak incelendi. Plaktaki çukur hacimlerinin arasında farklılıklar görüldü. Hacim farklılığının plağın kapatılmasında kullanılan filmin yüksek ısıda buruşup kaçak yapması sonucu örneklerin buharlaşmasıyla oluştuğu anlaşıldı. Filmin değiştirilmesine karar verildi.

6. deneyde; kullanılan film değiştirildi. MAE hücre hattı ile 5. deneyin tekrarı yapıldı. Elde edilen sonuçlar önceki deneyi doğrulamadı. Ancak çukurlararası Ct değerleri arasındaki farklılık giderildi.

8. deneyde 7. deney paralel olarak yapıldı. Bu deneyde önceki deneylerde kullanılan “Bioneer” (Ek 3A) qRT-PZR cihazı ile “ABI 7500 The Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR Systems” (Ek 3A) gerçek zamanlı termal döngü cihazıyla karşılaştırıldı. İki cihazdan elde edilen sonuçlar arasında ciddi farklılıklar gözlenmedi. “Bioneer” termal döngü cihaz ile deneylerin devamına karar verildi.

**12-18. deneylerde master miks değişimi/seçimi yapıldı, primer konsantrasyonu belirlendi:** Her bir deney bağımsız olmak üzere tüm deneylerde MAE hücre hattı 48 saat Tip I DM ile aktive edildi ve A20 mRNA’sının ifade değişimi arandı.

12. deneyde; önceki deneylerde kullanılan “qRT-PCR Faststart SYBR Green Master (ROX) mastır miksi” (Ek-04913850001, Roche, Almanya) ve “Absolute qPCR SYBR Green ROX Mix mastır miksi” karşılaştırıldı. Reaksiyon ayıraçları eşit (başlangıç total RNA 2ug) hacimde cDNA (1/1 dilüsyon) ile kit prospektüslerinin önerdiği gibi hazırlandı. Primer konsantrasyonu birinci kit için 300 nM, ikinci kit için 70 nM kullanıldı. Sonuçlarda iki kit arasında farklılık gözlenmemesine rağmen deneylere “Absolute qPCR SYBR Green ROX Mix mastır miksi” ile devam edilmesine karar verildi.

13. deneyde; seçilen mastır miks için 70 nM ve 300 nM olmak üzere iki farklı primer konsantrasyonu karşılaştırıldı, sonuçlarda konsantrasyonun açısından farklılık gözlenmedi. deney sonuçları arasındaki tutarsızlık devam etti.

**14-19. deneyler optimize deney şartlarıyla profillemeye deneyleri yapıldı:**

Optimize edilen deney şartları ile 6 (14, 15, 16, 18. deneyler bağımsız deneylerdir) doğrulama deneyleri yapıldı. Ard arda en az iki tutarlı sonuç elde edilmeye çalışıldı.

14. ve 15. deneylerde; sırasıyla MAE ve GENC hücre hatları 48 saat Tip I DM aktivasyonu sonrası A20 mRNA ifade değişimi arandı, önceki deneylerin en az biri ile tutarlı sonuç gösterilmeye çalışıldı.

16. deney; MAE hücre hattı ile yapıldı. 48 saat Tip I DM aktivasyon sonrası A1’ler, A20

ve HO-1 mRNA'larında ifade değişimi arandı. 17. deneyde; önceki deneyde kullanılan örnekle deney tekrarlandı. Önceki deney doğrulanamadı.

18. deney aynı hücre, aynı aktivasyon şartı ve süresi için tekrarlandı. 19. deneyde aynı örnekte A20 mRNA ifade değişimi için deney tekrar edildi. Birbiriyle tutarlı sonuçlar elde edilemedi.

### **20-21. deneylerde qRT-PZR profili yeniden belirlendi:**

Birbirini destekleyici sonuçların elde edilememesi sonucu profillemeye deneyinin tüm basamaklarının irdelendi. qRT-PZR profili optimize edildi.

20. deneyde; A20 mRNA ifadesi için MAE hücre hattı, Tip I DM aktivasyon şartı ile 48 saat aktive edildi. Deney önceki deney şartlar değiştirilmeden yapıldı. Deney sonucunda A20 mRNA ifadesinde değişim saptanmadı.

21. deney; 21. deneyle aynı örnek kullanılarak paralel yapıldı. Deneyde 95°C'de 15 dakika, 40 döngü; 95°C'de 15 saniye, 57°C'de 1 dakika olan qRT-PZR profilinin ikinci döngüsüne uzama basamağı eklendi. İki deneyin sonuçları arasında farklılık gözlenmedi. PZR profilinin 95°C'de 15 dakika, 40 döngü; 95°C'de 15 saniye, 57°C'de 1 dakika, 72°C'de 30 saniye olmasına karar verildi.

### **22. ve 23. deneylerde RNA kalite kontrolü yapıldı:**

Birbirini destekleyici sonuçların elde edilememesi kaliteli RNA elde edilip edilmediği sorusunu doğurdu. RNA izolasyonu sırasında DNA yıkım basamağının atlandığı ve DNA ile kontamine olmuş RNA elde edildiği fark edildi.

22. ve 23. deneyde; DNA kontaminasyonunun deney sonuçları üzerine etkisini saptamak üzere DNA ile kontamine RNA örneği ile saf RNA örneği karşılaştırıldı. 48 saat Tip I DM modeli ile aktive edilmiş 2 kültür şişesindeki MAE hücrelerden biri RNA izolasyonu sırasında DNaz ile muamele edildi diğerinin izolasyonunda ise DNaz kullanılmadı. Örneklerdeki DNA kontaminasyonu hem denature edici RNA elektroforezi metoduyla hem de agaroz jel elektroforez metoduyla gösterildi. DNA kontamine RNA örneği ve saf RNA örneği ile yapılan qRT-PZR deneyinde A20 mRNA ifade değişimi açısından farkı saptanmadı.

#### **24. deneyle optimize deney şartlarıyla profillemeye deneyleri yapıldı:**

24. deneye kadar yapılmış olan optimizasyon kullanılarak MAE hücresinde Tip I DM aktivasyonu ile A20 mRNA'sının ifade değişim deneyi yapıldı. Deney sonucunda A20 mRNA ifadesinde değişim saptanamadı.

#### **25- 34. deneylerde A1'ler, A20 ve HO-1 genlerinin ifadeneme kinetiği belirlendi:**

25. deneyde; MAE hücre hattı 2, 4, 6, 9, 12, 24 ve 48 saat Tip I DM aktivasyon ortamına maruz bırakıldı, hücrelerden total RNA izole edildi, 3 ug total RNA'dan cDNA sentezlendi. Konvansiyonel PZR ile A1'ler, A20 ve HO-1 mRNA'ları cDNA'ları çoğaltıldı. Genlere ve aktivasyon sürelerine göre elektroforez haritası oluşturuldu. PZR ürünleri haritaya göre jelle yüklendi ve elektroforez yapıldı. mRNA ifadeleri jel üzerindeki bantlarla gösterildi.

26. deneyde; hücre hattı değiştirildi. Tip DM modeli için GENC hücresinde A1'ler ve A20 mRNA'larının 2, 4, 6, 12, 24, 48 saat ifadelerine bakıldı.

27. deneyde; HO-1 mRNA'sının Tip I DM modelinde 4, 6. saat mRNA ifadesine bakıldı.

28. deneyde; Tip I DM modelinde A1'ler mRNA'ları için 4 ve 6. saat; A20 mRNA'sı için 2-6. saat mRNA ifadesi doğrulama deneyi yapıldı.

29. deneyde; Tip I DM modelinde HO-1 mRNA'sı için 4, 6. saat mRNA ifadesi doğrulama deneyi yapıldı. Bu deneyle ayrıca HO-1'in 2. saat mRNA ifadesi de incelendi.

30. deneyde; Tip II DM modelinde A1'ler ve A20 mRNA'larının 2, 4, 6, 12, 24, 48. saat mRNA ifadelerine bakıldı.

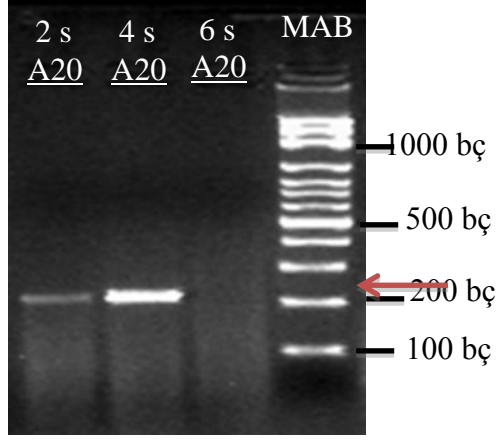
31. deneyde; Tip II DM modelinde HO-1 mRNA'sının 2, 4, 6, 9. saat mRNA ifadesine bakıldı.

32 ve 33. deneylerde; Tip I DM modelinde A1'ler için 6. saat, A20 ve HO-1 için 4. saat mRNA ifadesi doğrulama deneyi; Tip II DM modelinde A1'ler ve A20 için 6. saat, HO-1 için 4. saat mRNA ifadesi doğrulama deneyleri yapıldı.

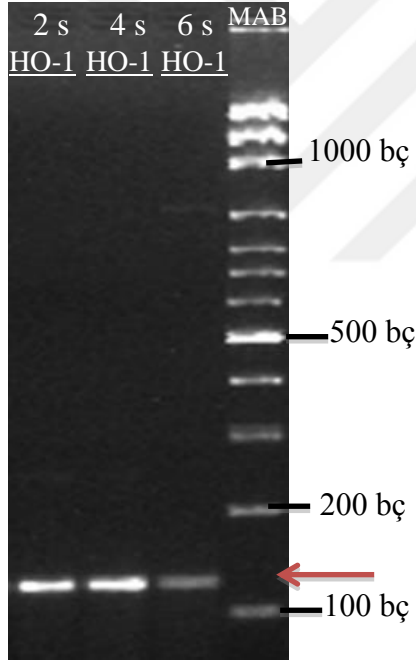
34. deneyde; IGT modelinde A1'ler için 6. saat, A20 ve HO-1 için 4. saat mRNA ifadeleri incelendi.

## EK 5: Şekil 17, -18 ve -19'da elde edilen verileri geliştiren deney görüntüleri

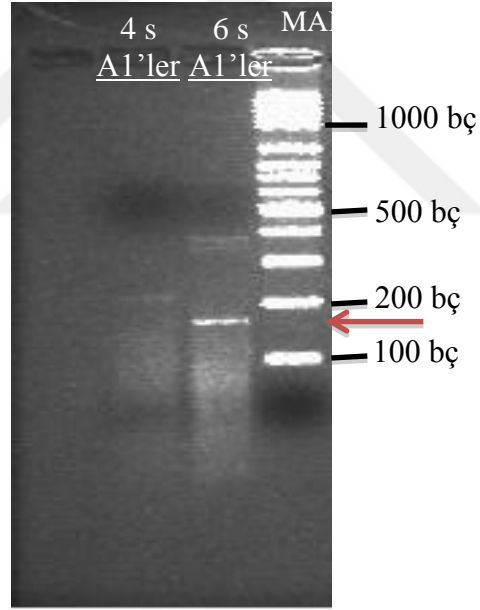
(a)



(b)



(c)



**MAB:** Moleküler ağırlık belirteci

### GENC hücre Tip I DM modelinde doğrulama deneyi jel görüntüleri

(a) GENC hücre Tip I DM modeli A20 mRNA ifadesi jel görüntüsü kinetiği doğrulama deneyine aittir. Jelde görünen A20 mRNA bantları 215 bç uzunluğundadır. Kinetik çalışmada 2-6 saat ifadeleri bağımsız yapılan bu deneyle doğrulanmıştır. İfade piki kinetik çalışma bulgularıyla uyumludur. A20 doğrulama deneyi HO-1 doğrulama deneyi ile paralel deneylerdir. (b) GENC hücre Tip I DM modeli HO-1 mRNA ifadesi jel görüntüsü kinetiği doğrulama deneyine aittir. Jelde görünen HO-1 mRNA bantları 127 bç uzunluğundadır. Kinetik çalışma 4. ve 6. saatler için yapılmışken doğrulama deneyinde aktivasyon süreleri 2-6 saatlere genişletilmiştir. HO-1 mRNA ifadesi 2-6 saat sürmektedir. Bulgularda ilk deneyde incelenmeyen 2. saat mRNA ifadesi burada gösterilmiştir. mRNA ifade piki 4. saatte gözlenmiştir. Sonuçlar ilk deneyle uyumludur. (c) GENC hücre Tip I DM modeli A1'ler mRNA ifadesi jel görüntüsü kinetiği doğrulama deneyine aittir. Jelde görünen A1'ler mRNA bantları 166 bç uzunluğundadır. Doğrulama deneyi kinetik çalışmaya göre elde edilen bulgulara göre 4. ve 6. saatler için bağımsız olarak yapılmıştır.



**EK 6: Ham veri EK 6A. Tablo 12 ve Şekil 16'daki bulguların ham veri tablosu**

Deney Modelleri		Mikrovasküler endotel hücreye yapışan mononükleer hücre sayıları		Deney ortalaması	Bağımsız üç deneyin ortalaması	Profil
Tip I DM	Monosit	1inci deney	25, 29, 33, 29, 32	29,6	28,5	Monosit hücreler % 78, T lenfosit hücreler % 53 oranla daha fazla yapışır.
		2inci deney	22, 20, 28, 29, 39	27,6		
		3üncü deney	23, 28, 31, 24, 35	28,2		
	T Lenfosit	1inci deney	35, 32, 20, 19, 18	24,8	23,8	
		2inci deney	35, 29, 21, 19, 15	23,8		
		3üncü deney	33, 26, 19, 18, 18	22,8		
Tip II DM	Monosit	1inci deney	37,36, 42, 44, 37	39,2	38,6	Monosit hücreler % 141 T lenfosit hücreler % 114 oranla daha fazla yapışır
		2inci deney	39, 41, 39, 40, 38	39,4		
		3üncü deney	36, 39, 43, 34, 34	37,2		
	T Lenfosit	1inci deney	35, 33, 34, 34, 30	33,2	33,2	
		2inci deney	34, 27, 33, 36, 34	32,8		
		3üncü deney	30, 31, 33, 37, 36	33,4		

**EK 6: Ham veri EK 6A. Tablo 12 ve Şekil 16'daki bulguların ham veri tablosu- devam 1**

Deney Modelleri		Mikrovasküler endotel hücreye yapışan mononükleer hücre sayıları		Deney ortalaması	Bağımsız üç deneyin ortalaması	Profil
IGT	Monosit	1inci deney	38, 33, 23, 25, 26	29	30,9	Monosit hücreler % 93 T lenfosit hücreler % 104 oranla daha fazla yapışır
		2inci deney	36, 29, 34, 33, 22	30,8		
		3üncü deney	36, 40, 34, 25, 30	33		
	T Lenfosit	1inci deney	36, 29, 33, 31, 28	31,4	31,6	
		2inci deney	37, 33, 35, 25, 27	31,4		
		3üncü deney	39, 37, 33, 29, 22	32		
Pozitif kontrol	Monosit	1inci deney	35, 38, 46, 43, 34	39,2	37,6	
		2inci deney	35, 39, 36, 40, 35	37,2		
		3üncü deney	41, 38, 33, 38, 32	36,4		
	T Lenfosit	1inci deney	31, 32, 35, 33, 27	31,6	31,1	
		2inci deney	31, 30, 33, 36, 31	32,2		
		3üncü deney	34, 37, 26, 27, 24	29,6		

**EK 6A. Tablo 12 ve Şekil 16'daki bulguların ham veri tablosu- devam 2**

Deney Modelleri		Mikrovasküler endotel hücreye yapışan mononükleer hücre sayıları		Deney ortalaması	Bağımsız üç deneyin ortalaması
Normal	Monosit	1inci deney	21, 20, 19, 11, 12, 13	16,6	16
		2inci deney	19, 21, 16, 15, 10,	16,2	
		3üncü deney	20, 17, 15, 14, 10	15,2	
	T Lenfosit	1inci deney	15, 13, 17, 14, 14	14,6	15,5
		2inci deney	20, 16, 10, 11, 18	15	
		3üncü deney	23, 18, 12, 17, 11,	16,2	

Tablonun ilk sütununda deney modelleri; ikinci sütununda GENC hücre ile yapılan deneylerde hücre tabakası yapışan monosit ve T lenfosit hücre sayıları; üçüncü sütununda her bir deneyde; dördüncü sütunda bağımsız üç deneyde elde edilen monosit ve T lenfosit hücrelerin ortalama yapışma sayılarının ortalamaları; beşinci sütunda herbir deneyde normalize edilmiş yapışan monosit ve T lenfosit sayılarının ortalamaları; altıncı sütunda deney modeline göre elde edilen yapışma profili bulunmaktadır. Tablodaki dört deney modeliyle yapılan deney serileri birbirinden bağımsızdır. Elde edilen yapışma sayıları invert mikroskopta rastgele 5 alanın sayılmasıyla saptanmıştır. Deney modellerindeki monosit/T lenfosit yapışma profili normalize edilerek bulunmuştur.

**EK 6: Ham veri EK 6B. Tablo 17 ve Şekil 24'deki bulguların ham veri tablosu**

Deneyler	Genler	Ct triplike değerleri	Ct (ort)	ΔCt	ΔΔCt	Normalize
Inci deney						
N	HPRT-1	19,82	19,84			
		19,87				
		19,84				
	A1'ler	28,69	28,87	9,03		
		28,81				
		29,11				
	A20	34,05	33,84	14		
		33,61				
		33,86				
	HO-1	30,25	30,2	10,36		
		30,31				
		30,04				
Tip I DM	HPRT-1	19,07	19			
		19,09				
		18,84				
	A1'ler	26,65	26,79	7,79	-1,24	2,4 kat
		26,69				
		27,02				
	A20	29,15	28,93	9,93	-4,07	16,8 kat
		29,01				
		28,63				
	HO-1	23,42	23,08	4,08	-6,28	77,7 kat
		22,80				
		23,02				
Tip II DM	HPRT-1	19,22	19,15			
		19,10				
		19,13				
	A1'ler	27,03	27	7,857	-1,173	2,25 kat
		27,13				
		26,94				
	A20	30,61	30,5	9,93	-4,07	6,3 kat
		30,45				
		30,44				
	HO-1	23,58	23,64	4,08	-6,28	58,5 kat
		23,62				
		23,72				
IGT	HPRT-1	18,69	18,51			
		18,32				
		18,52				
	A1'ler	28,74	28,53	10,02	+0,99	0,5 kat
		28,17				
		28,68				
	A20	29,43	29,29	10,78	-3,22	9,3 kat
		29,35				
		29,09				
HO-1	21,73	21,69	3,18	-7,18	145,0 kat	
	21,55					
	21,79					

**EK 6: Ham veri EK 6B. Tablo 17 ve Şekil 24'deki bulguların ham veri tablosu- devamı**

Deneyle	Genler	Ct triplike değerleri	Ct <sub>(ort)</sub>	ΔCt	ΔΔCt	Normalize
<b>2nci deney</b>						
<b>Normal</b>	HPRT-1	23,25	23,07			
		22,93				
		23,03				
	A1'ler	27,39	27,82			
		27,53				
		28,54				
	A20	34,05	33,84			
		33,88				
		33,61				
	HO-1	30,88	30,98			
		30,93				
		31,13				
<b>Tip I DM</b>	HPRT-1	23,58	23,67			
		23,08				
		24,35				
	A1'ler	27,26	27,12	3,45	-1,3	2,5 kat
		27,06				
		27,04				
	A20	30,05	29,71	6,04	-4,73	26,5 kat
		29,63				
		29,45				
	HO-1	25,42	25,46	1,79	-6,12	69,6 kat
		25,70				
		25,26				
<b>Tip II DM</b>	HPRT-1	22,64	22,94			
		23,33				
		22,85				
	A1'ler	28,58	28,41	5,47	+0,72	0,6 kat
		28,31				
		28,34				
	A20	30,61	30,50	7,56	-3,21	9,3 kat
		30,45				
		30,44				
	HO-1	23,42	23,64	0,7	-7,21	148,0 kat
		23,78				
		23,72				
<b>IGT</b>	HPRT-1	23,29	23,63			
		23,69				
		23,91				
	A1'ler	28,44	28,51	4,88	+0,13	0,9 kat
		28,20				
		28,89				
	A20	29,10	29,29	5,66	-5,11	35,5 kat
		29,43				
		29,35				
	HO-1	23,55	23,95	0,32	-7,59	192,7 kat
		23,73				
		24,57				

Tabloda GENC hücre Tip I, Tip II DM ve IGT deney modellerinde Tip I, Tip II DM ve IGT genlerine ait qRT-PZR sonuçları bulunmaktadır. Tablonu ilk sütununda deney modelleri; ikinci sütununda aranan genler; üçüncü

sütununda mRNA ifadesine karşılık gelen üçlü CT ışıma değerleri; dördüncü sütununda CT değer ortalamaları; beşinci sütununda  $\Delta Ct$  değerleri; altıncı sütununda  $\Delta\Delta Ct$  değerleri; yedinci sütununda normalize edilmiş gen ifade değişim değerleri bulunmaktadır. Tabloda bağımsız yapılan iki deneyin sonuçları bulunmaktadır. Deney modellerine göre gen ifade değişimi  $\Delta\Delta Ct$  analizi ile bulunmuştur (bakınız: Gereç ve Yöntemler). Normalizasyon için HPRT-1 gen ifadesi kullanılmıştır.



## EK 7: Tüm bulgular toplu halde

	Adezyonda % Artış			Belirlenen Saatte Genin mRNA İfadesinin Normaldekine Göre Artış Kati					Gen mRNA İfadesinde Artışın Görüldüğü Saatler [Belirlenen Saatte İfadenin Referansa <sup>f</sup> Göre Artış Kati] <sup>g</sup>			
	Mo	T	L	RT-PZR <sup>g</sup>			qRT-PZR			A1 <sup>h</sup> ler	A20	HO-1
				A1	A20	HO-1	A1	A20	HO-1			
GENC	78	53		2	5 <sup>d,f</sup>	4	2,4	22	74	4. s - 6. s <sup>c</sup> [1,2]	2. s - 4. s <sup>c</sup> [4]	2. s <sup>c</sup> - 4. s <sup>c</sup> - 6. s <sup>(b)</sup> [4]
	141	114		2	1 <sup>d,f</sup>	2	1,4	8	103	2. s - 48. s [0,7]	2. s - 6. s <sup>c</sup> [1,2]	2. s <sup>c</sup> - 4. s <sup>c</sup> - 6. s <sup>c</sup> - 9. s <sup>(b)</sup> [5]
	93	104		0	1 <sup>d,f</sup>	3	0,7	22	169			
MAE	77		90	2	4 <sup>d,e,f</sup>	6 <sup>e</sup>				2. s - 6. s <sup>c</sup> ; 24. s - 48. s	2. s - 6. s <sup>c</sup> ; 24. s - 48. s	2. s - 6. s <sup>c</sup> ; 12. s - 24. s <sup>c</sup> - 48. s <sup>c</sup>
			40 <sup>a</sup>									

**Mo:** Monosit/makrofaj; **I:** CD4+ T lenfositü; **L:** Kan lökositlen

<sup>a</sup> İnsülin konsantrasyonu 125 µIU/ml

<sup>b</sup> Başka saat test edilmedi

<sup>c</sup> İfade miktarı bir diğer saatekinden en az iki kat fazla

<sup>d</sup> Normal şartlarda ifade yok

<sup>e</sup> Belirlenen saatten farklı olarak 6. saatte

<sup>f</sup> Markırım 100 bç bant yoğunluğu referans alınarak artış kati

<sup>g</sup> Bant yoğunluğu 1 - 15 skalası içinde manuel göreceli değerlendirildi

<sup>h</sup> Denejde kullanılan mononükleer hücre sayısı GENC hücrede kullanılan sayıya normalize edilmiştir

Sol iki sütunda kullanılan endotel hücre hattının ismi ve her birinde uygulanan diyabet stres modelleri belirtilmiştir. Tablonun üst satırında ölçülen yanıt parametreleri ve altında parametre değişkenleri belirtilmiştir. Çapraz kutucuklarında karşılık gelen veriler yazılmış, verisiz kutucuklar karartılmıştır. (1) "Adezyonda % Artış" parametresi altındaki verilere bakıldığında endotel hücrelerin her diyabet stresine karşı mononükleer hücreleri %40-141 arasında daha fazla bağladığı görülmektedir. Veriler göstermektedir ki Tip-I ve Tip-II DM stresleri GENC hücresinin monositleri CD4+ T hücrelerine göre %50 civarı daha fazla bağlamasını sağlamakta, bu fark IGT stresinde ortadan kalkmaktadır. MAE hücresinde yüksek glikozun monosit adezyonunu biraz daha indüklediği görülmektedir. Yüksek konsantrasyonda insülinin GENC hücresine mononükleer hücre adezyonunu yüksek glikoza göre daha arttırdığı ve ve bu artışı IGT sonucunda görüldüğü gibi yüksek glikozun geriye döndürdüğü anlaşılmaktadır. Yüksek insülinin MAE hücresine total lökosit adezyonunu yüksek glikoza göre yarıyarıya düşürdüğü görülmektedir. (2) "Belirlenen Saatte Genin mRNA İfadesinin Normaldekine Göre Artış Katı" parametresi altındaki normalize verilere bakıldığında endotel hücrelerin diyabet streslerine karşı, GENC'in IGT stresi altında A1'ler yanıtı dışında, koruyucu gen mRNA ifadelerini arttırdığı görülmektedir. A20 mRNA'sının diyabet stresi uygulanmayan GENC hücrede ifade seviyesi qRT-PZR ile tam belirlenebilmiştir. Veriler göstermektedir ki Tip II DM modelindeki yüksek insulin konsantrasyonu GENC hücresinde A1'ler ve A20 mRNA ifadesini yüksek glikoz stresine göre daha az indüklemektedir. Bu etki IGT modelindeki yüksek D-glikoz konsantrasyonu ile birleştiğinde A1'ler mRNA ifadesini bazal seviyenin de altına düşürmekte, A20 ifadesinin ise qRT-PZR verisine göre rekonstüsyonuna sessiz kalmaktadır. HO-1 ifadesini üzerinde ise yüksek insülin konsantrasyonu qRT-PZR verisine göre indüksiyon etkisi yapmakta ve bu etki IGT modelinde aditif ifade ile sonuçlanmaktadır. Burada MAE hücresi tip-I DM stresi altında benzer mRNA profili göstermiştir. (3) "Gen mRNA İfadesinde Artışın Görüldüğü Saatler" parametresi sütunu altındaki verilere bakıldığında, 2-48 saat boyunca tip I ve tip II DM stresleri altında kalan GENC hücresinin, Tip II DM'deki A1'ler dışında diğer A1'ler ve A20 mRNA ifadelerini 2- 9'uncu saatler arasına yoğunlaştırdığı ve pik artış(lar)ı 2'nci ve 6'ncı saatler içinde gösterdiği anlaşılmaktadır. Daha kısa periyot boyunca takip edilen HO-1 ifadesi de benzer saattlerde pik artış(lar) yapmıştır. Verileri göstermektedir ki yüksek insülin konsantrasyonu GENC hücrede Tip I modeline göre mRNA ifadelerini daha geniş süreye yaymakta, A1'lerin ifadesini 48 saate kadar uzatmakta ve pik yanıtı burada izin vermemekte, A20 ve HO-1 ifadelerinin pik yanıtlarını 2 saat geciktirmektedir. MAE hücre verisine bakıldığında Tip I DM stresine 2-48 saat boyunca maruziyet sonucunda pik saatlerinin GENC'e göre A20'de 2 saat ve HO-1'da 4 saat geciktiği, ayrıca, tüm ifadelerin iki fazlı yapıldığı görülmektedir. İkinci faz, HO-1'da 12'nci saatte ve diğerlerinde 24'üncü saatte başlamakta ve izlenen 48 saat sonuna kadar sürmektedir. HO-1'da ifadenin gittikçe arttığı izlenmektedir.





**Her hakkı mahfuzdur**