

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PRİMER VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRELERİNDE**  
**HİPERGLİSEMİNİN VE ANJİYOTENSİN II'NİN**  
**METİLGLİOKSAL VE GLİOKSALAZ 1 ÜZERİNE**  
**ETKİSİ**

Mustafa KIRÇA

DOKTORA TEZİ

2019-ANTALYA

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PRİMER VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRELERİNDE**  
**HİPERGLİSEMİNİN VE ANJİYOTENSİN II'NİN**  
**METİLGLİOKSAL VE GLİOKSALAZ 1 ÜZERİNE**  
**ETKİSİ**

Mustafa KIRÇA

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2016-1801 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

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

17/05/2019

**İmza**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA

Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ

Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR

Akdeniz Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Nilgün GÜRBÜZ

Süleyman Demirel Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Ayşegül ÇÖRT

Pamukkale Üniversitesi



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

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

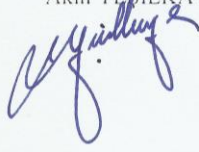
## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Mustafa KIRÇA



Akın YEŞİLKAYA



## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim sürecimden başlayarak doktora tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar tüm aşamalarda her zaman vaktini ve değerli bilgilerini cömertçe paylaşan kıymetli tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA'ya ve bugüne kadar üzerimde emeği bulunan bütün hocalarıma teşekkür ederim.

Yoğun ve stresli zamanlarda desteğini hep yanında hissettiğim eŐim Zeynep'e ve farkında olmasa da bu süreçte varlığıyla bizlerin geleceğe olan ümidini diri tutan kızım Ümmü Gülsüm'e teşekkür ederim.

Bugünlere gelmem için maddi-manevi desteğini esirgemeyen ve ilk eğitim yuvam olan aileme de teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

## ÖZET

**Amaç:** Ang II'nin, glikoliz yan ürünü olarak ortaya çıkan ve diyabetlilerde artmış düzeyleri gözlenen toksik metabolit metilgliksal (MGO) düzeyini artırabileceği ve MGO detoksifikasyonunu sağlayan Glioksalaz 1 (Glo1) enzimi ekspresyonunu baskılayabileceği öne sürülmüştür. Bu amaçla çalışmamızda vasküler düz kas hücreleri (VDKH)'nde Ang II'nin düşük ve yüksek glukoz ortamında Glo1 aktivitesi ve ekspresyonu, GSH derişimi, MGO seviyesi, NF-κB p65 birimi ekspresyonu ve S536 fosforilasyonu ile birlikte Nrf2 ekspresyonu üzerine olan etkisi incelenmiştir. Ayrıca Ang II uyarımlı NF-κB, p38 ve ERK1/2 MAPK aktivasyonlarının Glo1 ekspresyon ve aktivitesine etkisi de incelenmiştir.

**Yöntem:** Sıçan aortasından izole edilen ve primer kültüre edilen VDKH kullanıldı. Ang II uygulanan (100 nM) hücreler düşük ve yüksek glukoz ortamında 48 saat inkübe edildikten sonra hücre lizatları elde edilerek bu lizatlarda ölçümler yapılmıştır.

**Bulgular:** Ang II'nin VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Glo1 aktivite ve ekspresyonunu baskılayarak MGO düzeyini artırdığı, telmisartan ve irbesartan uygulanmasının Ang II'nin etkilerini ortadan kaldırdığı belirlenmiştir. Ang II uyarımlı Glo1 ekspresyonundaki azalmada p38 MAPK ve NF-κB'nin rol aldığı saptandı. Yüksek glukozun MGO miktarını artırdığı, Glo1 ekspresyonunu p38 MAPK ve NF-κB aktivasyonu ile azalttığı belirlendi. Ayrıca düşük glukoz ortamında Ang II'nin ve tek başına yüksek glukozun Nrf2 konsantrasyonunu artırdığı ve bu artışta p38 ve ERK1/2 MAPK aktivasyonunun rol aldığı ortaya konmuştur.

**Sonuç:** Düşük glukoz ortamında Ang, II Nrf2 seviyesini artırabilirse de p38 MAPK ve NF-κB aktivasyonu üzerinden Glo1 ekspresyonunu baskılayarak MGO miktarını artırabilir. MGO'nun hipertansiyon gelişimiyle alakalı RAS aktivasyonu yaptığı gösterilmiştir. Bu çalışma, RAS efektör peptidi Ang II'nin MGO konsantrasyonunu artırarak hiperglisemiye benzer bir etki ortaya çıkarabileceğini önermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** vdkh, ang II, glo1, mgo, nrf2

## ABSTRACT

**Objective:** Ang II is suggested to enhance cellular MGO levels, a glycolysis by-product and elevated concentrations determined in diabetics, by suppressing MGO detoxifying Glo1 enzyme expression. For this purpose, effects of Ang II on Glo1 activity and expression, GSH concentration, MGO level, NF- $\kappa$ B p65 expression, and S536 phosphorylation in addition to Nrf2 expression levels were investigated under low and high glucose conditions in vascular smooth muscle cells (VSMCs). Moreover, impact of Ang II-induced NF- $\kappa$ B, p38 and ERK1/2 MAPK activations on Glo1 expression and activity were explored.

**Method:** VSMCs were isolated from rat aorta and primarily cultured. Ang II-treated cells (100 nM) were incubated 48 hours under low and high glucose media, and then measurements were done in obtained cell lysates.

**Results:** Ang II increased MGO levels by suppressing Glo1 activity and expression under low and high glucose media, while telmisartan and irbesartan treatment abolished Ang II's effects. It is likely that p38 MAPK and NF- $\kappa$ B pathways play role in Ang II-induced reduction in Glo1 expression. High glucose also elevated MGO levels and contributed to the attenuation of Glo1 expression via p38 MAPK and NF- $\kappa$ B pathways activation. Besides, Ang II in low glucose media and apart from it, high glucose elevates Nrf2 expression, p38 and ERK1/2 MAPK activations seem play a role in this elevation.

**Conclusion:** Though Ang II may induce Nrf2 elevation, in low glucose media it may decrease Glo1 expression through p38 MAPK and NF- $\kappa$ B activations, and raise MGO levels in this way. MGO is shown to upregulate RAS associated with hypertension. This study suggests that RAS effector peptide Ang II could display a hyperglycemia-like effect by enhancing MGO concentration.

**Key words:** vdkh, ang II, glo1, mgo, nrf2

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	vi
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	viii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	ix
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Vasküler Duvarın Bileşenleri ve Vasküler Düz Kas Hücreleri	3
2.2. Anjiyotensin II ve Vasküler Etkileri	4
2.2.1. Ang II ile Uyarılan Sinyal Yolları	5
2.2.2. Vasküler Patolojilerde Ang II'nin Rolü	7
2.3. Hipergliseminin Vasküler Etkileri	9
2.4. Glioksalaz Sistemi, Tarihçesi ve Bu Alandaki Araştırmalar	13
2.4.1. Glioksalaz 1 ve Glioksalaz 2 Enzimleri	15
2.4.2. Dikarbonil Stresi ve Metilglioksalın Vasküler Etkileri	17
2.5. Renin-Anjiyotensin Sistemi ve Glioksalaz Sistemiyle İlişkili Sinyal Yolakları	20
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	23
3.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Birim ve Kullanılan Gereçler	23
3.2. Tezde Kullanılan Deney Modeli	24
3.3. Protein Konsantrasyon Ölçümü	27
3.4. NF-κB p65 Serin 536 Fosforilasyon Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Ölçümü	30
3.5. Metilglioksal Düzeyinin Yarışmalı (Competitive) ELISA Yöntemiyle Ölçümü	32
3.6. Glioksalaz 1 (Glo1) Enzim Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Ölçümü	35
3.7. Glioksalaz 1 (Glo1) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	37
3.8. Nrf2 Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Ölçümü	39



3.9.	NF-κB p65 Düzeyinin (Total) ELISA Yöntemiyle Ölçümü	42
3.10.	Redükte Glutatyon Düzeyinin Florimetrik Yöntemle Ölçülmesi	45
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>48</b>
4.1.	Anjiyotensin II Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Glioksalaz 1 Aktivitesini Azaltır	48
4.1.1.	Düşük Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının Glioksalaz 1 Aktivitesine Etkisi	49
4.1.2.	Yüksek Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının Glioksalaz 1 Aktivitesine Etkisi	50
4.2.	Anjiyotensin II ve Yüksek Glukoz Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Glioksalaz 1 Enzim Miktarına Azaltır	52
4.2.1.	Düşük Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının Glioksalaz 1 Enzim Miktarına Etkisi	52
4.2.2.	Yüksek Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının Glioksalaz Enzim Miktarına Etkisi	53
4.3.	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Anjiyotensin II GSH Derişimini Azaltır	54
4.3.1.	Düşük Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının GSH Derişimine Etkisi	55
4.3.2.	Yüksek Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının GSH Derişimine Etkisi	56
4.4.	Anjiyotensin II ve Yüksek Glukoz Vasküler Düz Kas Hücrelerinde MG-H1 Düzeyini Artırır	57
4.4.1.	Düşük Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının MG-H1 Düzeyine Etkisi	58

4.4.2. Yüksek Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının MG-H1 Düzeyine Etkisi	59
4.5. Anjiyotensin II ve Yüksek Glukoz Vasküler Düz Kas Hücrelerinde NF-κB p65 Alt Ünitesinde Serin 536 Fosforilasyonunu Artırır	60
4.5.1. Düşük Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının NF-κB p65 S536 Fosforilasyonuna Etkisi	61
4.5.2. Yüksek Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının NF-κB p65 S536 Fosforilasyonuna Etkisi	62
4.6. Yüksek Glukoz Vasküler Düz Kas Hücrelerinde NF-κB p65 Seviyesini Artırır	63
4.6.1. Anjiyotensin II Düşük Glukoz Ortamında Vasküler Düz Kas Hücrelerinde NF-κB p65 Seviyesini Etkilemez	64
4.6.2. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Yüksek Glukoz Ortamında NF-κB p65 Seviyesini Artışında p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Rol Alır	65
4.7. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Anjiyotensin II ve Yüksek Glukoz Nrf2 Düzeyini Artırır	66
4.7.1. Düşük Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının Nrf2 Düzeyine Etkisi	67
4.7.2. Yüksek Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının Nrf2 Düzeyine Etkisi	68
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>70</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>82</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>86</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>110</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	Arter duvarının genel yapısı.	3
Şekil 2.2.	Metilgliksal detoksifikasyonu sağlayan gliksalaz sistemi.	14
Şekil 2.3.	Metilgliksal oluşumunu sağlayan biyokimyasal yollar.	15
Şekil 2.4.	Metilgliksalin moleküler yapısı.	18
Şekil 3.1.	Mikro BCA yönteminin prensibi.	28
Şekil 3.2.	BSA standart grafiği.	30
Şekil 3.3.	MG-BSA standart grafiği.	34
Şekil 3.4.	Gliksalaz 1 standart grafiği.	37
Şekil 3.5.	Nrf2 standart grafiği.	42
Şekil 3.6.	NF-κB p65 standart grafiği.	44
Şekil 3.7.	Redükte glutatyon standart grafiği.	46
Şekil 4.1.	VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Gliksalaz 1 aktivitesine etkisi.	49
Şekil 4.2.	VDKH'nde düşük glukoz ortamında Ang II'nin Gliksalaz 1 aktivitesine etkisi.	50
Şekil 4.3.	VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Gliksalaz 1 aktivitesine etkisi.	51
Şekil 4.4.	VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Gliksalaz 1 enzim miktarına etkisi.	52
Şekil 4.5.	VDKH'nde düşük glukoz ortamında Ang II'nin Gliksalaz 1 enzim miktarına etkisi.	53
Şekil 4.6.	VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Gliksalaz 1 enzim miktarına etkisi.	54
Şekil 4.7.	VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin GSH derişimine etkisi.	55
Şekil 4.8.	VDKH'nde düşük glukoz ortamında Ang II'nin GSH derişimine etkisi.	56
Şekil 4.9.	VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin GSH derişimine etkisi.	57
Şekil 4.10.	VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin	58

	MG-H1 düzeyine etkisi.	
<b>Şekil 4.11.</b>	VDKH'nde düşük glukoz ortamında Ang II'nin MG-H1 düzeyine etkisi.	59
<b>Şekil 4.12.</b>	VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin MG-H1 düzeyine etkisi.	60
<b>Şekil 4.13.</b>	VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 S536 fosforilasyon düzeyine etkisi.	61
<b>Şekil 4.14.</b>	VDKH'nde düşük glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 S536 fosforilasyon düzeyine etkisi.	62
<b>Şekil 4.15.</b>	VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 S536 fosforilasyon düzeyine etkisi.	63
<b>Şekil 4.16.</b>	VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 düzeyine etkisi.	64
<b>Şekil 4.17.</b>	VDKH'nde düşük glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 düzeyine etkisi.	65
<b>Şekil 4.18.</b>	VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 düzeyine etkisi.	66
<b>Şekil 4.19.</b>	VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Nrf2 düzeyine etkisi.	67
<b>Şekil 4.20.</b>	VDKH'nde düşük glukoz ortamında Ang II'nin Nrf2 düzeyine etkisi.	68
<b>Şekil 4.21.</b>	VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Nrf2 düzeyine etkisi.	69
<b>Şekil 6.1.</b>	Ang II ve yüksek glukozun Glo1 ekspresyonunu baskılaması.	85

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b>	MG- BSA standart hazırlama tablosu.	33
<b>3.2.</b>	Gliksalaz 1 ölçümü için standart hazırlama tablosu.	36
<b>3.3.</b>	Nrf2 ölçümü için standart hazırlama tablosu.	40
<b>3.4.</b>	NF-κB p65 ölçümü için standart hazırlama tablosu.	43
<b>6.1.</b>	Düşük glukoz ortamındaki toplu sonuçlar.	84
<b>6.2.</b>	Yüksek glukoz ortamındaki toplu sonuçlar.	84

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ACE</b>	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (Angiotensin Converting Enzyme)
<b>ADAM17</b>	A Disintegrin and Metalloprotease 17
<b>AGE</b>	İleri Glikasyon Son Ürünleri (Advanced Glycated End Products)
<b>APC</b>	Aktive Protein C
<b>ARB</b>	Anjiyotensin II Tip 1 Reseptör Blokörü
<b>ARE</b>	Antioksidan yanıt elementi (Antioxidant Response Element)
<b>AT1R</b>	Anjiyotensin II Tip 1 Reseptör
<b>AT2R</b>	Anjiyotensin II Tip 2 Reseptör
<b>BMP-2</b>	Kemik morfojenik protein-2 (Bone Morphogenic Protein-2)
<b>BREC</b>	Sığır retinal endotelial hücreleri (Bovine Retinal Epithelial Cells)
<b>BRP</b>	Sığır retinal perisit (Bovine Retinal Pericyte)
<b>DHAP</b>	Dihidroksiaseton fosfat
<b>DG</b>	Düşük glukoz
<b>E2F4</b>	E2F transkripsiyon faktör 4
<b>ELISA</b>	Enzim bağlantılı immün test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
<b>ET-1</b>	Endotelin-1
<b>ESM</b>	Ekstraselüler matriks
<b>EGFR</b>	Epidermal büyüme faktörü reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor)
<b>ERK</b>	Ekstraselüler sinyalle regüle edilen kinaz (Extracellular signal Regulated Kinase)
<b>Glo1</b>	Gliksalaz 1

<b>Glo2</b>	Glioksalaz 2
<b>GA3P</b>	Gliseraldehit-3-fosfat
<b>HB-EGF</b>	Heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor)
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	Hipoksiyle İndüklenebilen Faktör-1 $\alpha$
<b>HRP</b>	Yabanturpu Peroksidazı (Horseradish Peroxidase)
<b>IGF-I(R)</b>	İnsülin benzeri Büyüme Faktörü-I (Reseptörü) (Insulin-like Growth Factor-I (Receptor))
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	İnterlökin-1 $\beta$
<b>IRE</b>	İnsülin yanıt elementi (Insulin Response Element)
<b>IRS-1</b>	İnsülin Reseptör Substrat-1
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal Kinaz
<b>KVH</b>	Kardiyovasküler Hastalıklar
<b>MAPK</b>	Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz
<b>MG-H1</b>	Metilglioksal kökenli Hidroimidazolon-1
<b>MGO</b>	Metilglioksal
<b>MMP</b>	Matriks Metalloproteinaz
<b>miR</b>	Mikro RNA
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>NRF2</b>	Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
<b>PDGF(R)</b>	Platelet kökenli büyüme faktörü (reseptörü) (Platelet Derived Growth Factor (Receptor))
<b>PKC</b>	Protein Kinaz C

<b>RAS</b>	Renin Anjiyotensin Sistemi
<b>RAGE</b>	İleri Glikasyon Son Ürünleri Reseptörü (Receptor for Advanced Glycated End Products)
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
<b>VDKH</b>	Vasküler Düz Kas Hücreleri
<b>YG</b>	Yüksek Glukoz
<b>WK</b>	Wistar Kyoto



## 1. GİRİŞ

Çağımız modern toplumlarında en sık karşılaşılan hastalıkların başında kardiyovasküler hastalıklar (KVH) gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayımladığı 2018 Dünya Sağlık İstatistiklerinde KVH sebebiyle gerçekleşen ölümler %44'lük oranla ilk sıradadır (WHO, 2018). Ülkemizde 2017 yılında tüm ölümlerin %39,7'si dolaşım sistemi hastalıkları kaynaklıyken, bunların %9'unu hipertansif hastalar oluşturmaktadır (TÜİK, 2018). Günümüzde hipertansiyonun multifaktöriyel bir hastalık olduğu kabul edilmekte ve damar düz kasında meydana gelen yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin hastalık patofizyolojisinde rol aldığı düşünülmektedir. Damar yapısında yer alan vasküler düz kas hücrelerinin (VDKH) aşırı proliferasyonu ve migrasyonu damarın kasılma-gevşeme ve düzgün kan akımını sağlamasını bozmakta, sonuç olarak bu değişiklikler hipertansiyonda olduğu kadar ateroskleroz gelişimi ve inme gibi ciddi patolojik bozukluklarda rol oynamaktadır (Roifman ve ark., 2011). Hipertansif hastalar plazma Anjiyotensin II (Ang II) düzeyi yüksekliği ile karakterize olup, Ang II damar yapısında hücre proliferasyonu, migrasyon, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi gibi etkilere yol açarak kan akımı ve arteriyel basıncın düzenlenmesinde yer alan VDKH'ni etkiler (Mondaca-Ruff ve ark., 2018).

KVH'a benzer şekilde dünya genelinde yaygın olan bir diğer sağlık sorunu ise diabetes mellitustur (DM). Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun diyabet atlasına göre Türkiye'deki 2017 yılında DM prevalansı %12,8 ve diyabetli kişi sayısı yaklaşık 6,7 milyon iken 2045 yılında prevalansın %16,5 ve diyabetli kişi sayısının yaklaşık 11,2 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (IDF, 2017). Diyabetin yol açtığı hiperglisemi tablosu KVH için en önemli risk faktörlerinden birisidir (Pistrosch ve ark., 2011). Damar yapısında ise hipergliseminin etkilediği hücresel yapılardan birisi de VDKH'dir (Pasquier ve ark., 2015).

Yüksek kan glukozunun diyabetik komplikasyonlarından sorumlu moleküller içerisinde en önemlilerden birisi de AGE'lerdir (Advanced Glycated End products). AGE oluşumuna kandaki yüksek glukozun yol açtığı düşünülüyordu (Westwood ve Thornalley, 1995; Kawasaki ve ark., 2002; Maessen ve ark., 2015) fakat daha sonraki araştırmalar metilglioksal (MGO) molekülünün rolü olduğunu ortaya koymuştur (Schalkwijk, 2015). Glikasyon reaksiyonunda MGO'nun glukozu kıyasla 20 bin kata

kadar daha reaktif olduğu gösterilmiş (Phillips ve Thornalley, 1993) ve en g¼c¼l¼ glikasyon ajanı olduğu belirtilmiştir (Shinohara ve ark., 1998; Schalkwijk, 2015). İlerleyen zamanlarda MGO'nun diyabet, obezite, kanser, hipertansiyon ve ateroskleroz ile ilişkisi ortaya konmuştur (Maessen ve ark., 2015; Rabbani ve ark., 2016). Diyabetli hastalarda plazma MGO d¼zeyleri tip 1 diyabetlilerde 5-6 kat, tip 2 diyabetlilerde ise 2-3 kat daha y¼ksek saptanmıştır (McLellan ve ark., 1994; Hanssen ve ark., 2017).

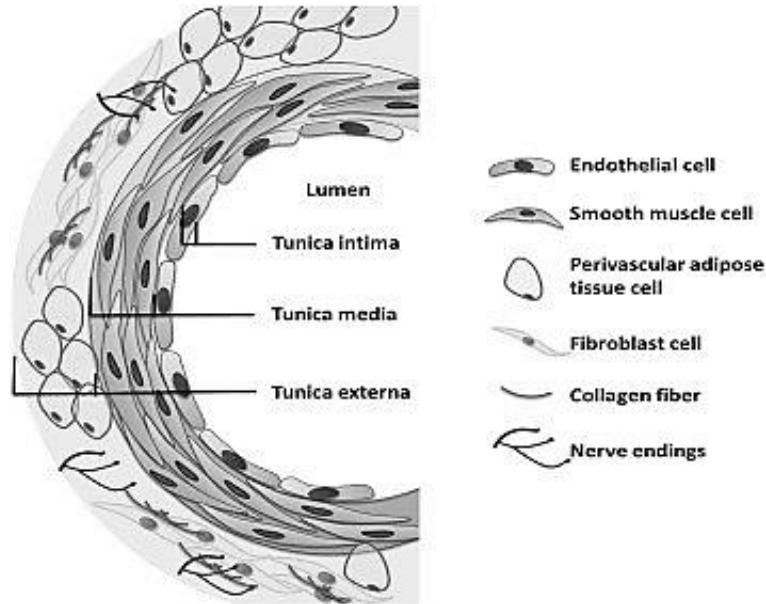
Metilglioksal metabolizmada glikolizin bir yan ¼r¼n¼ olarak ortaya çıkmaktadır. Olduğca reaktif ve toksik bir dikarbonil bileşiği olan MGO detoksifikasyonunu glioksalaz sistemi gerçekleştirir. Bu sistem glioksalaz 1 (Glo1), glioksalaz 2 (Glo2) enzimleri ve red¼kte glutatyondan (GSH) oluşur. Sağlıklı bireylerde bu sistem etkin bir şekilde çalışırken, diyabetli kişilerde y¼ksek kan glukozuna bağlı olarak glikolizin daha fazla gerçekleşmesi, AGE resept¼r¼ (RAGE: Receptor for Advanced Glycation Endproducts) aktivasyonu (Rabbani ve ark., 2014), diyabetlilerde d¼ř¼k Glo1 d¼zeyi (Hamoudane ve ark., 2015) gibi sebeplerle yetersiz kalarak tip 1 ve tip 2 diyabetli bireylerde plazma MGO d¼zeyleri daha y¼ksek seyretmektedir (McLellan ve ark., 1994). Glukoz metabolizmasının renin-anjiyotensin sisteminden (RAS) etkilendiğini (Favre ve ark., 2015), RAS inhibit¼r¼lerinin hipertansif hastalarda diyabeti ¼nlediđini veya insidansını azalttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Bosch ve ark., 2006; Andraws ve Brown, 2007; McMurray ve ark., 2010). Diğer taraftan MGO'nun hipertansiyonlularda artmış olduğu, RAS aktivasyonu yaptığı bildirilmiş, MGO d¼zeylerinin d¼ř¼r¼lmesinin kan basıncını d¼ř¼rd¼đ¼ yapılan çalışmalarla g¼sterilmiřtir (Wang ve ark., 2005; Wang ve ark., 2007; Dhar ve ark., 2008; Wang ve ark., 2008; Dhar ve ark., 2014).

Bu alışmada Ang II'nin glioksalaz sistemi ¼zerine olan etkisinin primer k¼lt¼re edilmiş VDKH'nde d¼ř¼k ve y¼ksek glukoz ortamında incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Ang II'nin VDKH'nde Glo1 aktivitesi, Glo1 d¼zeyi, MGO d¼zeyi, yine bu sistemle ilişkili olarak red¼kte glutasyon, Nrf2 d¼zeyi ve NF-κB d¼zeylerine etkisi incelenmiştir. Bunun yanı sıra telmisartan ve irbesartana ek olarak Ang II ile ilişkili sinyal yolaklarından olan ERK1/2, p38 MAPK ve NF-κB'nin rolleri irdelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Vasküler Duvarın Bileşenleri ve Vasküler Düz Kas Hücreleri

Kalpten aldığı kanı perifere ulaştıran ve bu amaca uygun olarak elastik bir yapıda olan arterler Şekil 1'de görülebileceği gibi içten dışa doğru üç tabakadan oluşur: tunica intima, tunica media ve tunica externa (adventisya) (Shepherd ve Vanhoutte, 1979). İntima tabakası monolayer vasküler endotel hücreler ve bu tabakayı media tabakasından ayıran internal elastik membrandan oluşur. Media tabakası VDKH ile bu tabakayı adventisyadan ayıran eksternal elastik membrandan (fibröz doku ve elastin içerir) oluşur. Adventisya ise perivasküler adipoz doku hücreleri, fibroblastlar ve kollajenden oluşur (Zhao ve ark., 2015).



**Şekil 2.1.** Arter duvarının genel yapısı. Duvar yapısındaki düz kas hücreleri media tabakasında yer alırlar.

VDKH damar yapısını oluşturan ana hücreler olup farklı yapısal ve fizyolojik roller üstlenmiş ve yüksek derecede özgülleşmiş hücrelerdir. Gelişim esnasında ekstraselüler matriks (ESM) üreterek arter duvarının dolaşım kanının yüksek basıncına karşı koymasında, yetişkin yaşamında ise hasar sonrasında arter duvarının tamirinde görev alırlar. Rezistans arter damarlarında kanı pompalayan kalbin ürettiği kan akımını sağlamak, kan basıncını regüle etmek, damar gerilimini sağlamak ve kontraksiyon bu hücrelerin temel görevleri arasındadır. Yetişkin damar yapısındaki VDKH düşük proliferasyon hızı ve düşük sentetik aktiviteye sahip bir fenotipteyken lokal çevrelerindeki bir takım sinyallere bağlı olarak artmış proliferasyon ve sentetik

aktivitedeki fenotipe dönüşerek patofizyolojik roller üstlenebilmektedirler (Regnault ve ark., 2012). Bu fenotipe dönüşen hücrelerde ESM üretimi, proliferasyon, migrasyon ve kontraktıl protein sentezinde artış gözlenebilmektedir. Damar duvarında hasar sonrası oluşan bu değişim damarda yeniden farklılaşma sürecini başlatır. Yeniden farklılaşma süreci (remodeling) ateroskleroz, stent takılması veya by-pass sonrası restenoz ve hipertansiyon gelişiminde rolü olan temel patofizyolojik mekanizma kabul edilmektedir (Owens, 1995; Owens ve ark., 2004; Muto ve ark., 2007).

## **2.2. Anjiyotensin II ve Vasküler Etkileri**

Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAS veya RAAS) vazokonstriksiyon, sıvı hacmi regülasyonu, kardiyak output, hücre büyümesi ve vasküler duvarın bütünlüğü gibi fizyolojik fonksiyonları yerine getirir. RAS'ın endokrin ve lokal etkili bir bileşeni olan anjiyotensin peptidlerinin sentezi klasik olarak karaciğerde anjiyotensinojen molekülü ile başlar ve bu yapı kana salınır. Diğer taraftan böbreklerde renal glomerüle komşu jukstaglomerüler hücrelerde prorenin sentezlenir, proteolitik kesime uğrar ve sonrasında sekretuar veziküllere alınıp pro- kısmının uzaklaştırılmasıyla katalitik olarak aktif renin enzimi sistemik dolaşıma salınır. Dolaşımdaki renin enzimi ilk olarak karaciğerden kana salınan anjiyotensin molekülünü kesime uğratarak 10 amino asitlik anjiyotensin I molekülünü açığa çıkarır. Daha sonra anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE; angiotensin-converting enzyme) bir kesim işlemiyle 8 amino asitlik oktapeptid yapıdaki (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) Ang II yapısını açığa çıkarır (Forrester ve ark., 2018).

Dolaşımdaki sistemik RAS (endokrin RAS da denir) yanında RAS bileşenlerinin lokal olarak da üretildiği ve etkileri de artık bilinmektedir (Lavoie ve Sigmund, 2003; Coble ve ark., 2015; Satou ve ark., 2015). Ang II vazoaktif bir peptid olmasına karşın vazokonstriksiyon görevinden alakasız olarak farklı dokularda pek çok hücreyel fonksiyonu etkilediği ve hormon benzeri etkiler gösterdiği bulunmuş, bu durum bir anlamda bu molekülle ilgili araştırmaları diri tutarak sonrasında Ang II'nin tam tersi etki göstererek onun etkilerini ortadan kaldırdığı düşünülen anjiyotensin-1-7 ve Mas reseptörü gibi yapıların bulunmasına katkı sunmuştur (Bader, 2013). Ang II'nin temel fizyolojik fonksiyonu kan basıncını düzenlemektir ve bu yüzden de hipertansiyonda çok önemli bir oyuncudur. Bu sebeple RAS blokerleri uzun yıllardır antihipertansif medikasyon olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

### 2.2.1. Ang II ile Uyarılan Sinyal Yolları

Ang II etkilerini kendisine ait iki reseptör üzerinden gösterir: Ang II tip 1 (AT1R) ve tip 2 reseptörü (AT2R). AT1 reseptörü VDKH, endotel, kalp, beyin, böbrekler, adrenal bez ve adipoz doku gibi farklı dokularda bulunur ve Ang II'nin pek çok fizyolojik fonksiyonuna aracılık eden reseptördür. 41 kDa ağırlığında ve G-protein eşli reseptör ailesine ait olan bu reseptör 359 amino asitten oluşur (de Gasparo ve ark., 2000). Kemirgenlerde ise AT1R 2 alt tipe sahiptir, bunlar AT<sub>1A</sub>R ve AT<sub>1B</sub>R olarak bilinir. AT2 reseptörü fetal dokularda yüksek düzeylerde eksprese edilirken doğumdan sonra düzeyi hızla düşer. Yetişkinlerde düşük düzeyde olmak kaydıyla böbrek, kalp, pankreas, adrenal bez, damar ve beyinde tespit edilebilir. Damar yapısında esasen adventisyada bulunurken media tabakasında da saptanabilir (Touyz ve Schiffrin, 2000). AT1 reseptörüne Ang II bağlanmasına müteakip heterotrimerik G proteinler ile etkileşim meydana gelir ve inozitol trifosfat, diaçil gliserol, araşidonik asit ve ROS gibi ikincil mesajcılar üretilerek fosfolipaz C, A ve D aktive edilir. Bulunduğu dokuya bağlı olarak bu sinyaller farklı etkilere yol açarlar. VDKH örneğinde olduğu gibi bu hücrelerde tipik olarak G<sub>q/11</sub> Ca<sup>2+</sup>-sensitif miyozin hafif zincir kinaz aktivasyonu ve G<sub>12/13</sub> Rho/Rho kinaz-aracılı miyozin hafif zincir fosfataz inhibisyonu sağlayarak kontraksiyon düzenlenir (Forrester ve ark., 2018). Ang II pek çok intraselüler protein kinazı aktive eder. Bunlar arasında reseptör ve nonreseptör tirozin kinazlar ile MAPK (mitogen-activated protein kinase) ailesi, Akt ve PKC'yi içeren serin/treonin kinazlar bulunur. Açıkçası Ang II'nin AT1R üzerinden aktive ettiği protein kinazlar tablosu gün geçtikçe genişlemekte ve listeye yeni üyeler eklenmektedir. Şu ana kadar Ang II tarafından aktive edilen 50'ye yakın protein kinaz bildirilmiştir. Bunlar arasında ilk etapta serin/treonin kinazlardan ERK1/2, JNK, p38 MAPK, protein kinaz C (PKC), ROCK, RAF, MLCK, CaMKII, IKK, PI3K, p70S6K, AKT ve mTOR, nonreseptör tirozin kinazlardan JAK ve c-Src, reseptör tirozin kinazlardan EGFR, IGFR ve PDGFR, yeni tanımlanan protein kinazlardan PERK ve AMPK sayılabilir.

Yapılan çalışmalar Ang II uyarımlı AT1R bağımlı büyüme faktörü reseptör transaktivasyonunu ortaya koymuştur. Aracı moleküller olarak Ca<sup>2+</sup> ve ROS'un yer aldığı ve alt yolda ADAM17 (A Disintegrin and Metalloproteinase) aktivasyonu ve HB-EGF salınması sonrası gerçekleşen olay neticesinde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) aktivasyonu meydana gelir ki bu reseptörün kendine ait olmayan bir ajan tarafından aktive edildiği için de olaya transaktivasyon denmiştir. EGFR

transaktivasyonu Ras-GTP oluşumu ve MAPK/ERK ile Akt/mTOR/p70S6K kaskadlarının aktivasyonunu doğurur ve bu şekilde VDKH'nde hipertrofi ve migrasyona katkı sağlar (Forrester ve ark., 2016). Ang II'nin VDKH'nde platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) reseptörü (PDGFR) ve insülin-benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) reseptörü (IGF-IR) transaktivasyonu yaptığı bilinmektedir (Duerrschmid ve ark., 2015). PDGFR transaktivasyonunun vasküler hipertrofi ve fibrozise aracılık ettiği bildirilmiştir (Mondorf ve ark., 2000). Ang II'nin nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazı (Nox) uyararak süperoksit ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimini uyardığı da bilinmektedir (Mehta ve Griendling, 2007). Genel olarak Ang II'nin Nox ailesi üyelerinin ekspresyon ve katalitik aktivitelerini artırarak ROS üretimini artırdığı düşünülmektedir (Garrido and Griendling 2009).

Şimdiye kadar Ang II ve AT1R üzerine yapılan çalışmalar birçok tirozin ve serin/treonin kinazın incelenmesi, substratlarının fosforilasyonları ve ROS'un vasküler patolojiye katkısını incelerken, bugün daha farklı yönde araştırmalar yapıldığı görülmektedir. Bunlar arasında intraselüler, ekstraselüler/mekansal (spatial) ve zamansal (temporal) organel sinyal iletişimleri, hücre ve doku metabolik modülasyonu, posttranslasyonel modifikasyonlar üzerinden sinyal iletimi, mikro RNA'lar (miR) ve uzun kodlamayan (long noncoding) RNA'lar sayılabilir. Ayrıca genetiği değiştirilmiş kemirgenlerde yapılan çalışmalar Ang II'nin sinyal mekanizmaları, fizyoloji ve patofizyolojisi hakkındaki bilgi dağarcığını artırmaktadır (Forrester ve ark., 2018). Son yıllarda Ang II'nin aktive ettiği yeni belirlenmiş sinyal yolları içerisinde Wnt/ $\beta$ -katenin yolağı, Notch sinyal yolağı, NRLP3 inflamazom ve Hippo yolağı da vardır. Wnt ailesi embriyonik gelişim esnasında hücre yanıtını regüle eden temel mekanizmalardan biridir. İlginç bir şekilde birçok RAS geninin Wnt/ $\beta$ -katenin yolağının hedefi olduğunu göstermiştir (Zhou ve ark., 2015). Wnt/ $\beta$ -katenin yolağının vasküler patofizyolojide de rol oynadığı, VDKH'nde Ang II'nin hızlı bir şekilde  $\beta$ -katenin nükleer birikimini uyardığı (Cui ve ark., 2016), ayrıca Wnt yolağının ateroskleroz ve abdominal aortik anevrizmaya katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Krishna ve ark., 2017). Notch yolağı gelişimsel proseslerde gerekli olsa da KVH patolojisi ile ilişkisi son zamanlarda çalışılmaya başlanmıştır. İnsan VDKH'nde Notch aktivasyonunun AT1R üzerinden gerçekleştiği gösterilmiş, bu yolağın VDKH migrasyonu ve vasküler düzenlenmede rol aldığı belirtilmiştir (Ozasa ve ark., 2013).

Bunların dışında Ang II'nin uyarımıyla gerçekleşen organeller arası iletişim de çalışılan güncel konular arasındadır. Ang II uyarımlı hipertansiyon ve vasküler disfonksiyon VDKH'nde mitokondriyal ROS bağımlı L-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının aktivasyonunu da kapsar (Chaplin ve ark., 2015). Ang II'nin VDKH'nde Drp1 fosforilasyonu ile mitokondriyal fizyon/fragmentasyona neden olduğu, Drp1'in susturulmasının (silencing) Ang II uyarımlı ERK aktivasyonu ve matriks metalloproteinaz (MMP)-2/9 indüksiyonunu azalttığı gösterilmiştir (Lim ve ark., 2015). Bugün kardiyovasküler patolojilerle ilişkisi gösterilmiş olan endoplazmik retikulum stresinde (ERS) Ang II'nin ERS belirteçlerinden olan PERK ve eIF2 $\alpha$  fosforilasyonu yaptığı belirlenmiştir (Kassan ve ark., 2012; Liang ve ark., 2013).

### **2.2.2. Vasküler Patolojilerde Ang II'nin Rolü**

VDK hücreleri vasküler bütünlük ve tonun sürdürülmesinde çok önemlidir. Damar duvarının ana bileşenlerinden olup birçok fonksiyonel ve yapısal fonksiyonu üstlenirler. Bu hücreler dinamik, yüksek derecede plastisite gösterebilen ve multifonksiyonel hücreler olup hücre büyümesi (hiperplazi ve hipertrofi), apoptozis, hücre uzaması, reorganizasyon, ekstraselüler matriks protein üretiminde artış, fibrozis, migrasyon ve inflamasyonu etkileyerek damarın yeniden yapılanması sürecine katılırlar (Savoia ve ark., 2011; Lacolley ve ark., 2012). Ayrıca bu hücreler sakin (quiescent) kontraktıl bir fenotipteyken patolojik koşullarda proliferatif, sentetik bir fenotipe dönüşebilirler ki bu durum birçok KVH tablosundaki vasküler hasara katkı sağlar. Ang II, AT1R üzerinden etki ederek kontraktıl makine, vasküler hipertrofi/proliferasyon ve kontraktıl, mitojenik, inflamatuvar ve pro-fibrotik mediyatörlerin sekresyonunu değiştirmek suretiyle proliferatif ve sentetik bir fenotipe geçişi sağlar. Bu etkilerin bir kısmı transkripsiyon faktörleri tarafından regüle edilir ve yapılan çalışmalar miR'ların VDKH'nde Ang II tarafından modüle edildiğini göstermiştir. Özellikle miR-143/145, miR-21 ve miR-1'in kontraktıl fenotipi (patolojiye yol açmayan) teşvik ederken, aksine miR-221, miR-146a, miR-24 ve miR-26a'nın vasküler hasarla ilişkili sentetik fenotip ve proliferasyonla ilişkili olabileceği belirtilmektedir (Montezano ve ark., 2014). Arterlerin kalsifikasyonu KVH'lı bireylerde kardiyovasküler olay gelişip gelişmeyeceğinin bir göstergesidir. İleri yaş, kronik böbrek hastalığı, diyabet, ateroskleroz ve hipertansiyonlu bireylerde yaygın olup kardiyovasküler morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (Diep ve ark., 2002; Sigmund, 2010). Vasküler kalsifikasyon kompleks ve dinamik bir süreç olup birçok

mekanizmayı içerir ve damar duvarında kalsiyumun çökmesi ve birikmesi ile gerçekleşir. Bu durum ise arter sertliğinin artması, elastikiyetin azalması ve sonunda o bölgede kan akışının bozulması ile kardiyovasküler fonksiyon bozukluğu ile neticelenir (Anand ve ark., 2007; Schiffrin ve ark., 2007). Vasküler kalsifikasyon kemik oluşumuna benzer şekilde hiperfosfatemi ve hiperkalsemi gibi mineral metabolizması bozukluklarının da aralarında bulunduğu faktörler VDKH'nin farklılaşmasını uyararak osteoblastik bir fenotip kazanmasına neden olurlar (Tyson ve ark., 2003; Huybers ve Bindels, 2007). Normal kemik gelişiminde ve osteokalsin, osteonektin, alkalın fosfataz, kollajen-1 ve kemik sialoprotein gibi osteojenik proteinlerin ekspresyonunun kontrolünde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin artışı (cbfa1 (core-binding factor 1 $\alpha$ )/Runx2, MSX-2 ve kemik morfojenik protein 2 (BMP-2)) VDKH'nin farklılaşmasındaki temeli oluşturur (Li ve Giachelli, 2007; Li ve ark., 2008). Ateroskleroz vasküler duvarda kronik inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanır ve intimal tabakada plak oluşumu ile karakterizedir.

Yaşamın ilk dekadında aterosklerozun ilk işareti olarak kabul edilen yağlı çizgiler (fatty streaks) mevcut olsa da ilerleyen yıllarda küçük lezyonlar büyümeye, birer fibröz plak haline dönüşmeye ve sonunda lümen çapında küçülme ve kan damarının tıkanıklığına yol açar. Aterogenezi tam olarak neyin başlattığı bilinmese de okside LDL'nin (düşük dansiteli lipoprotein) ilk tetikleyicilerden olduğu kabul edilmektedir. Okside LDL (oxLDL) proinflamatuvar özelliklere sahiptir ve ilişkili sinyal yollarını aktive eder (Steinbrecher ve ark., 1984; Virmani ve ark., 1987). Birçok yolağın yanı sıra oxLDL'nin VDKH'nde CD36 ve TLR4 (Toll-like receptor 4) ile etkileşime girerek inflamatuvar sitokinlerin üretimini artırdığı (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 ve MCP-1), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) ve G-CSF (Granulocyte-Colony-Stimulating Factor) gibi büyüme faktörlerinin düzeyini artırarak makrofajların farklılaşması ve lezyonun olduğu bölgeye makrofajların toplanmasını sağlar. VDKH mediadan intimaya göç ederek proliferer olur, farklılaşır ve ileri düzey aterosklerotik plaklarda plak stabilitesinde çok önemli olan fibröz kapağı (cap) oluşturmak için ekstraselüler matriks üretirler (Wang ve ark., 2012; Kiyan ve ark., 2014). Lektin-benzeri okside LDL reseptörü-1 (LOX-1) endotel ve VDKH'nde bulunan scavenger bir reseptördür ve oxLDL ile etkileşimi sağlar. LOX-1 ekspresyonu inflamatuvar uyarı, ROS, oxLDL, ve Ang II tarafından uyarılır (Hu ve ark., 2007). LOX-1'in oxLDL ile aktivasyonu büyük miktarda ROS üretilmesine, Nox üzerinden



AT1R upregülasyonuna, MAPK ve NF-κB artışına yol açar ki bu da AT1R ve LOX-1 arasında ilişki olduğunu gösterir (Cominacini ve ark., 2000; Taye ve ark., 2010). Ateroskleroz patogenezinde RAS önemli bir oyuncudur. Aterosklerozda AT1R ekspresyon artışı gösterilmiş olup bu reseptörün inhibisyonunun ateroskleroz gelişimi ve metabolik bozukluklarda koruyucu etkileri bildirilmiştir. Ang II adezyon molekülleri, kemokin ve sitokinlerin ekspresyonunu uyararak endotel disfonksiyonuna aracılık eder, LDL oksidasyonu ile alımını (uptake) ve VDKH proliferasyonunu artırır. Proaterojenik bu etkilerin birçoğuna Nox aracılı ROS'un sebep olduğu düşünülmektedir. Ayrıca diyabetlilerdeki hızlanmış aterosklerozda Nox1'in önemli olduğu, ileri düzey aterosklerozda Ang II'nin MMP ve PAI-1 (plazminojen aktivatör inhibitör-1) ekspresyonunu uyararak aterosklerotik plak destabilizasyonuna yol açtığı söylenmiştir (Hu ve ark., 2008; Fukuda ve ark., 2010; Montezano ve ark., 2014). Ang II bütün vasküler hücreleri etkileyerek KVH patogenezinde önemli bir yer işgal eder. Daha dar kapsamda VDKH üzerindeki etkilerini büyüme, kontraksiyon, migrasyon, hipertrofi, lipid oksidasyonu, fibrozis ve hücre iskeleti düzenlenmesi şeklinde özetleyebiliriz. Bu etkiler neticesinde inflamasyon, ateroskleroz, trombozis ve fibrozis gelişir ki bunun sonucunda da ortaya çıkan tablo miyokard infarktüs, inme (stroke), diyabetik makro ve makrovasküler komplikasyonlar, periferel vasküler hastalık ve konjestif kalp yetmezliği olabilmektedir (Mehta ve Griendling, 2007).

### **2.3. Hipergliseminin Vasküler Etkileri**

Kardiyovasküler hastalıklar ve daha spesifik olarak aterosklerozis hem tip 1 hem de tip 2 diyabet hastalarında sağlıklı kişilere kıyasla çok daha hızlı bir şekilde ilerlemektedir ve bu durum literatürde hızlandırılmış (accelarated) KVH veya ateroskleroz olarak geçmektedir. Ateroskleroz tip 1 ve 2 diyabetlilerde mortalitenin ana sebebiyken inme, koroner kalp hastalığı ve periferel arter hastalığı da bu kişilerde genel popülasyona kıyasla daha erken ve daha yaygın görülmektedir (Kanter ve ark., 2007). Diyabetli hastalarda gözlenen bu durumun en büyük sorumlusu tahmin edilebileceği üzere bu kişilerdeki hiperglisemi tablosudur. Öyle ki hipergliseminin kontrol altına alınarak kan şekerinin belli bir düzeye düşürülmesi bile uzun süre kontrol altına alınmamış hipergliseminin neden olduğu yıkıcı etkileri önleyememekte ve makrovasküler komplikasyonları azaltamamakta, kardiyovasküler sistemde uzun soluklu yıkıcı etkilere neden olmaktadır. Bu durum metabolik veya hiperglisemik hafıza olarak tanımlanmakta ve diyabetik komplikasyonları önlemede sadece kan

şekerinin düşürülmesinin yeterli olamayacağını söylemektedir ki yapılan çalışmalar bu görüşü destekler niteliktedir (Rask-Madsen ve King, 2013; Costantino ve ark., 2015). Böyle bir “hafıza” durumu varsa şayet bu fenomenin hiperglisemi varlığından bağımsız olarak ROS üretimi, daha önceden üretilen AGE varlığına bağlı olarak overeksprese olmuş RAGE düzeyi, mitokondriyal proteinlerin glikasyon seviyesi ve üretilen mitokondriyal DNA (mtDNA) miktarı, epigenetik mekanizmalarla post-translasyonel histon metilasyonu ve son olarak miR düzeyine bağlı olarak gerçekleşiyor olabileceği, sonuçta bu mekanizmaların gen ekspresyon paternini değiştirebileceği ve bu durumda hiperglisemi normalize edilse de kalıcı vasküler hasar ve yüksek KVH mortalite ve morbiditesi görülebileceği ileri sürülmüştür (Ceriello, 2012; Misra ve Bloomgarden, 2018). Aterosklerozda görev alan hücre tiplerinden diyabetik bir çevreye ilk yanıt veren hücreler endotel, myeloid ve vasküler düz kas hücreleridir (Bornfeldt, 2014).

Diyabetin vasküler patolojisinin anlaşılmasında yapılan çalışmalar göstermiştir ki hasarın moleküler mekanizmaları ile endojen koruyucu faktörler arasında bir denge durumu söz konusudur ve bu dengenin hastalığa yol açan mekanizmalar lehine bozulması vasküler komplikasyonlar ile sonuçlanır. Diyabetin neden olduğu hiperglisemi serbest yağ asitleri ve modifiye LDL kolesterol miktarını artırırken HDL miktarını ise azaltır. Şayet koruyucu faktörler olan anti-inflamatuvar faktörler, antioksidan enzimler, insülin, PDGF, VEGF ve protein C (APC) gibi yapılar hipergliseminin etkilerini dengeleyemezse hasar mekanizmaları aktive olur. Bunun neticesinde AGE, ROS, Ang II, NF-κB aktivitesi, inflamatuvar sitokinler, lökosit adezyonu ve PKC aktivitesi artış gösterir ve ortaya çıkan tablo ateroskleroz, nefropati ve retinopati ile sonuçlanır. Tip 2 diyabette vasküler endotelial ve VDKH’nde bozulmuş insülin sinyalizasyonu da hipergliseminin vasküler patolojilerine katkı sağlar. Artmış serbest yağ asitleriyle birlikte hiperglisemi endotelin-1 (ET-1), Ang II ve sitokinleri artırarak PKC’yi aktive eder. Aktive PKC insülin reseptör substrat (IRS)’yi ve PI3K’nın p85 alt ünitesini fosforilleyerek insülin uyarımlı PI3K sinyal yolağının aktivasyonunu inhibe eder, bu esnada MAPK sinyali korunur veya daha da artar. Vasküler hücrelerdeki selektif insülin rezistansı bozulmuş vazodilatasyon ve anjiyogenez, azalmış antioksidan etkiler ve artmış lökosit adezyonu ile sonuçlanır (Rask-Madsen ve King, 2013). VDKH’nin anormal aktivasyonuna birçok faktör

potansiyel olarak katılsa da genel olarak hipergliseminin ana faktör olduğu düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2017).

Hipergliseminin spesifik olarak VDK hücreleri üzerine etkileri de yapılan çalışmalarda incelenmiştir. VDKH'nin yüksek glukozla (25 mmol/L) çok kısa süre (0,5-3 saat) muamele edilmesi bile normal glukozla inkübe edilen hücrelere kıyasla (5 mmol/L) MAPK ailesi üyelerinden ERK1/2, p38 MAPK ve c-Jun/N-terminal kinazı (JNK) aktive etmiş ve bu aktivasyon saatlerce devam etmiştir. Uzun süreli muamele (48 saat) p38 MAPK aktivitesinde artışa neden olmuştur. Ayrıca yüksek glukoz aktivatör protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerinin artışı ve DNA'ya bağlanma kapasitesinin artışına yol açmıştır (Natarajan ve ark., 1999). İntermitent yüksek glukoz uygulamasının VDKH'nde MMP-2 aktivitesi ve osteopontin miktarını yükselterek hücre proliferasyonunu artırdığı (Sun ve ark., 2009), insülin reseptör substrat-1 (IRS-1)'in VDKH farklılaşmasında önemli olduğu ve hipergliseminin IRS-1 down-regülasyonu yaparak p53/KLF4 ilişkisini azaltmak suretiyle VDKH'nin farklılaşmasını ve proliferasyonunu artırdığı bildirilmiştir (Xi ve ark., 2018). Endokrin pankreasta güçlü şekilde eksprese edilen ve salınan FAM3B proteini insülinle birlikte  $\beta$ -hücrelerinden salınır ve glukoz homeostazını düzenler. FAM3B'nin miR-322-5p inhibisyonu yaparak yüksek glukoz uyarımlı VDKH proliferasyonu ve migrasyonuna aracılık ettiği, FAM3B'nin knockdown edilmesi VDKH proliferasyon ve migrasyonunu azaltırken, overeksprese edilmesi bu olayları artırmıştır (Zhang ve ark., 2017).

Streptozotosin uyarımlı hiperglisemik sıçan arterlerinde proto-onkogen serin/treonin protein kinaz Pim-1 ekspresyonunun artmış olduğu, yüksek glukozun Pim-1 ekspresyonunu artırarak VDKH proliferasyonunu artırdığı rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2017). Normalde temel olarak vasküler endotelde eksprese edilen VDKH'nde az miktarda bulunan endotelin-B reseptörü (ET<sub>B</sub> reseptörleri) patolojik koşullarda primer olarak VDKH'nde lokalize olur. Bunun yanısıra optimal otofajik aktivitenin kardiyovasküler homeostaz ve fonksiyonunda önemli olduğu, hipergliseminin otofajiyi inhibe ederek VDKH'nde ET<sub>B</sub> reseptörlerini upregüle ettiği ifade edilmiştir (Chen ve ark., 2018). Yüksek glukozun tek başına VDKH'nde NF- $\kappa$ B aktivitesinde artışa neden olabildiği (Hattori ve ark., 2000), NF- $\kappa$ B aktivasyonunun VDKH'nin proliferasyon ve inflamasyonunun düzenlenmesinde anahtar oyunculardan biri olduğu, NF- $\kappa$ B

inhibisyonunun yüksek glukozun yol açtığı VDKH proliferasyonu ve bu hücrelerdeki plasminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ekspresyon artışını önlediği rapor edilmiştir (Jeong ve ark., 2011). VDKH, kan damarında sakin (quiescent) bir durumda bulunurlar ve pek çok iyon kanalları, reseptörler, sinyal molekülleri ve kontraktıl fonksiyonları için gerekli kontraktıl proteinler içerirler. VDKH kontraksiyonu için sitoplazmik  $Ca^{2+}$  seviyesinde bir artış gerektiği için, VDKH'ndeki  $Ca^{2+}$  düzeyleri vasküler ton ve periferal rezistansın belirlenmesinde büyük öneme sahiptirler. Sonuçta  $Ca^{2+}$  homeostazında görev alan anahtar oyuncularda meydana gelen hasar veya modifikasyonlar vasküler disfonksiyon ile ilişkilidir. Bu bağlamda uzamış hipergliseminin VDKH'nde  $Ca^{2+}$  sinyalizasyonunu bozduğu gösterilmiştir (El-Najjar ve ark., 2017). Hipergliseminin yol açtığı etkiler sadece proliferasyonu ve migrasyonu artırması ile sınırlı değildir, yapılan çalışmalar yüksek glukozun bu hücrelerde apoptozisi önlediğini de göstermiştir.

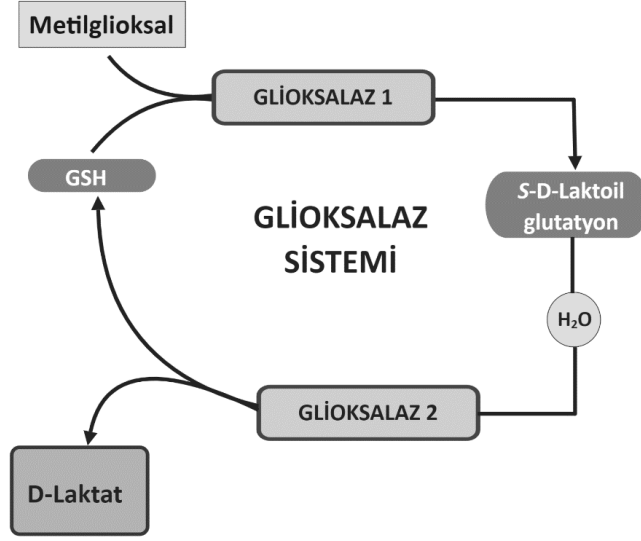
Diyabetik hastaların arterlerin elde edilen insan VDKH'nde pekçok apoptotik uyarana karşı bir direnç olduğu, bu kişilerdeki arterlerde yüksek düzeyde anti-proliferatif özellikteki Bcl-2 ekspresyonu saptanmış, nondiyabetik kökenli VDKH yüksek glukozu maruz bırakıldığında bu hücrelerde de Bcl-2 miktarının arttığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla yüksek glukozun sadece proliferasyonu artırmakla kalmayıp aynı zamanda apoptozisi de inhibe ediyor gözükmektedir (Ruiz ve ark., 2006). Nondiyabetik farelerde, ayrıca kültüre edilmiş sıçan ve insan VDKH'nde yapılan bir çalışmada yine yüksek glukozun apoptozisi azalttığı, ek olarak Fas ligandı (güçlü bir apoptozis tetikleyicisi) uyarımlı apoptozisi inhibe ettiği, bu etkinin PKC üzerinden gerçekleştiği saptanmıştır (Hall ve ark., 2000). Ayrıca yüksek glukozun serum yokluğu ile indüklenen VDKH apoptozisinde anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xl düzeyini artırarak, apoptoziste görev alan kaspaz-3 enziminin aktivitesini düşmesine yol açarak apoptozisi inhibe ettiği de gösterilmiştir (Li ve ark., 2005). İlâveten yüksek glukozun ROS ve PKC- $\delta$  aracılı olarak VDKH migrasyonunu artırdığı (An ve ark., 2008), telomeraz aktivitesini artırdığı (Sun ve ark., 2013), tip 2 diyabetik sıçanlardan elde edilen VDKH'nde kaveolin-1 ekspresyonunu azalttığı (Carrillo-Sepulveda ve Matsumoto, 2014), insan VDKH'nde bağ doku büyüme faktörünü (CTGF) artırdığı (Liu ve ark., 2007), interlökin-1 $\beta$  aracılı olarak VDKH'nin kondrositlere farklılaşmasını ve kalsifikasyona yol açtığı (Bessueille ve ark., 2015),  $Ca^{2+}$  sinyalinden ziyade mitokondriyal membran potansiyeli uyarımı-Miro (ROCK üst yolağı)- miyozin

hafif zincir (MLC) üzerinden vasküler kontraksiyonu artırdığı (Xu ve ark., 2017) yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Son olarak obez diyabetik farelerden elde edilen VDKH'nde intermitent yüksek glukozun sabit yüksek glukozdan daha fazla ERK1/2 ve MEK1/2 fosforilasyonu yaptığı dolayısıyla VDKH proliferasyonunu daha çok artırdığı bildirilmiştir (Sung Hoon ve ark., 2017).

#### **2.4. Glioksalaz Sistemi, Tarihçesi ve Bu Alandaki Araştırmalar**

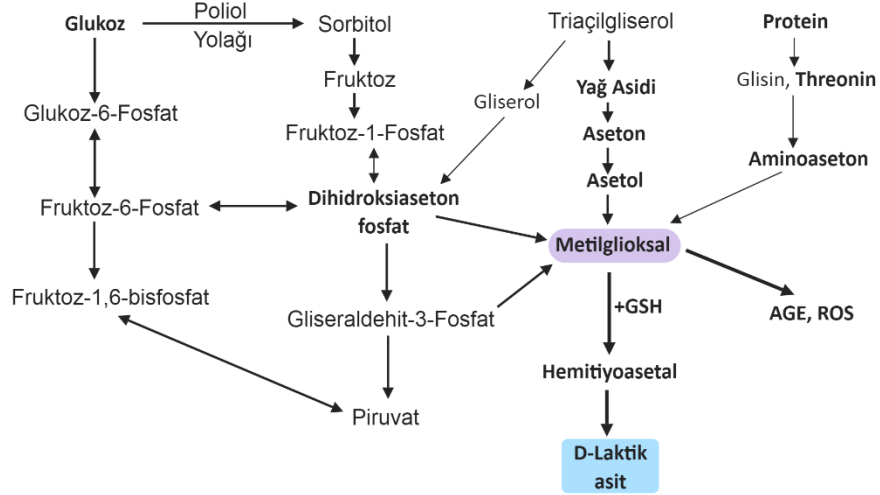
Glioksalaz sistemi 1913 yılında her üçü de biyokimyada önemli buluşlara imza atmış olan Carl Neuberg ile Henry Drysdale Dakin ve Harold Ward Dudley'in yayımlamış oldukları makalelerle ilk olarak ortaya konmuştur. Keşfedildiği yıllarda Neuberg glikoliz için MGO'nun zaruri olduğunu öne sürmüştü, 1932'de ise bunun doğru olmadığı gösterilmiştir. Yine bu yıllarda glutatyonun glioksalaz enzimi için kofaktör olduğu, S-laktoilglutatyonun ara ürün olduğu, 1940'larda canlı organizmalarda glioksalazın yaygın şekilde bulunduğu gösterilmiştir. 1950'lere gelindiğinde sistemin iki enzimi olan Glo1 ve Glo2 keşfedilirken, D-laktatın son ürün olduğu ortaya konmuştur. 1970'lere gelirken Glo1 inhibitörlerinin antikanser ilacı olabileceği öne sürülmüştü, 1990'ların başında hücre membranını geçebilen Glo1 inhibitörlerinin potent antitümör aktivitesi taşıdığı gösterilirken, MGO'nun glikolizin bir yan ürünü olduğu, yine yakın yıllarda insan Glo1 ve Glo2 enziminin yapısı ve katalitik mekanizmaları aydınlatılmıştır. 2000'lerin başından itibaren çoklu ilaç direnci (multi-drug resistance) gösteren tümörlerde Glo1'in rolü olduğu, glikasyona karşı enzimatik defansta Glo1'in rolü ve Glo1'in yaşam süresini etkilediği belirlenmiştir (Rabbani ve Thornalley, 2014). Glioksalaz araştırmalarında belli dönemlerde artış ve azalışlar olsa da özellikle son yıllarda yapılan araştırmalar oldukça yoğundur.

Glioksalaz sistemi hücrelerin sitozolünde bulunan bir sistemdir ve bileşenleri Glo1 enzimi (EC 4.4.1.5), Glo2 enzimi (EC 3.1.2.6), kofaktör olarak katalitik miktarda GSH ve Glo1 substratları olan  $\alpha$ -oksoaldehitleri içerir. Glioksalaz sistemi reaktif ve siklik yapıda olmayan  $\alpha$ -oksoaldehitleri bu yapıya karşılık gelen  $\alpha$ -hidroksi asitlere dönüştürür. Glo1  $\alpha$ -oksoaldehit ve GSH varlığında spontan bir şekilde oluşan hemitiyoasetalin izomerizasyonunu katalizleyerek S-2-hidroksiaçilglutatyon yapısını oluşturur. Glo2 ise S-2-hidroksiaçilglutatyon yapısını  $\alpha$ -hidroksi asitlere dönüştürürken Glo1'in katalizlediği basamakta tüketilen GSH'ı rejenere eder (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Metilglioksal detoksifikasyonu sağlayan glioksalaz sistemi.

Glo1'in major fizyolojik substratı MGO'dur ve Glo1 inhibitörü verildiğinde ya da GSH yokluğunda MGO düzeyi ciddi şekilde artar. MGO temel olarak glikolizin ara basamaklarında oluşan trioz fosfatların yıkımı ile ve çok daha az miktarda da keton cisimleri, treonin yıkımı ve glikasyona uğramış proteinlerin fragmentasyonu sonucu açığa çıkar. MGO oluşumuna yol açan biyokimyasal yollar Şekil 2.3.'de özetlenmiştir. Glo1'in diğer substratları ise glioksal (lipid peroksidasyonu ve glikasyona uğramış proteinlerin parçalanması ile oluşur), hidroksipirivaldehit ve 4,5-doksovalerattır. Glo1 aktivitesi bu reaktif  $\alpha$ -oksoaldehitlerin birikimini önleyerek glikasyon prosesini ve dikarbonil stresini önleyerek canlı organizmaları bu etkilerden korur (Thornalley, 2003). Aslında uzun yıllardır bildiğimiz antioksidan sistemler ve ROS hakkındaki bilgilerimize görünen o ki belki bir o kadar önemli olan dikarbonil stresi ve glioksalaz sistemini de eklememiz gerekecektir. MGO ve Glo1 üzerine son yıllardaki yoğun çalışmaları da belki bu kapsamda değerlendirmek gerekir.



Şekil 2.3. Metilgliksal oluşumunu sağlayan biyokimyasal yollar.

#### 2.4.1. Gliksalaz 1 ve Gliksalaz 2 Enzimleri

Glo1 enzimi GSH varlığında MGO'nun S-D-laktoilglutatyona dönüşümünü katalizler ve Glo1 aktivitesi doğrudan GSH miktarı ile ilişkilidir. Enzim neredeyse bütün canlıların sitozolünde mevcuttur, bazı organizmalarda GSH yerine başka tiyol grupları görev alabilir. İnsan Glo1 enzimi dimer yapıdadır ve molekül ağırlığı 42 (sekans)- 46 (jel filtrasyon) kDa'dur ve pI'sı 4,8-5,1'dir. Dimerin her bir alt ünitesi bir Zn<sup>+2</sup> içerir, translasyon ürünü olan 184 amino asitlik yapının N-terminal metiyonin birimi post-translasyonel modifikasyonla uzaklaştırılır ve N-terminal asetillenir. Sistein 19 ve 20 arasında bir disülfid köprüsü varken, sistein 139 ve sistein 61 arasında da bir disülfid köprüsü oluşabilir, sistein 139 GSH ile disülfid köprüsü oluşturursa *in vitro* olarak Glo1'i inhibe eder. Glo1 Ca<sup>2+</sup>/kalmodylin-bağımlı protein kinaz II'nin bir substratıdır ve 107. pozisyondaki treoninden fosforillenir. İnsan Glo1 yapısında her alt ünite de iki bölge vardır ve aktif merkez dimer arayüzünde konumlanmıştır. Katalitik mekanizma hemitiyoasetalin C-1 pozisyonundan C-2'ye baz katalizli proton transferi, enediol ara ürünü oluşturmak için aktif merkeze bağlanma ve hızlı bir şekilde ketonlaşarak tiyoester ürüne dönüşümü içerir.

İnsan *GLO1* geni genetik lokus 6p21.2'de yer alıyor olup, insan ve fare genomunda fonksiyonel kopya sayısı varyasyonları bakımından önemlidir. Yani insan ve farelerde bireyler arasında Glo1 ekspresyonu 2-4 kat artış gösterebilmektedir (Rabbani ve ark., 2014). *GLO1* gen delesyonunun fare ve insanlarda embriyonik olarak ölümcül olduğu bildirilmiştir (Arai ve ark., 2010). İnsan *GLO1* geni düzenleyici elementler olan MRE

(Metal-Response Element), IRE (Insulin-Response Element), E2F4 (Early gene 2 Factor isoform 4) ve AP-2 $\alpha$  (Activating enhancer-binding Protein 2 $\alpha$ )'yı içerir. *GLO1* geni hipoksizde HIF1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$ ) ve bunun dışında RAGE tarafından negatif olarak regüle edilir. Hipoksi dikarbonil stresini önemli derecede etkileyebilir zira hem anaerobik glikolizle MGO oluşumunu artırır hem de Glo1 ekspresyonunu azaltabilir (Zhang ve ark., 2012; Rabbani ve ark., 2014). Ayrıca fonksiyonel bir antioksidan-response element (ARE) içerir ki bu durum Glo1 ekspresyonunun Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) tarafından regüle edildiğini gösterir. Nrf2 aktivatörü olup Glo1'i indükleyen ajanlar sülfurafan, allil izotiyosiyanat ve resveratrol iken bardoksolon metil sadece zayıf bir Glo1 uyarıcısıdır. Dolayısıyla Nrf2 aktivatörlerinin tamamı Glo1'i uyarılmamaktadır (Cheng ve ark., 2012; Xue ve ark., 2012). Ayrıca Glo1 ekspresyonunun RAGE aktivasyonu ile azalabileceği ifade edilmiştir (Reiniger ve ark., 2010; Zeng ve ark., 2012).

Glo1'in model organizma *C. elegans*'da yapılan çalışmada overeksprese edilmesi ortalama yaşam süresini %29, maksimum ömrü %32 artırmış, susturulması ise ortalama yaşam süresini %52, maksimum yaşam süresini ise %36 azaltmıştır (Xue ve ark., 2011). Obez farelerde yapılan bir çalışmada karaciğerde Glo1 proteini 3 kat azalmış bulunmuştur (Rabbani ve Thornalley, 2011). Yüksek glukoz ile muamele edilen hücrelerde artmış MGO düzeyi saptanması, ayrıca diyabetik hastalardaki artmış MGO düzeyleri tespit edilmesi MGO'nun özellikle hipergliseminin yol açtığı mikrovasküler komplikasyonlardan (nefropati, retinopati ve nöropati yol açtığı) sorumlu bir molekül olarak görülmüştür (Thornalley, 1988; McLellan ve ark., 1994). Yüksek glukozun uyarımı ile endotel hücreleri, endoteliyal progenitör hücreler, renal mezengial hücreler, tübüler epitel hücreler, retinal perisitler ve kemik iliği hücrelerinde meydana gelen disfonksiyon Glo1'in overeksprese edildiği çalışmalar ile doğrulanmıştır. Glo1'in baskılandığı (knockdown) çalışmalarda ise hipergliseminin yol açtığı disfonksiyon artmıştır (Rabbani ve ark., 2014). Farelerde Glo1'in streptozotosin uyarımlı diyabeti önlediği de gösterilmiştir (Kim ve ark., 2013). Bu çalışmalar Glo1 ekspresyonunun diyabet ve komplikasyonlarının gelişiminde koruyucu rolünü ortaya koymaktadır. Ayrıca Glo1 yoksun farelerde diyabetik nefropatiye benzer bir nefropati tablosu ortaya çıktığı bildirilmiştir (Giacco ve ark., 2014). Pekçok kanserde Glo1'in normalin üstünde sentezlendiğini, çoklu ilaç tedavisine rezistan kanserlerde olduğu gibi, anti-kanser tedavide hücre



membranlarından geçebilen Glo1 inhibitörlerine ihtiyaç olduğu ve bu alanda önemli bir farkındalık yaratabileceği düşünülmektedir. *S-p*-bromobenzilglutasyon diester (BBGD) hücre membranından geçebilen *in vitro* ve *in vivo* anti-tümör aktivitesine sahip ilk sentezlenen Glo1 inhibitörüdür (Thornalley ve Rabbani, 2011).

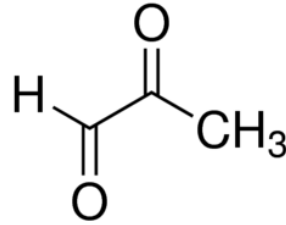
Glo2 enzimi *S-D*-laktoilglutasyonun *D*-laktat ve GSH'a dönüşümünü, Glo1'in katalizlediği glioksalaz sisteminin ilk basamağında tüketilen GSH'ın yeniden üretilmesini katalizler. İnsan Glo2 enzimi Fe(II)Zn(II) merkezi içerir. Maya ve yüksek bitkilerde iki farklı gen sitozolik ve mitokondriyal olmak üzere iki farklı Glo2 enzimini kodlarken memelilerde tek bir gen hem sitozolik hem de mitokondriyal Glo2 kodlayan iki farklı mRNA üretir. İnsan sitozolik Glo2 enzimi 29 kDa iken mitokondriyal form 34 kDa'dur. Mitokondride Glo1'in bir substratı bulunmadığı için mitokondriyal Glo2'nin rolünün ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Glo2 yoksun hücreler MGO uyarımlı apoptozis ve DNA hasarına karşı aşırı hassasiyet gösterirler, buna sebep olarak ise enzim yokluğunda *S-D*-laktoilglutasyon birikmesi, biriken substrattan sisteine laktoil transferi sonucu *S-D*-laktoilsistein oluşumu ve bu yapının da *N-D*-laktoilsisteine dönüşmesi gösterilmiştir. Zira oluşan bu yapı dihidroorataz inhibitörü olup *de novo* pirimidin sentezini inhibe ederek toksisiteye ve DNA hasarı toksisitesine aracılık eder (Xue ve ark., 2011; Rabbani ve ark., 2014).

#### **2.4.2. Dikarbonil Stresi ve Metilglioksalın Vasküler Etkileri**

Dikarbonil stresi,  $\alpha$ -oksoaldehit metabolitlerinin anormal birikimi sonucu protein ve DNA'nın artmış modifikasyonu ile karakterize olan, yaşlılık ve hastalıkta hücre ve doku disfonksiyonuna katkı sağlayan bir durum olarak tanımlanır. Bunlar içerisinde en önemlisi MGO olup diğerleri glioksal ve 3-deoksiglukozon (3-DG)'dur. Örnek olarak ise yaşlı bitkilerde artmış MGO, yaşlı insan lenslerinde artmış MGO-protein modifikasyonu, diyabette artmış plazma ve doku MGO düzeyleri ve renal yetmezlikte artmış MGO, glioksal ve 3-DG düzeyleri verilebilir.

Dikarbonil stresinin nedeni dikarbonil metabolitlerinin yapımı ve metabolizması arasındaki dengesizlik sonucu ve ek olarak ekzojen dikarbonillere maruziyettir. Glioksal, MGO ve 3-DG düzeyleri tipik olarak insan plazmasında 50-150 nM, bitki ve memeli hücrelerinde 1-4  $\mu$ M'dır. Dikarbonil düzeyleri bu sınırların ötesine geçtiğinde protein ve hücre disfonksiyonu için potansiyel bir tehdit haline gelerek hastalıklara zemin hazırlar (Rabbani ve Thornalley, 2015). Aslında MGO glikoliz

metabolizmasından bir kaçak, sızıntı olarak adlandırabileceğimiz şekilde ve düzeyde, glikoliz ara ürünlerinden olan trioz fosfatlar gliseraldehit-3-fosfat (GA3P) ve dihidroksiasetonfosfat (DHAP)'dan %0,05-%0,1 düzeyinde oluşur. Glukoz metabolizmasının artması, GA3P dehidrojenaz inhibisyonu, redüktif pentoz fosfat yoluyla GA3P'nin uzaklaştırılmasının sekteye uğraması ve trioz fosfatların ara ürün olduğu glukoneogenez ve gliseroneogenez metabolik yollarından kaynaklı sebeplerle bu miktar artabilir (Şekil 2.3). Glioksal ve MGO ana olarak Glo1 tarafından, çok daha az olarak da aldoketo redüktazlar ve aldehit dehidrojenazlar tarafından metabolize edilir (MGO hem aldehit hem de keton grubu içerir, Şekil 2.4). Glo1, aldoketo redüktazlar ve aldehit dehidrojenazlar transkripsiyon faktörü Nrf'nin antioksidan response element üzerinden kontrol edilebilirler.



**Şekil 2.4.** Metilglioksalın moleküler yapısı. MGO yapısında hem aldehit hem de keton grupları yer alır.

Dikarbonil stresi dikarbonillerin protein, nükleotit ve temel fosfolipidlerle reaksiyon hızının artmasına yol açar, bu durum dikarbonil glikasyonu olarak bilinir ve ürün olarak AGE açığa çıkar. Proteinlerle reaksiyon, arjinin birimlerini hedef alarak dihidroimidazolun ve hidroimidazolun oluşumuna yol açar. Bunlar arasında MGO'dan türeyen Metilglioksal kökenli Hidroimidazolun-1 (MG-H1) fizyolojik sistemlerde fonksiyonel olarak önemli ve miktarı en yüksek olan hidroimidazolondur (Rabbani ve Thornalley, 2015). Dikarbonil glikasyonu protein yapılarında özellikle iç kısımlarda meydana gelir çünkü arjininin lokasyon ihtimali en yüksek olan yer, proteinlerin fonksiyonel bölgeleridir. Dikarbonil modifikasyonu, yan zincir guanidino grubunun yükünü kaybetmesine yol açar ve fonksiyonel olarak önemli pozisyonlardaki reaktif arjinin birimleri glikasyona en hassas olanlardır. Proteinlerin dikarboniller tarafından glikasyonu % 1-5 gibi düşük düzeylerde fakat yaşlanma ve hastalık durumunda bu değer yükselebilmektedir. Dikarbonil stresi ile glioksal ve MGO tarafından modifikasyona uğrayan proteinler yanlış katlanmış bir hale gelirler (mis-folded) ve proteoliz için proteozomlara yönlendirilirler. Hüresel ve ekstraselüler matriks (ESM) proteinlerinin dikarbonil glikasyonu mitokondriyal protein disfonksiyonu ve artmış

ROS, inflamatuvar protein ekspresyonu (RAGE, S100 proteinleri ve HMGB1), mitokondriyal yolakla aktive olmuş apoptozis, ESM'den hücrelerin ayrılması ve anoikis ile sonuçlanır (Dobler ve ark., 2006; Chan ve ark., 2007; Morcos ve ark., 2008; Yao ve Brownlee, 2009; Rabbani ve Thornalley, 2015). Dikarbonil modifikasyonuna yatkın proteinler olarak ifade edilen dikarbonil proteomu, üzerinde çalışılan konulardan birisidir ve insan endotel hücresi sitozolik ekstraktlarında yapılan bir pilot çalışmada 1366 proteinin 344 tanesi kontrol seviyelerine göre 10 kat artmış MG-H1 seviyesine, kontrol örneklerinde de 1027 proteinin 12 tanesinde artmış MG-H1 seviyesine rastlanmıştır (Rabbani ve Thornalley, 2014). Glioksal ve MGO'nun DNA yapısında modifikasyona yol açması ise nükleotit ileri glikasyon son ürünlerinin (nükleotit AGEs) oluşumuna yol açar ki en önemlileri imidazopurinonlar GdG (3-(2'-deoksiribozil)-6,7-dihidro-6,7-dihidroksiimidazo[2,3-b]pürin-9(8)one) ve MGdG (3-(2'-deoksiribozil)-6,7-dihidro-6,7-dihidroksi-6/7-metilimidazo-[2,3-b]pürin-9(8)one) yapılarıdır. Bu yapılar DNA zincir kırılması (strand breaks) ve mutagenезle ilişkilidirler (Thornalley ve ark., 2010).

Metilglioksal hücre membranını pasif difüzyonla unhidrate formda geçer. MGO dehidratasyonu burada hız kısıtlayıcıdır ve yaklaşık 4 dk'lık bir yarılanma zamanına sahiptir (Rabbani ve Thornalley, 2014). Glioksalaz sistemi tarafından MGO'nun D-laktata dönüşümü yaklaşık 10 dk sürerken, MGO'nun plazmada proteinlere geri dönüşümsüz bağlanması yaklaşık 3,6 saat alır. Bu durum hücrede oluşan MGO'nun bir kısmının dışarıya sızdığı, interstisyel sıvıya ve oradan da plazmaya geçtiği ve sonrasında yeniden interstisyel sıvıya ve diğer dokuların hücrelerine geçtiğini vurgulamaktadır. Ayrıca ekstraselüler kompartımanda glikasyona uğramış proteinlerin yıkımından oluşan MGO, Glo1 tarafından metabolize edilmek üzere hücrelere girebilir. Bu sebeple dikarbonil stresinin olduğu yer ve MGO birikimine bağlı ilişkili patogenez, Glo1 ekspresyon ve aktivitesinin lokal olarak azalmasına karşı hassas olabileceği belirtilmektedir (Rabbani ve Thornalley, 2015). Dikarbonil stresin oksidatif stresle ilişkisi incelendiğinde dikarbonil stresi oksidatif stresin hem sebebi hem sonucu olabilmektedir. *C. elegans*'ta Glo1 overekspresyonu MG-H1 miktarını azaltarak ROS oluşumunu azaltmış (Morcos ve ark., 2008), benzer şekilde yüksek glukozaya maruz bırakılan insan aorta endotel hücrelerinde Glo1 overekspresyonu ROS oluşumunu azaltmıştır (Yao ve Brownlee, 2009). Oksidatif stres trioz fosfatların birikimine de yol açabilir ki bu durum MGO'nun non-oksidatif yükselmesine yol

açabilir (Hyslop ve ark., 1988). Hücresel GSH miktarındaki azalma Glo1 aktivitesini dolayısıyla MGO'nun metabolizmasını azaltırken, hücresel NADPH'ın azalması aldoketo redüktazların aktivitesini azaltarak 3-DG metabolizmasını azaltır (Abordo ve ark., 1999; Rabbani ve Thornalley, 2015). Fizyolojik sistemlerde ROS reaktivitesinin substratları ile arasındaki difüzyon mesafesine bağlı olduğu (50 µm-1,5 mm), MGO'nun difüzyon mesafesinin yaklaşık 20-30 mm olduğu düşünüldüğünde MGO'nun ROS'a kıyasla daha uzun etki mesafesi ve yarı ömre sahip olduğu dolayısıyla proteinlerin sensitif bölgelerine etki ederek protein inaktivasyon ve disfonksiyonuna daha fazla katkı yaptığı düşünülmektedir (Winterbourn, 2008; Rabbani ve Thornalley, 2015).

## **2.5. Renin-Anjiyotensin Sistemi ve Glioksalaz Sistemiyle İlişkili Sinyal Yolakları**

Renin-anjiyotensin sistemi ile glioksalaz sistemi ilişkisi kapsamındaki çalışmalara bakıldığında bu çalışmalarda hipergliseminin RAS aktivasyonu yapması, daha özede ise MGO'nun RAS ve bileşenleri üzerine etkisinin incelendiğini görmekteyiz. RAS veya bileşenlerinin glioksalaz sistemi üzerine etkisi hakkında ise daha az çalışma olduğunu görmekteyiz. RAS aktivasyonu ve ileri glikasyon son ürünleri artışının diyabetik retinopatiye önemli katkılar sunduğu bilindiğinden yapılan çalışmalar diyabetik retinopatiyle ilişkilidir (Moravski ve ark., 2003; Miller ve ark., 2013). Kısaca değinmek gerekirse kan basıncını sıkı şekilde kontrol altında tutmanın diyabetik retinopatiyi geciktirdiği, retinada lokal bir RAS'ın mevcudiyeti, Ang II'nin diyabetik retinopatiye katkısı yapılan çalışmalarda gösterilmiş, bunun ötesinde Ang II reseptör blokörleri (ARB'ler) veya anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACE inhibitörleri) ile antihipertansif tedavinin bu ilaçların antihipertansif etkisinden bağımsız olarak diyabetik retinopatide etkili olduğu ve RAS blokajının retinoprotektif olduğu gösterilmiştir (Dosso ve ark., 2004; Tan ve ark., 2007; Choudhary ve ark., 2016; Kanda ve Ishida, 2019). Bilindiği üzere farklı türlerde ilaç sınıfları antihipertansif olarak kullanılmaktadırlar ki bunlar arasında ARB'ler, ACE inhibitörleri, β-blokörler ve kalsiyum kanal blokörleri vardır. Farklı gruplardaki bu ilaçlar kan basıncında hipotansif bir etki yapmasına karşın temel etki mekanizmaları birbirinden farklıdır. Aynı grupta yer alan üyelerin de hipotansif etki dışında birbirinden farklı, örneğin ARB'ler içerisinde telmisartanın PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptor-γ;) aktivitesini uyarması gibi beklenmedik etkileri olabilmektedir (van Zwieten, 2006; Munger, 2011).

Gliksalaz sistemi-RAS ilişkisi kapsamında yapılan çalışmalardan önemli sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalardan birinde fruktozla beslenen (MGO, fruktoz metabolizmasının hızlandığı durumda da yükselmektedir) Sprague Dawley sıçanlarda anlamlı düzeyde kan basıncı ve RAS sistemi bileşenlerinin artışı gözlenmiştir. Fruktozla beslenen sıçanlarda aortada ve/veya böbrekte MGO seviyesi, Ang II, AT1R, adrenerjik  $\alpha_{1D}$  reseptör ve renin düzeyi artarken GSH düzeyleri düşmüştür. Aortada ERK1/2 fosforilasyonu, RAGE ve NF- $\kappa$ B seviyelerinin arttığı saptanmıştır. Ayrıca MGO ile muamele edilen VDKH'nde protein seviyesinde Ang II, AT1R ve adrenerjik  $\alpha_{1D}$  reseptör artışı bildirilmiştir (Dhar ve ark., 2013). Aynı araştırma grubu bu çalışmanın devamında erkek Sprague Dawley sıçanlara mini pompa yardımıyla 4 hafta devamlı (continuous) MGO uygulamış ve sonuç olarak kan basıncı yanı sıra plazmada aldosteron, renin, anjiyotensin ve katekolaminlerin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca aorta ve/veya böbrekte MGO düzeyi, anjiyotensin, AT1R, adrenerjik  $\alpha_{1D}$  reseptör ve reninin mRNA ve protein düzeyinde arttığı da belirtilmiştir. Kültüre edilmiş primer olmayan VDKH'nin yüksek glukoz (25 mM) veya MGO ile muamelesinde hücresele MGO düzeyi yanında NF- $\kappa$ B, anjiyotensin, AT1R ve  $\alpha_{1D}$  reseptör düzeyinin mRNA ve protein düzeyinde arttığı, bu etkinin NF- $\kappa$ B inhibisyonu veya MGO süpürücü (scavenger) alagebrium ile ortadan kalktığı bildirilmiştir. Ayrıca RAGE mRNA'sının susturulması MGO uyarımlı NF- $\kappa$ B artışını önlemiştir (Dhar ve ark., 2014).

RAS'ın gliksalaz sistemi üzerine etkisini inceleyen çalışmalara baktığımızda (Ang II'nin AGE oluşumuna sebep olduğu ve reseptör antagonistlerinin AGE oluşumunu engellediği bilindiği için) genel olarak Ang II ve ARB'lerin gliksalaz sistemine olan etkisinin incelendiğini görmekteyiz. Bunlardan biri olan randomize kontrollü bir çalışmada ARB'lerden biri olan uzun süre irbesartan kullanımının (1-2 yıl) tip 2 diyabetli hipertansif hastalarda AGE'lerden olan N<sup>ε</sup> (1-karboksimetil)lizin (CML) ve N<sup>ε</sup> (1-karboksietil)lizin (CEL) üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Schalkwijk ve ark., 2011). Bu çalışmanın yayımlanmasının kısa bir süre sonra yine hipertansif diyabetik hastalarda yapılmış bir başka randomize kontrollü çalışmada irbesartanın 2 aylık süreçte AGE üzerine etkisi incelenmiştir. İrbesartan tedavisinin sırasıyla MGO ve gliksaldan kaynaklanan MG-H1 (metilgliksal hidroimidazolon-1) ve G-H1'in (gliksal hidroimidazolon) üriner ekskresyonunu %30-32 azalttığı, plazmada ise glikasyon ürünü N<sup>ε</sup>-fruktozil-lizin, AGE'lerden olan CML ve CEL'i ve pentozidini artırdığı, ayrıca oksidasyon belirteci olan N-formilkinürenin ve ditirozini

de artırdığı bildirilmiştir. Araştırmacılar irbesartan tedavisi sonucunda MG-H1 ve G-H1'in üriner ekskresyonunun azalmasının nedeninin AGE'ye daha az maruz kalmaları ve irbesartan tedavisinin Ang II'nin yol açtığı gliksalaz 1'in baskılanmasını önlediği için olmuş olabileceğini belirtmişlerdir (Rabbani ve ark., 2012). Bildiğimiz kadarıyla Ang II ve gliksalaz ilişkisini doğrudan inceleyen tek bir yayın mevcuttur.

Kültüre edilmiş sığır (bovine) retinal endotelial hücrelerinde (BREC: bovine retinal endothelial cells) ve retinal perisitlerinde (BRP: bovine retinal pericytes) yapılmış bu çalışmada hücreler 100 nM Ang II veya candesartan (1 µmol/L) + Ang II ile muamele edilmiş ve bu hücrelerde Ang II apoptozisi indüklemiş ve Glo1 mRNA ve aktivitesini düşürmüştür, nitrik oksit (NO) miktarını artırmıştır ki NO'nun BRP hücrelerinde Glo1'in negatif regülatörü olduğu da belirtilmiştir. Candesartan ise Ang II'nin bu etkilerini düzeltmiş ve NO miktarını düşürmüştür. Ayrıca bu çalışmada *in vivo* olarak artmış RAS aktivasyonu sergileyen diyabetik Ren-2 sıçanlarda 20 hafta boyunca aynı etki incelenmiş ve sonuçlar diyabetik Sprague Dawley sıçanlarla mukayese edilmiştir. *In vitro* sonuçlara benzer çıktılar elde edilmiş, diyabetik Ren-2 sıçanlarda retinal Glo1'in azaldığı gözlenmiş, diyabetik Sprague Dawley sıçanlarda ise bu etki gözlenmemiştir. Candesartan, diyabetik Ren-2 sıçanlarda NO seviyelerini düşürmüştür ve Glo1'deki düşüşü önlemiştir (Miller ve ark., 2010).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Birim ve Kullanılan Gereçler

Deneyde kullanılan 250-350 g ağırlığındaki erkek Wistar sıçanlar Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı ile sağlandı (23.05.2016 tarihli, 38 no'lu karar). Sıçanlardan damar disseksiyonu Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nde, primer hücre kültürü izolasyonu ve diğer bütün işlemler Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Steril malzemeler Akdeniz Üniversitesi Sterilizasyon Ünitesi'nde sterilize edildi.

#### Kullanılan Kimyasal, Sarf ve Demirbaş Maddeler

Düşük ve yüksek glukozlu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) hücre medyumları, Ang II, MGO, CaCl<sub>2</sub>, HEPES, elastaz, kollejenaz, soya tripsin inhibitörü, sığır serum albumini (BSA), fetal bovin serumu (FBS), L-glutamin, penisilin-streptomisin antibiyotiği (PSA), amfoterisin B, tripsin-EDTA, leupeptin, pepstatin A, aprotinin, proteaz inhibitör kokteyl (PİK), Tris Sigma-Aldrich'den (MO, USA); HBSS Lonza'dan (Basel, İsviçre); SDS Amresco'dan (GA, A.B.D.) satın alındı. Hücre kültür petripleri, flasklar ve 15 mL'lik plastik tüpler ile benzeri sarf malzemeleri R&D Falcon (MN, A.B.D.) ve Greiner'den (Kremsmünster, Avusturya) temin edildi. Telmisartan ve irbesartan Sigma-Aldrich'den (kat. no. sırasıyla: T8949 ve I2286, MO, USA), JSH-23 Cayman Chemical'dan (kat. no:15036, MI, A.B.D.) alındı. Fosfat tamponu tuzu (PBS) Biomatik Corp.'dan (DE, A.B.D.), PD98059 (kat. no.:t1rl-pd98) ve SB203580 (kat. no.: t1rl-sb20) Invivogen'den (CA, A.B.D.) temin edildi. Fosfo-NF-κB p65 (Ser536) kiti Cell Signaling Technology'den (kat. no: 7173C, MA, A.B.D.), MGO ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kiti Cell Biolabs'dan (kat. no: STA-811, CA, USA), glioksalaz 1 (Glo1) ELISA kiti LifeSpan BioSciences'dan (kat. no: LS-F13293, WA, USA), Glo1 aktivite kiti Sigma-Aldrich'den (kat. no: MAK114, MO, USA), NF-κB p65 kiti ve Nrf2 ELISA kiti Elabscience'dan (kat. no. sırasıyla: E-EL-R0674 ve E-EL-R1052, Hubei, China) ve florimetrik glutatyon ölçüm kiti BioVision'dan (kat. no. K264-100, CA, A.B.D.) satın alındı. Protein ölçümü için kullanılan kit Thermo Fisher'dan (kat. no: 23225, MA, A.B.D.) satın alındı.

Tez çalışması esnasında kullanılan cihazlar ise şunlardır: Buzdolabı: Beko 9610NM, Vestel NT 465 HG (4 ve -20 °C); Soğutucu: Bosch (-20 °C); Dondurucu: Hettich HS

2486 (-80 °C); Sıcak su banyosu: Raypa (20-80 °C); Santrifüj: Beckman&Coulter Microfuge 22R (soğutmalı); Santrifüj: Nüve NF400; İnkübatör: Heraeus HeraCell 150 (Karbon dioksit, 37 °C); Kültür kabini: Esco Class II BSC; Mikroskop: Olympus CKX41 (Inverted); Sonikatör: Bendelin UW2070; Karıştırıcı: LabLine Thermal Rocker (Kapaklı, 37 °C); Biometra WT17; Heidolph MR Hei-Standard Q-02 (Manyetik); Thermoblock: Biometra TB1; Hassas terazi: Presica XB220A; Kaba terazi: Kern 440-43N; pH metre: Hanna pH211; Spektrofotometrik plate okuyucu: BioTek µQuant; florimetrik plate okuyucu: Biotek SynergyMx.

### **3.2. Tezde Kullanılan Deney Modeli**

Hücrelerin elde edilmesi amacıyla 250-350 gram ağırlıktaki erkek ve Wistar cinsindeki sıçanlardan torasik aorta alınmıştır. Aortadan izole edilen primer vasküler düz kas hücreleri deneylerde kullanılmış olup işlemler steril hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### **Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu**

İzolasyon işlemi Ives ve ark. tarafından 1978'de tavşan aortasında uygulanan metodun değiştirilmiş haline dayanmaktadır. Modifiye yöntem Gunter ve ark. tarafından sıçan mezenterik arterinde başarıyla uygulanmıştır (Ives ve ark., 1978; Gunther ve ark., 1982). Bütün işlem aseptik koşullar altında gerçekleştirildi. İzolasyondan bir gün önce gerekli olan bütün çözeltiler taze olarak hazırlandı, mikro cerrahi set ve diğer gerekli malzemenin sterilliği sağlandı. Sıçanlar tartılıp ağırlıkları not edildikten sonra eter anestezisi altında torasik aortaları alındı. Alınan torasik aortalar derhal buz soğukluğundaki transfer medyumu içerisine aktarıldı. Damar iç çeperi birkaç kez transfer medyumu ve enjektör yardımı ile yıkanarak kandan arındırıldı ve daha sonra parafin blok üzerine ince uçlu enjektör iğnesi yardımıyla sabitlendi. İşlem buz üzerinde ve buz soğukluğundaki transfer medyumu içerisinde disseksiyon mikroskobu altında gerçekleştirildi. Blok üzerindeki damar ince doku makası ve pens yardımıyla boylamsal olarak kesildi ve dikdörtgen bir plaka gibi dört ucundan parafin bloğa tutturuldu. Damarın dış kısmındaki yağ ve kılcal damar yapıları temizlendikten sonra adventisya tabakası bisturi ile kazındı. Daha sonra damar tabakası döndürülerek endotel tabakası üste getirildi ve steril bir kulak çöpü ile hassas bir şekilde kazınarak endotel tabakası da uzaklaştırıldı. Daha sonra kalan yapı transfer medyumu ile birkaç



kez yıkandıktan sonra buz içerisinde, buz soğukluğunda transfer medyumu içerisinde hücre kültürü odasına taşındı.

### **Primer Vasküler Düz Kas Hücrelerinin Kültüre Edilmesi**

Hücre kültürü ortamına taşınan ve damarın media tabakasını içeren aorta parçası öncelikle transfer medyumundan uzaklaştırıldı. Daha sonra küçük bir petri içine alınarak iki adet bistürü ile küçük parçalara ayrılarak dokunun yüzey alanı olabildiğince artırıldı. Sonrasında önceden hazırlanan ve 37 °C'deki enzimatik ayrışma çözeltisi (EAÇ) ile inkübe edildi. Böylelikle yüzey alanı artırılmış media tabakası EAÇ ile daha fazla temas ederek hücre izolasyon oranının artırılması amaçlandı. Petrinin etrafı parafilm ile sarılarak 37 °C'deki çalkalayıcıda 45 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda petrideki damar parçaları ve EAÇ çelik kanülden (14G) geçirilerek mekanik ayrışmaya maruz bırakıldı. Sonraki basamakta ortamdaki enzim konsantrasyonunu düşürmek için EAÇ miktarının iki katı kadar hücre medyumu eklendi ve steril plastik tüp içerisinde 1400 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant hücre medyumu ile dilüe edilerek 12,5 cm<sup>2</sup>'lik flaska ekildi. Pellet ise hücre medyumuyla resüspanse edildi ve aynı şekilde 12,5 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekildi. Hücrelerin inkübasyonu 37 °C'deki %5 CO<sub>2</sub> - %95 hava içeren etüvde (inkübatörde) gerçekleştirildi. Ekimden sonraki ilk 24 saat flasklara dokunulmazken sonraki günlerde rutin olarak incelenen flasklarda kontaminasyon ve tutunan ya da mikroskop altında gözlemlenebilen hücre olup olmadığı invert mikroskop altında incelendi. Hücrelerin mikroskop altında gözlemlendiği ilk gün flask birkaç kez medyum ile yıkandı ve taze medyum eklenerek etüve bırakıldı. Flask yüzeyi tamamen hücre ile dolduğunda (yani konflüe olduğunda) pasajlama işlemi yapıldı ve hücreler önce 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara daha sonrasında ise 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara pasajlandı. Ele geçen hücrelerin bir kısmı flaska ekilerek kuşak devamı sağlanırken diğer kısmı ise uygun büyüklükteki petrilere ekildi ve deneye alındı.

### **Hücrelerin Pasajlanması**

Hücre pasajlama işlemi (tripsinizasyon) yapılırken öncelikli olarak hücre medyumu tamamen uzaklaştırıldı. Sonra 37 °C'deki Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> içermeyen HBSS solüsyonu ile bir kez yıkandıktan sonra tripsin-EDTA ile muamele edildi. Bir müddet etüvde bekletildikten sonra yüzeye yapışan hücreleri kaldırmak için flaska sağdan soldan ve üstten hafifçe vurarak mekanik olarak da hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden

ayrılmaları sağlandı. Ortamdaki tripsin konsantrasyonunu düşürmek amacıyla DMEM eklendi. Mikroskop altında kontrol edilerek ayrılmaları gözlemlendikten sonra plastik tüpe alınarak 1400 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant dekante edildikten sonra pellet hücre medyumuyla resüspanse edildi ve yeni flakslara ya da petrilere aktararak pasajlandı.

### **Kullanılan Çözeltiler**

- a) Transfer medyumunu:  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  içermeyen HBSS solüsyonu 200  $\mu$ M (0,2 mM)  $Ca^{2+}$  ve %2 PSA (v/v) içerecek şekilde hazırlandı.
- b) EAÇ:  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  içermeyen steril HBSS solüsyonu 15 mM HEPES, 2 mg/mL BSA, 200  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ , 250  $\mu$ g/mL soya tripsin inhibitörü, 62,5  $\mu$ g/mL elastaz ve 500  $\mu$ g/mL kollejenaz tip I-A konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlandı. Steril filtreden geçirmek suretiyle steril hale getirildi. İzolasyon işleminden bir gün önce hazırlandığı için ertesi güne kadar 4 °C'de muhafaza edildi.
- c) Hücre medyumunu: Ticari olarak satın alınan steril DMEM kullanıldı. Medyuma HEPES (25 mM), FBS (%10 v/v) ve PSA (%1 v/v) eklendi. HEPES öncelikle bir miktar DMEM ile çözülüp daha sonra steril hale getirildi. L-glutamin içermeyen DMEM'e ek olarak 4 mM L-glutamin HEPES'le aynı işleme tabi tutularak medyuma ilave edildi.
- d) HBSS:  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  içermeyen ve ticari olarak satılan steril HBSS solüsyonu kullanıldı.
- e) Tripsin-EDTA solüsyonu: Ticari olarak satılan %0,05 (w/v) Tripsin ve %0,02 (w/v) EDTA içeren steril solüsyon kullanıldı.
- f) PSA: Ticari olarak satılan 100 mL'de 10.000 U penisilin ve 10 mg streptomisin içeren antibiyotik çözelti kullanıldı.

### **Hücrelerin Deneye Alınması ve Lizat Hazırlama İşlemi**

Çalışmamızda 3-7 kuşak sayısındaki hücreler kullanıldı. Tripsinize edilen hücreler yapacağımız deneye uygun büyüklükteki petrilere ekildikten sonra rutin besleme, kontrol ve medyum değiştirme işlemleri yapıldı. %80 dolulukta olan petrilere serum içermeyen medyumuyla bir kez yıkandıktan sonra yine serum içermeyen medyumuyla 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra mevcut medyum taze ve yine serum içermeyen medyumuyla değiştirildikten sonra hücrelere gerekli uygulamalar yapıldı. Gerekli inkübasyonlardan sonra hücre medyumunu hızlı bir şekilde uzaklaştırıldı, buz

soğukluğunda 1X PBS ile hızlıca iki kez yıkanan hücreler, hemen buz üzerine alınarak soğuk lizis tamponu eklendi. Sonrasında hücreler tutundukları yüzeyden kazınarak ependorf tüplere toplandı. Buz içerisinde muhafaza edilen hücre lizatları soğuk zincir içerisinde tutuldu ve yine buz içerisinde olacak şekilde sonikasyona uğratıldı. Son olarak 4 °C’de santrifüj edilerek süpernatantlar dikkatli bir şekilde yeni ependorf tüplere aktarılarak hücre debrisisi uzaklaştırılmış oldu. Protein ölçümü yapılarak lizatlardaki konsantrasyon belirlendi.

### **Kullanılan Çözeltiler, Uyarılar ve İnhibitörler**

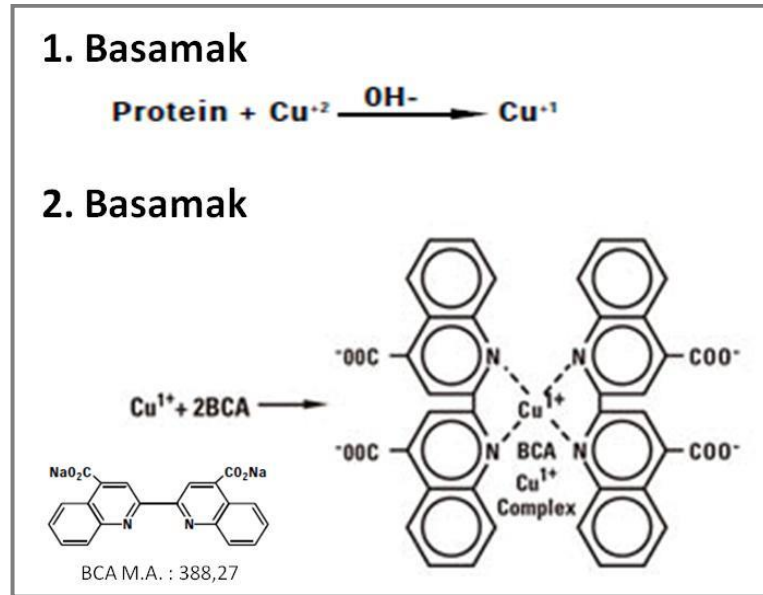
- a) PBS çözeltisi: Ticari olarak kullanıma hazır suda çözünür tablet formdaki fosfat tamponu kullanıldı. Bu amaçla her 100 mL fosfat tamponu için bir tablet distile suda çözüldü. Hazırlanan çözelti herhangi bir pH ayarlamasına ihtiyaç duymadı.
- b) Lizis tamponu: Distile su ile hazırlanan çözelti 0,1 M sodyum florür (NaF), 0,05 M HEPES, 0,15 M sodyum klorür (NaCl), 1 mM magnezyum klorür (MgCl<sub>2</sub>), 1 mM EGTA, 1mM PMSF, 1 mM sodyum vanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 10 mM sodyum pirofosfat (Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), 10 mg/L leupeptin ve aprotinin, 1 mg/L pepstatin A, %1 gliserol (v/v) ve %1,2 Triton-X 100 (v/v) içerir. Ayrıca bu hazırlanan stok çözelti kullanım öncesi ticari olarak satılan proteaz inhibitör kokteyli (1:100) ve fosfataz inhibitör kokteyli (1:10) ile desteklendi.
- c) Ang II: Stok olarak distile suyla 10<sup>-4</sup> M olarak hazırlanıp -20 °C’de alikotlanmış olarak saklandı.
- d) MGO: Stok çözelti 6,5 M’dir ve 2-8 °C’de muhafaza edildi.
- e) Telmisartan, İrbesartan ve SB203580: Çözücü olarak DMSO kullanılarak 5 mM stok çözelti hazırlandı ve literatür bilgisine dayalı olarak hücre kültürü ortamında 10 µM derişimde uygulandı (Ushio-Fukai ve ark., 1998; Min ve ark., 2002; Miyake ve ark., 2007; Song ve ark., 2013; Myojo ve ark., 2014).
- f) PD98059 ve JSH-23: Çözücü olarak DMSO kullanılarak 10 mM stok çözelti hazırlandı ve literatür bilgisine dayalı olarak hücre kültürü ortamında 20 µM derişimde uygulandı (Shin ve ark., 2004; Wang ve ark., 2007; Arias-Salvatierra ve ark., 2011; Song ve ark., 2013; Xie ve ark., 2019).

### **3.3. Protein Konsantrasyon Ölçümü**

Elde edilen hücre lizatlarında protein konsantrasyonu ticari olarak satılan ve mikro bisikoninik asit ya da kısaca mikro BCA diye bilinen kit yardımıyla ölçüldü.

### Mikro BCA deney kitinin prensibi

Ölçüm kiti bisinkoninik asit içeren bir formüle sahip olup bu kitle total protein konsantrasyonu kolorimetrik olarak saptanır. Yöntemin çalışma prensibi Şekil 3.1.'de özetlenmiştir. Bu prensibe göre örnekteki proteinlerin peptit bağları hidroksil iyonlarının oluşturduğu alkali ortamda  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarını  $\text{Cu}^+$  iyonlarına indirger. Sonrasında bir molekül  $\text{Cu}^+$  iyonu 2 molekül BCA ile reaksiyona girerek mor renkli ve suda çözünen  $\text{Cu}^+$ -BCA kompleksi oluşturur. Oluşan kompleks 562 nm'de güçlü bir absorbands vererek spektroskopik olarak konsantrasyon ölçümüne imkan tanır (Smith ve ark., 1985). Absorbansın şiddeti örnekteki protein miktarıyla doğru orantılıdır. Proteinin makromoleküler yapısı, peptid bağlarının sayısı ve fonksiyonel grup olarak sistein, sistin, triptofan ve tirozin amino asitlerinin varlığı bu yöntemde renk oluşumundan sorumlu yapılardır.



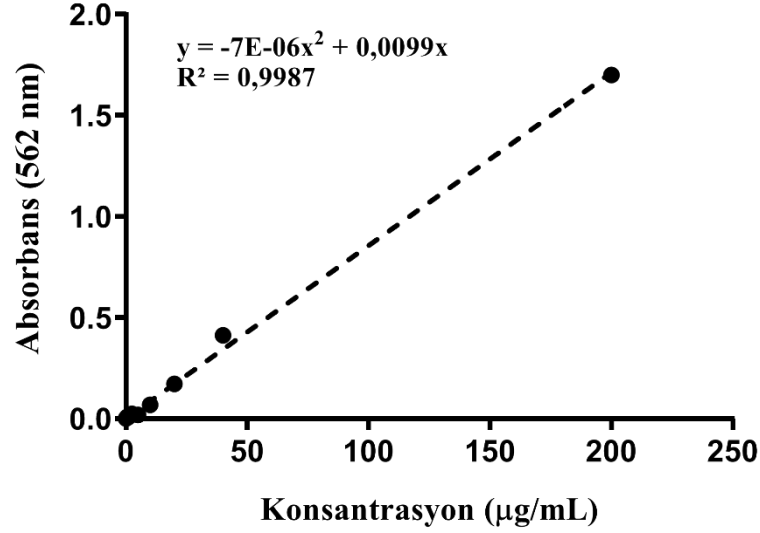
**Şekil 3.1.** Mikro BCA yönteminin prensibi. Proteinler alkali ortamda  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarını  $\text{Cu}^{+1}$  iyonuna indirger. Daha sonra BCA  $\text{Cu}^{+1}$  ile reaksiyona girerek maksimum absorbands dalga boyu 562 nm olan mor renkli bileşik oluşturur.

### Mikro BCA Yöntemiyle Numunelerin Protein Miktarının Ölçülmesi

Kit prosedüründe belirtildiği üzere, kit içeriğinde bulunan BSA ile standartlar ve mikro BCA MA isimli reaktif, MB isimli reaktif ve MC isimli reaktif ile kit çalışma reaktifi hazırlandı. Belirlenen hacimde çalışma reaktifi hazırlamak için 25 birim MA reaktifi ve 24 birim MB reaktifi ve 1 birim MC reaktifi karıştırıldı (25:24:1, reaktif MA:MB:MC, v/v). Her ölçümde gerektiği kadar çalışma reaktifi taze olarak hazırlandı. Numuneler distile suyla dilüe edildikten sonra, kiti üreten firmanın önerdiği

şekilde, mikro plate ölçüm prosedürüne uygun olarak numunelerdeki protein miktarı tayini için aşağıdaki basamaklar takip edilerek ölçüm yapıldı:

- Belirlenen mikro plate kuyucuklarına, 150 µL hacimde standartlar, numuneler ve kör (kör olarak çalışma reaktifi kullanıldı) pipetlendi. Standartların ve numunelerin her biri çift çalışıldı.
- Kuyucukların her birine 150 µL hacminde daha önce hazırlanan çalışma reaktifi pipetlendi ve 30 saniye nazıkçe örnek ve standartlarla reaktifin karışması sağlandı.
- Mikro plate üzeri plastik şeritle kaplanarak 2 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda mikro plate oda sıcaklığına getirildi ve plate okuyucu özelliği olan spektrofotometrede, örneklerin ve standartların 562 nm’de absorbansları okundu.
- Numunedeki protein miktarını hesaplamak için kullanılacak standart eğrisini elde etmek için, okunan BSA standart absorbans değerlerinden, okunan kör absorbans değeri çıkarılarak köre-göre standart absorbans değerleri hesaplandı. Bundan sonra, Şekil 3.2.’de gösterildiği biçimde standart derişimine (µg/mL) karşı absorbans değerlerinin grafiği elde edildi. Yine okunan numune absorbans değerlerinden okunan kör absorbans değeri çıkarılarak numune gerçek absorbans değerleri hesaplandıktan sonra elde edilen standart grafiği kullanılarak numunelerdeki protein derişimleri (µg/mL) hesaplandı. Bulunan sonuç dilüsyon faktörü ile çarpılarak gerçek değerler elde edildi.



Şekil 3.2. BSA standart grafiği.

### 3.4. NF-κB p65 Serin 536 Fosforilasyon Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Ölçümü Fosfo-NF-κB p65 (Ser536) ELISA Kitinin Prensibi

Ang II'nin NF-κB p65 alt ünitesinde 536 no'lu pozisyondaki serin amino asidini (S536) fosforile ettiği bilindiği için bu fosforilasyon noktası seçildi. NF-κB p65 alt ünitesine S536 fosforilasyonunu tespit etmek amacıyla sandviç ELISA kiti kullanıldı. Kit kullanım talimatına uygun olarak ölçümler yapıldı. Kitin çalışma prensibinde kuyucukların, fosfo-NF-κB p65 ünitesini tanıyan bir fare monoklonal antikor (MAb) ile kaplanması ve kuyucuklara eklenen hücre lizatının inkübasyonu esnasında bu antikorun fosfo-NF-κB p65 moleküllerini bağlamasını içerir. Yıkama işlemlerinden sonra ortama NF-κB p65 tavşan MAb (deteksiyon antikor) eklenir ve bu sayede daha önceden kuyucuktaki antikor tarafından bağlanmış olan fosfo-NF-κB p65 proteinleri belirlenir. Sonrasında kuyucuklara yabanturpu peroksidazı (HRP)-bağlı antikor (anti-tavşan IgG) eklenir ve bu antikor deteksiyon antikoruna bağlanır. HRP substratı olan TMB'nin ortama ilavesiyle renk oluşumu gözlenir. Renk oluşumuna ait optik dansitenin (absorbansın) büyüklüğü fosfo-NF-κB p65 S536 miktarı ile orantılıdır.

#### Reaktiflerin hazırlanması

**Deteksiyon antikor:** Kit içeriğinde bulunan liyofilize toz halindeki deteksiyon antikoruna, 1 mL deteksiyon antikor dilüenti eklendi, yavaşça karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilerek konsantre stok solüsyon hazırlandı. Final çalışma çözeltisi için, hazırlanan 1 mL'lik stok solüsyona temiz bir tüp içerisinde 10 mL

deteksiyon antikor dilüenti eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Kullanılmamış çalışma solüsyonu 4 °C’de 4 hafta saklanabileceği kit prospektüsünde ifade edilmiştir.

**HRP-bağlı antikor:** Deteksiyon antikoruna benzer şekilde hazırlandı. 1 mL HRP dilüenti liyofilize toz formdaki HRP-bağlı antikora eklendi, yavaşça karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilerek konsantre stok solüsyon elde edildi. Final çalışma çözeltisi için, hazırlanan 1 mL’lik stok solüsyona temiz bir tüp içerisinde 10 mL HRP-bağlı antikor dilüenti eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Kullanılmamış çalışma solüsyonu 4 °C’de 4 hafta saklanabileceği kit prospektüsünde ifade edilmiştir.

**1X yıkama tamponu:** Distile su ile 20X olan yıkama tamponu 20 kat seyreltildi.

#### **Hücre lizatlarının hazırlanması (adherent hücre protokolü)**

1. Hücreler %80-90 konflüent olunca hücre medyumunu uzaklaştırıldı. Bir kez 2-3 mL serumsuz medyum (SM) ile yıkanan hücrelere SM eklenerek gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün taze SM eklenerek hücrelere yapılacak olan uygulamalar gerçekleştirildi ve inkübasyon süresinin bitmesi beklendi. Bu süre sonunda hücre medyumunu uzaklaştırıldı, bir kez buz soğukluğunda PBS ile yıkandıktan sonra hücrelerin üzerine (10 cm çaplı petriyer için) 0,5 mL hücre lizis tamponu eklendi. Buz üzerinde 5 dk inkübe edildi.
2. Buz üzerindeki hücreler kazındı ve hücre lizatı uygun bir tüpe aktarıldı.
3. Hücre lizatı sonike edildi.
4. Tüpler 4 °C’de 10 dk boyunca 14.000 rpm’de santrifüjlendi ve sonra süpernatant yeni bir tüpe alındı. Elde edilen süpernatant hücre lizatı olarak kullanıldı ve -80 °C’de muhafaza edildi.

#### **Ölçüm prosedürü**

1. Çalışmaya geçmeden önce kuyucukların oda sıcaklığına ulaşmaları beklendi.
2. Hücre lizatları öncelikle deneme yapılarak optimum örnek dilüsyonu belirlendi.
3. 100 µl seyreltilmiş veya seyreltilmemiş hücre lizatı kenarlarına değdirilmeden kuyucuğa pipetlendi. Kuyucuklar film ile kaplanıp kenarlarına bastırıldı ve 37 °C’de 2 saat inkübe edildi.
4. Film yavaşça kaldırıldı ve kuyular yıkandı.
  - a. Kuyucuk içerisindeki sıvı atık kabına döküldü.

- b. Her defasında 200 µl yıkama tamponu eklenerek 4 kez 1X yıkama tamponuyla yıkandı.
- c. Her yıkamada temiz havlu kağıtlara plaka (plate) ters çevrilip hafifçe vurularak kuyucuktaki sıvı tamamen uzaklaştırıldı.
5. Her kuyucuğa deteksiyon antikoru çalışma çözeltisinden 100 µl eklendi. Kuyucuklar filmle kaplandı ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.
6. Dördüncü basamaktaki yıkama işlemi tekrarlandı.
7. Her kuyucuğa HRP-konjuge sekonder antikor çalışma çözeltisinden 100 µl eklendi, kuyucuklar tekrar filmle kaplanarak 37 °C’de 30 dk inkübe edildi.
8. Yıkama prosedürü tekrarlandı.
9. Her kuyucuğa 100 µl TMB substratı eklendi. Filmle kapatılan kuyucuklar 37 °C’de 10 dk inkübe edildi.
10. Her kuyucuğa 100 µl Stop solüsyonu eklendi ve yavaşça birkaç sn çalkalandı (bu aşamada pozitif reaksiyon veren kuyucuklardaki mavi renk sarıya döndü).
11. Dalga boyu daha önceden 450 nm’ye ayarlanıp hazır hale getirilmiş spektrofotometrede hızlı bir şekilde absorbanslar ölçüldü.

### **3.5. Metilglioksal Düzeyinin Yarışmalı (Competitive) ELISA Yöntemiyle Ölçümü**

#### **Oxiselect™ Metilglioksal ELISA Kitinin Çalışma Prensibi**

Oxiselect™ Metilglioksal ELISA kiti, MG-H1 protein bileşenlerinin kantitasyonu ve hızlı şekilde tespiti için geliştirilmiş enzim immünoassay temelli bir kittir. Protein örneklerindeki metilglioksal bileşenlerinin miktarı bilinen MG-BSA standart grafiği ile absorbansının karşılaştırılması ile belirlenir. İlk olarak ELISA plate MG konjugatı ile kaplanır. Daha sonra kaplanan plate kuyucuklarına MG-BSA standardı veya numuneler eklenir. Kısa bir inkübasyon sonrasında anti-MG antikoru eklenir ve daha sonra HRP-konjuge sekonder antikor ilave edilir. Numunelerdeki MG içeriği daha önce ölçülen MG-BSA standart grafiği yardımı ile belirlenir.

#### **Reaktiflerin hazırlanması**

##### **Plate’in MG Konjugatı ile Kaplanması**

İlk olarak kullanımdan hemen önce 100X Konjugat Dilüenti 1X PBS ile seyreltilerek 1X konjugat dilüenti hazırlandı. Yine kullanımdan hemen önce 1 mg/mL MG konjugatı 1X Konjugat Dilüenti kullanılarak 2 basamak halinde seyreltilerek 500 ng/mL MG konjugatı hazırlandı. Ölçüm yapılacak kuyucukların her birine 100 µL 500



ng/mL MG konjugatından eklenir ve gece boyu 4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında MG konjugat solüsyonu kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve 2 kez 1X PBS ile yıkandı. Kuyucuklarda kalan sıvı kağıt havlu yardımıyla uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 200 µL assay dilüent eklenir ve oda sıcaklığında 1 saat bloklama yapıldı. Daha sonra kuyucuklar 4 °C’ye transfer edildi ve kullanımdan hemen önce assay dilüent uzaklaştırıldı. MG konjugatı ile kaplanmış kuyucuklar stabil değildir ve plate kaplandıktan 24 saat içinde kullanıldı. Bu sebeple toplam ölçüm sayısı kadar kuyucuk hazırlandı.

**1X yıkama tamponu:** Deiyonize su ile 10X konsantre olan yıkama tamponu 10 kat seyreltilerek 1X yıkama tamponu elde edildi.

**Anti-MG antikor ve sekonder antikor:** Kullanımdan hemen önce anti-MG antikor ve sekonder antikor assay dilüenti ile 1:1000 oranında seyreltildi. Seyreltilen çözeltiler depolanmadı.

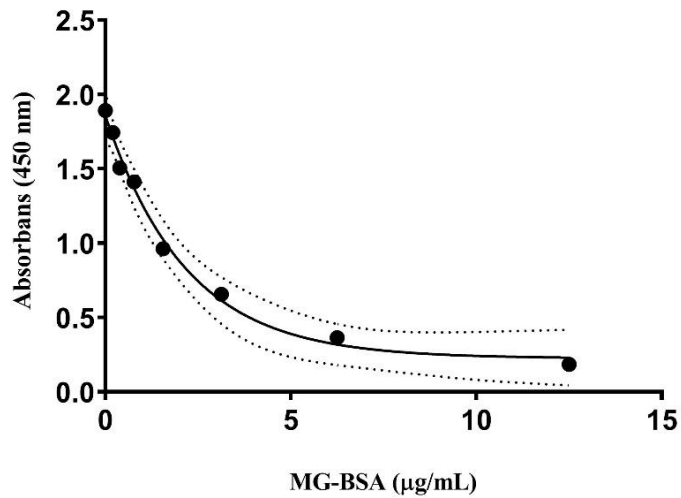
**Standartların hazırlanması:** 1 mg/mL MG-BSA assay dilüenti ile seyreltilerek 0-25 µg/mL aralığında MG-BSA dilüsyon serisi hazırlandı. Örnek Tablo 3.1. aşağıda verilmiştir.

**Tablo 3.1.** MG- BSA standart hazırlama tablosu.

Standart Tüpleri	1 mg/mL MG-BSA standardı (µL)	Assay Dilüenti (µL)	MG-BSA (µg/mL)
1	10	390	25
2	200 µL tüp 1’den	200	12,5
3	200 µL tüp 2’den	200	6,25
4	200 µL tüp 3’den	200	3,13
5	200 µL tüp 4’den	200	1,56
6	200 µL tüp 5’den	200	0,78
7	200 µL tüp 6’den	200	0,39
8	200 µL tüp 7’den	200	0,20
9	0	200	0

## Ölçüm protokolü

1. Kullanımdan önce bütün reaktifler uygun şekilde hazırlandı ve karıştırıldı. Standartlar ve numuneler dublike şekilde çalışıldı.
2. MG konjugatı ile kaplanan plate kuyucuklarına 50 µL bilinmeyen örnek veya MG-BSA standardı eklendi. Eğer gerekliyse bilinmeyen örnekler kuyucuklara eklenmeden önce %0,1 BSA içeren 1X PBS ile seyreltildi. Çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
3. Her kuyucuğa 50 µL dilüe edilmiş anti-MG antikoru eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
4. Kuyucuklar 3 kez 250 µL 1X yıkama tamponu ile yıkandı. Son yıkamadan sonra kuyucuklardaki tampon uzaklaştırıldı ve kalan sıvı artıkları kağıt havluya emdirilip uzaklaştırıldı.
5. Bütün kuyucuklara 100 µL dilüe sekonder antikor-HRP konjugatı eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Süre sonunda 4. basamaktaki yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.
6. Substrat solüsyonu oda sıcaklığına getirildi. Her bir kuyucuğa 100 µL substrat solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 2-20 dk inkübe edildi. Bu esnada renk gelişimi izlendi. Hızlı bir şekilde renk gelişimi olursa reaksiyon daha erken sonlandırıldı.
7. Reaksiyonu sonlandırmak için her bir kuyucuğa 100 µL Stop solüsyon eklenerek okumaya geçildi.
8. Absorbanslar bir mikropate okuyucuda 450 nm'de ölçüldü.



Şekil 3.3. MG-BSA standart grafiği.

### **3.6. Glioksalaz 1 Enzim Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Ölçümü**

#### **Glioksalaz 1 Enzim Düzeyi Ölçüm Kiti Prensibi**

Bu kit sandviç ELISA prensibine dayanan bir kit olup içeriğinde sağlanan kuyucuklar hedef proteine (antijen) yönelik antikolar ile kaplanmıştır. Standart ya da örnekler kuyucuklara eklenir, hedef protein (antijen) kuyucuklara bağlı bulunan antikora bağlanır. Bağlanmayan standart veya örnek yıkamayla uzaklaştırılır. Daha sonra biyotin konjuge deteksiyon antikoru eklenir ve o da gidip bağlı olan antijene bağlanır. Bağlanmayan deteksiyon antikoru yıkamayla uzaklaştırılır. Biyotine bağlanması için ortama avidin- HRP konjugatı ortama ilave edilir. Bağlanmayan avidin-HRP konjugatı yıkamayla uzaklaştırılır. Daha sonra ortama TMB substratı eklenir ki bu substrat HRP enzimi ile reaksiyona girerek renk oluşumu ile sonuçlanır. Reaksiyonu sonlandırmak için sülfürik asit içeren bir stop solüsyon ortama ilave edilir ve optik dansite 450 nm’de okunur. Bilinmeyen örneğe ait optik dansite değeri standart grafiği ile kıyaslanarak antijen konsantrasyonu belirlenir.

#### **Numunelerin elde edilmesi (Hücre Lizatı)**

Hücreleri toplayıp santrifüj ile pellet elde edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler daha sonra 3 kez PBS ile yıkandı ve yine PBS ile resüspanse edildi. 4 kez ultrasonikasyon uygulanan hücreler parçalandı. 1500 g’de 10 dk 4 °C’de santrifüj edilerek hücresel debris uzaklaştırıldı. Ele geçen süpernatantlar numune olarak ölçümlerde kullanıldı.

#### **Standartların hazırlanması**

Hedef antijen konsantrasyonunu belirlemek için standart grafiği oluşturmak amacıyla standart çözeltiler hazırlandı. Standart stok solüsyonu 10 ng/mL konsantrasyonda hazırlandı. Bu amaçla 1 tüp liyofilize standart 1 mL örnek dilüenti le çözüldü. 10 dk oda sıcaklığında yavaş bir şekilde karışması sağlanarak ve köpük oluşumundan kaçınılarak inkübe edildi. Standartların hazırlanmasına ait Tablo 3.2. aşağıda sunulmuştur.

**Tablo 3.2.** Glioksalaz 1 ölçümü için standart hazırlama tablosu.

<b>Standart Tüpleri</b>	<b>10 ng/mL stok standart solüsyonu (µL)</b>	<b>Örnek Dilüenti (µL)</b>	<b>Standartın konsantrasyonu (ng/mL)</b>
<b>D1</b>	500 µL	0	<b>10 ng/mL</b>
<b>D2</b>	D1 tüpünden 250 µL	250 µL	<b>5 ng/mL</b>
<b>D3</b>	D2 tüpünden 250 µL	250 µL	<b>2,5 ng/mL</b>
<b>D4</b>	D3 tüpünden 250 µL	250 µL	<b>1,25 ng/mL</b>
<b>D5</b>	D4 tüpünden 250 µL	250 µL	<b>0,625 ng/mL</b>
<b>D6</b>	D5 tüpünden 250 µL	250 µL	<b>0,313 ng/mL</b>
<b>D7</b>	D6 tüpünden 250 µL	250 µL	<b>0,157 ng/mL</b>

#### **Reaktiflerin hazırlanması**

Kullanımdan önce bütün reaktifler oda sıcaklığına getirildi.

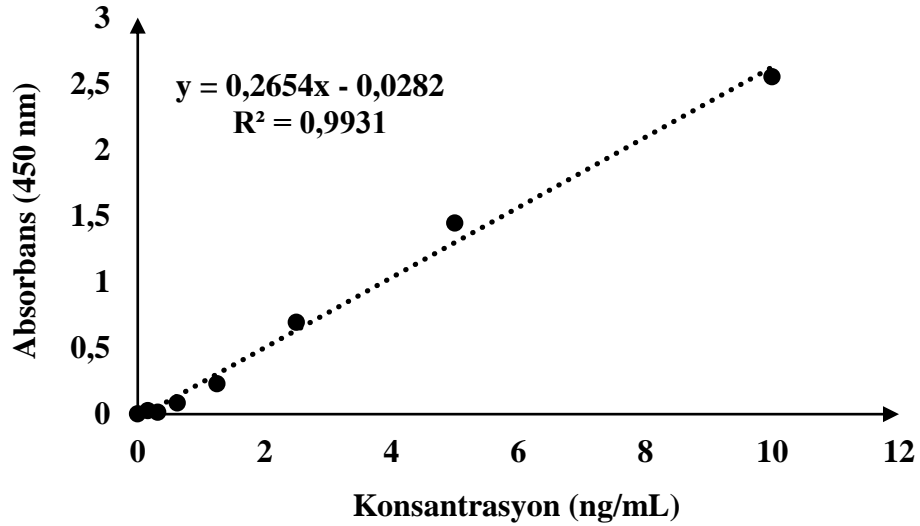
**Deteksiyon reaktifi A ve B:** Deteksiyon reaktifi A ve B stok çözeltileri çalışılacak kuyucuk sayısına göre seyreltilerek yeterli hacimde Deteksiyon reaktifi A ve B çalışma solüsyonu hazırlandı. Deteksiyon reaktifi A ve B 1:100 oranında sırasıyla assay dilüent A ve B kullanılarak seyreltildi.

**1X yıkama tamponu:** 25X yıkama tamponu stok çözeltisi distile su yardımıyla 1:25 oranında seyreltilerek kullanıldı.

#### **Ölçüm prosedürü**

1. Her kuyucuğa 100 µL standart, kör veya örnek eklendi, film ile kapatıldı ve 37 °C’de 2 saat inkübe edildi.
2. Kuyucuklardaki sıvı aspire edildi, yıkama yapılmadı.
3. Her kuyucuğa 100 µL deteksiyon reaktifi A çalışma solüsyonu eklendi, film ile kapatıldı ve yavaşça karıştırıldı. 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.

4. Kuyucuklardaki sıvı aspire edildi ve 3 kez yıkandı. Yıkama için her kuyucuğa yaklaşık 350 µL 1X yıkama tamponu eklendi, 1-2 dk beklendi ve aspire edildi. Son yıkamadan sonra kalan sıvı kağıt havluya emdirilip uzaklaştırıldı.
5. Her kuyucuğa 100 µL deteksiyon reaktifi B çalışma solüsyonu eklendi, film ile kapatıldı ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.
6. Kuyucuklardaki sıvı aspire edildi ve 4. basamaktaki yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.
7. Her kuyucuğa 90 µL TMB substratı ilave edildi, yeni bir film ile kapatıldı ve 37 °C’de 15-30 dk inkübe edildi. Işıktan korunan plate de renk gelişimi izlendi.
8. Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyon eklendi, bu anda mavi olan renk anında sarıya döndü.
9. En kısa sürede 450 nm’de optik dansiteler okundu.



Şekil 3.4. Glioksalaz 1 standart grafiği.

### 3.7. Glioksalaz 1 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

#### Glo1 Aktivite Ölçüm Kitinin Prensibi

Glioksalaz 1 enzimi bir laktoilglutasyon liyaz olup aynı zamanda metilglioksalaz, aldoketomutaz veya (R)-S-laktoilglutasyon metilglioksal-liyaz adlarıyla da bilinir. Enzim glutasyonil grupları ve aldehitler arasındaki spontan reaksiyonlarla oluşan hemitiyoasetal birimlerinin izomerizasyonunu katalizler. Glo1’in fizyolojik fonksiyonu reaktif bir 2-oksoaldehit olan metilglioksalın detoksifikasyonudur. Glo1 aktivite kiti enzim preparatı veya biyolojik örnek gibi pek çok numunede Glo1 aktivitesinin basit ve doğrudan ölçümüne dayanır. Kit prensip olarak Glo1 aracılı S-

laktoilglutasyon oluşumunu ve 240 nm'deki absorbans değişimini ölçmeyi temel alır. Bir ünite Glioksalaz 1 bir dakikada pH 6,6'da ve 25 °C'de metilglioksal ve redükte glutatyondan 1 µmol S-laktoilglutasyon oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanır.

### **Protein İçeren Örnekler İçin Ölçüm Prosedürü**

1. Bir numune için iki adet mikro santrifüj tüpü (1,5 mL'lik) alındı ve her birine 40 µL örnek eklendi. Bu tüplerden biri numune tüpü diğeri numune körü olarak tanımlandı.
2. Her bir tüp için 160 µL Master Reaksiyon Miks solüsyonu gerekir. Master Reaksiyon Miks solüsyonunu hazırlamak için 160 µL çalışma tamponu, 8 µL substrat ve 8 µL kosubstrat karıştırıldı.
3. Numune tüpüne 160 µL Master Reaksiyon Miks solüsyonu eklendi, ancak numune körü olarak tanımlanan tüpe eklenmedi. Oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi.
4. 20 dk inkübasyon sonrasında numune tüplerine 70 µL 4 M perklorik asit eklenerek proteinler çöktürüldü. Numune körü olan tüplere herhangi bir şey eklenmedi. Tüpler karıştırılmak üzere vortekslendi ve 15 dk buz üzerinde inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrasında 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilen numune tüplerinden 200 µL temiz süpernatant alınarak 96 kuyucuklu UV plate kuyucuklarına aktarıldı.
6. 70 µL 4 M perklorik asit numune körlerine eklendi. Vortekslendi ve buz üzerinde 15 dk inkübe edildi.
7. 15 dk sonunda numune körlerine 160 µL Master Reaksiyon Miks solüsyonu eklendi. Tüpler vortekslendi ve buz üzerinde 15 dk inkübe edildi.
8. Numune körleri 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Ele geçen süpernatantlardan 200 µL alınarak 96 kuyucuklu UV plate kuyucuklarına aktarıldı.
9. Son olarak tüm tüplerin 240 nm'de absorbansları okundu.

### **Hesaplamalar**

Bir numunenin Glioksalaz 1 aktivitesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$\text{Aktivite} = \frac{(A_{240})_{\text{numune}} - (A_{240})_{\text{numune körü}}}{\varepsilon \times l} \times \frac{V_T}{t} \times \frac{1}{V_s} \times 1,35 \times n$$

$$= 175 \times [(A_{240})_{\text{numune}} - (A_{240})_{\text{numune körü}}] \times 1,35 \times n \text{ ünite/L}$$

- S-laktoilglutasyon için ekstinksiyon katsayısı  $\varepsilon = 3,37 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- $l$  = Kitle birlikte gelen plakada ışının aldığı yol (0,425 cm)
- $V_T$  = total reaksiyon hacmi (0,2 mL)
- $t$  = reaksiyon süresi (10 dk)
- $V_s$  = örnek hacmi (40  $\mu\text{L}$ )
- 1,35 = deproteinizasyon basamağı için dilüsyon faktörü
- $n$  = dilüsyon faktörü (dilüsyon yapılmışsa)

### 3.8. Nrf2 (NFE2L2, Nuclear Factor, Erythroid Derived 2 Like Protein 2) Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Ölçümü

#### Nrf2 ELISA Kitinin Çalışma Prensipleri

Sandviç ELISA prensibine dayanan kit içeriğindeki plate kuyucukları Nrf2 proteinine spesifik antikörlerle kaplanmıştır. Standart ya da örnekler kuyucuklara eklenir ve daha sonra spesifik antikor ilave edilir. Daha sonra Nrf2 için spesifik biyotinlenmiş deteksiyon antikoru ve ardından avidin-HRP konjugatı kuyucuklara ilave edilerek inkübe edilir. Bağlanmayan yapılar yıkamayla uzaklaştırılır. Yıkama sonrasında kuyucuklara substrat solüsyonu eklenir. Sadece Nrf2, biyotinlenmiş deteksiyon antikoru ve avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklarda mavi renk gelişir. Enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit solüsyonu ilavesiyle sonlandırılır ve mavi renk sarıya döner. Optik dansite 450 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür. Optik dansite değeri Nrf2 konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Örneklerdeki Nrf2 konsantrasyonu standart grafik ile kıyaslanarak hesaplanır.

#### Numunelerin elde edilmesi (Hücre Lizatı Süpernatanı)

Hücrelerin parçalanmasıyla elde edilen lizat 1000 g’de 2-8 °C’de 20 dk santrifüjlenerek çözünmeyen safsızlıklar ve hücre debrisleri uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrası süpernatantlar toplandı ve en kısa sürede çalışma gerçekleştirildi.

### **Reaktiflerin hazırlanması**

Bütün reaktifler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi.

**Yıkama tamponu:** 25X konsantre yıkama tamponu çözeltisi distile su ile 1:25 oranında seyreltilerek 1X yıkama tamponu elde edildi.

**Biyotinlenmiş Deteksiyon Antikoru:** Deneyden önce her bir kuyucuk için 100 µL olacak şekilde gereken hacim hesaplandı. Stok çözelti kullanımdan önce santrifüjlendi ve sonrasında biyotinlenmiş deteksiyon antikoru dilüenti ile 1:100 oranında seyreltilerek biyotinlenmiş deteksiyon antikoru çalışma solüsyonu elde edildi.

**Konsantre HRP konjugatı:** Deneyden önce her bir kuyucuk için 100 µL olacak şekilde gereken hacim hesaplandı. Stok çözelti kullanımdan önce santrifüjlendi ve sonrasında konsantre HRP konjugat dilüenti ile 1:100 oranında seyreltilerek HRP konjugatı çalışma solüsyonu elde edildi.

### **Standartların hazırlanması**

Standartlar kullanımdan 15 dk önce hazırlandı. Kit içeriğinde sağlanan standart 10.000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve daha sonra 1 mL Referans Standart&Örnek dilüenti ile çözüldü. 10 dk inkübe edildi ve birçok kez baş aşağı edilerek karıştırıldı. Tamamen çözüldükten sonra pipet yardımıyla iyice karıştırıldı. Bu şekilde 1000 pg/mL konsantrasyonda stok standart çözeltisi elde edildi. Daha sonra bir seri şeklinde dilüsyonlar yapılarak standart çözeltilerin tamamı elde edildi. Dilüsyonlara ait Tablo 3.3. aşağıda verilmiştir.

**Tablo 3.3.** Nrf2 ölçümü için standart hazırlama tablosu.

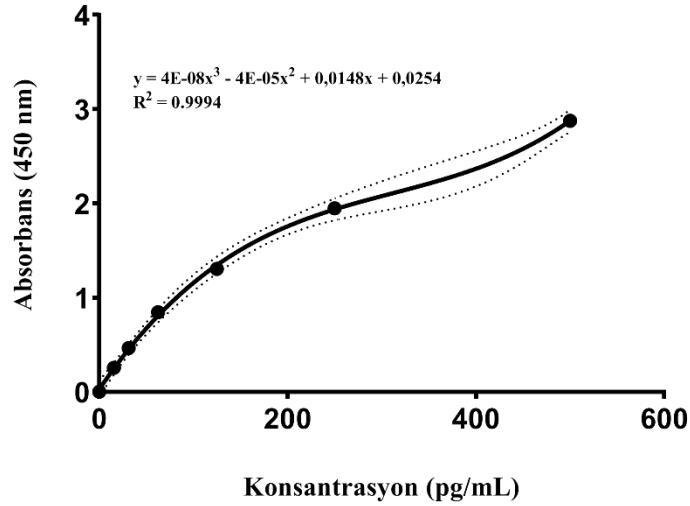
<b>Standart Tüpleri</b>	<b>1000 pg/mL Nrf2 standardı (µL)</b>	<b>Referans Standart&amp;Örnek dilüenti (µL)</b>	<b>Nrf2 standardı konsantrasyonu (pg/mL)</b>
<b>1</b>	1000	0	<b>1000</b>
<b>2</b>	500 µL tüp 1'den	500	<b>500</b>
<b>3</b>	500 µL tüp 2'den	500	<b>250</b>
<b>4</b>	500 µL tüp 3'den	500	<b>125</b>
<b>5</b>	500 µL tüp 4'den	500	<b>62,5</b>



<b>6</b>	500 µL tüp 5'den	500	<b>31,25</b>
<b>7</b>	500 µL tüp 6'dan	500	<b>15,63</b>
<b>8</b>	0	500	<b>0</b>

### **Ölçüm prosedürü**

1. Her bir kuyucuğa 100 µL standart, kör veya numune eklendi. Kör kuyusuna Referans Standart&Örnek dilüenti eklendi. Yavaşça karışması sağlandı ve 90 dk 37 °C'de inkübe edildi.
2. Kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı ve yıkama yapılmadı. Her kuyucuğa 100 µL Biotinlenmiş Deteksiyon antikoru ilave edildi. Kuyucuklar bir filmle kapatıldı ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
3. Bütün kuyucuklardaki sıvı tamamen uzaklaştırıldı ve 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Bu amaçla her kuyucuğa 350 µL 1X yıkama tamponu eklendi, 1-2 dk beklendikten sonra da kuyucuklardaki yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Son yıkamadan sonra kalan sıvı bir kağıt havluya kuyucukların ters çevrilmesiyle emdirilerek uzaklaştırıldı.
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjugatı Çalışma solüsyonu eklendi. Kuyucuklar bir filmle kapatıldı ve 37 °C'de 30 dk inkübe edildi.
5. 3. basamaktaki yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.
6. Her kuyucuğa 90 µL substrat solüsyonu ilave edildi. Yeni bir film ile kaplanan kuyucuklar ışıktan korunarak 37 °C'de 15 dk inkübe edildi.
7. Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu ilave edildi. Pozitif reaksiyon olan kuyucuklarda renk bu aşamada sarıya döndü.
8. En kısa sürede 450 nm'de absorbanlar okundu.



Şekil 3.5. Nrf2 standart grafiği.

### 3.9. NF-κB p65 Düzeyinin (Total) ELISA Yöntemiyle Ölçümü

#### NF-κB p65 ELISA Kitinin Çalışma Prensibi

Sandviç ELISA prensibine dayanan kit içeriğindeki plate kuyucukları NF-κB p65 proteinine spesifik antikorla kaplanmıştır. Standart ya da örnekler kuyucuklara eklenir ve daha sonra spesifik antikor ilave edilir. Daha sonra NF-κB p65 için spesifik biyotinlenmiş deteksiyon antikor ve ardından avidin-HRP konjugatı kuyucuklara ilave edilerek inkübe edilir. Bağlanmayan yapılar yıkamayla uzaklaştırılır. Yıkama sonrasında kuyucuklara substrat solüsyonu eklenir. Sadece NF-κB p65, biyotinlenmiş deteksiyon antikor ve avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklarda mavi renk gelişir. Enzim-substrat reaksiyonu Stop solüsyonu ilavesiyle sonlandırılır ve bu aşamada sarı renk gözlenir. Optik dansite 450 nm'de spektrofotometrede ölçülür. Optik dansite değeri NF-κB p65 konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Örneklerdeki NF-κB p65 konsantrasyonu standart grafik ile kıyaslanarak hesaplanır.

#### Numunelerin elde edilmesi (Hücre Lizatı Süpernatanı)

Adherent hücreler 2-3 mL soğuk PBS ile yıkanır ve daha sonra tripsin yardımıyla hücreler yüzeyden kaldırılarak toplanır. Bir santrifüj tüpüne alınan hücreler 5 dk 1000 g'de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatan uzaklaştırılır ve pelletteki hücreler 3 kez soğuk PBS ile yıkanır. Her bir milyon hücre için 150-250 µL soğuk PBS eklenerek hücreler resüspanse edilir. Hücreler tamamen parçalanana kadar dondurma-çözme işlemi yapılır, ardından 1500 g'de 4 °C'de 10 dk santrifüj yapılır. Santrifüj sonrasında süpernatan alınarak ölçümlerde kullanılır.

### **Reaktiflerin hazırlanması**

Bütün reaktifler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi.

**Yıkama tamponu:** 25X konsantre yıkama tamponu çözeltisi distile su ile 1:25 oranında seyreltilerek 1X yıkama tamponu elde edildi.

**Biyotinlenmiş Deteksiyon Antikoru:** Deneyden önce her bir kuyucuk için 100 µL olacak şekilde gereken hacim hesaplandı. Stok çözelti kullanımdan önce santrifüjlendi ve sonrasında biyotinlenmiş deteksiyon antikoru dilüenti ile 1:100 oranında seyreltilerek biyotinlenmiş deteksiyon antikoru çalışma solüsyonu elde edildi.

**Konsantre HRP konjugatı:** Deneyden önce her bir kuyucuk için 100 µL olacak şekilde gereken hacim hesaplandı. Stok çözelti kullanımdan önce santrifüjlendi ve sonrasında konsantre HRP konjugat dilüenti ile 1:100 oranında seyreltilerek HRP konjugatı çalışma solüsyonu elde edildi.

### **Standartların hazırlanması**

Kit içeriğinde sağlanan standart 10.000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve daha sonra 1 mL Referans Standart & Örnek dilüenti ile çözüldü. 10 dk inkübe edildi ve birçok kez baş aşağı edilerek karıştırıldı. Tamamen çözüldükten sonra pipet yardımıyla iyice karıştırıldı. Bu şekilde 5000 pg/mL konsantrasyonda stok standart çözeltisi elde edildi. Daha sonra bir seri şeklinde dilüsyonlar yapılarak standart çözeltilerin tamamı elde edildi. Dilüsyonlara ait Tablo 3.4. aşağıda verilmiştir.

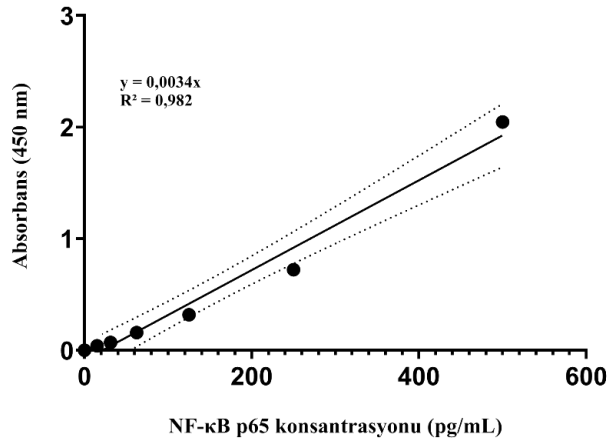
**Tablo 3.4.** NF-κB p65 ölçümü için standart hazırlama tablosu.

<b>Standart Tüpleri</b>	<b>5000 pg/mL NF-κB p65 standardı (µL)</b>	<b>Referans Standart&amp;Örnek dilüenti (µL)</b>	<b>NF-κB p65 standardı konsantrasyonu (pg/mL)</b>
<b>1</b>	5000	0	<b>5000</b>
<b>2</b>	500 µL tüp 1'den	500	<b>2500</b>
<b>3</b>	500 µL tüp 2'den	500	<b>1250</b>
<b>4</b>	500 µL tüp 3'den	500	<b>625</b>
<b>5</b>	500 µL tüp 4'den	500	<b>312,5</b>

6	500 µL tüp 5'den	500	156,25
7	500 µL tüp 6'den	500	78,13
8	0	500	0

### Ölçüm prosedürü

1. Her bir kuyucuğa 100 µL standart, kör veya numune eklendi. Kör kuyusuna Referans Standart&Örnek dilüenti eklendi. Yavaşça karışması sağlandı ve 90 dk 37 °C'de inkübe edildi.
2. Kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı ve yıkama yapılmadı. Her kuyucuğa 100 µL biyotinlenmiş deteksiyon antikoru ilave edildi. Kuyucuklar bir filmle kapatıldı ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
3. Bütün kuyucuklardaki sıvı tamamen uzaklaştırıldı ve 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Bu amaçla her kuyucuğa 350 µL 1X yıkama tamponu eklendi, 1-2 dk beklendikten sonra da kuyucuklardaki yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Son yıkamadan sonra kalan sıvı bir kağıt havluya kuyucukların ters çevrilmesiyle emdirilerek uzaklaştırıldı.
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugatı çalışma solüsyonu eklendi. Kuyucuklar bir filmle kapatıldı ve 37 °C'de 30 dk inkübe edildi.
5. 3. basamaktaki yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.
6. Her kuyucuğa 90 µL substrat solüsyonu ilave edildi. Yeni bir film ile kaplanan kuyucuklar ışıktan korunarak 37 °C'de 15 dk inkübe edildi.
7. Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu ilave edildi.
8. En kısa sürede 450 nm'de absorbanlar okundu.



Şekil 3.6. NF-κB p65 standart grafiği.

### 3.10. Redükte Glutasyon Düzeyinin Florimetrik Yöntemle Ölçülmesi

#### Florimetrik GSH Kitinin Çalışma Prensibi

Kit içeriğinde bulunan OPA probu (o-fitalaldehit) okside glutasyonla reaksiyona girmez ve spesifik olarak GSH ile reaksiyona girer. Bu sayede GSH düzeyi interferanstan etkilenmeden hassas bir şekilde saptanabilir.

#### Reaktiflerin Hazırlanması

**OPA probu:** Kit içerisinde bulunan OPA probuna 0,85 mL distile su eklenir ve karıştırılır.

**GSH standardı:** Kit içerisinde bulunan GSH standardına 45 µL distile su eklenir ve GSH stabilizasyonu için 5 µL perklorik asit (6 N) ilave edilir. Bu şekilde hazırlanan standart konsantrasyonu 20 µg/µL'dir.

#### Numunelerin hazırlanması

GSH kararsız yapıdadır ve hücre lizatı tarafından hızlı bir şekilde okside edilebilir. Bu yüzden bütün reaktifler ve örnekler buz soğukluğunda muhafaza edilir ve olabildiğince hızlı çalışılır. Örneklerin alınacağı santrifüj tüplerine 20 µL perklorik asit (6 N) eklenerek buz üzerinde hazır bekletilir. Her 2-4 milyon hücre için 100 µL buz soğukluğundaki glutasyon çalışma tamponu buz üzerindeki hücrelere eklenir ve hücrelerin homojenize olması sağlanır. Bu işlemde ele geçen homojenatlardan 60 µL alınarak, daha önce perklorik asit eklediğimiz ve buz üzerinde hazır bekleyen santrifüj tüplerine aktarılır. Bir çok defa vorteksleyerek iyice karışma sağlanır. Vorteksleme sonrası buz üzerinde 5 dk bekletilen örnekler, sonrasında 13.000 g'de 4 °C'de 2 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası pellet atılarak süpernatant alınır ve -80 °C'de muhafaza edilir (1 ay stabildir).

#### Ölçüm Prosedürü

- **Standart grafiği:** 20 µg/µL standart GSH stoğundan 10 µL alınır ve 990 µL çalışma tamponu eklenerek 0,2 µg/µL çalışma standart solüsyonu üretilir. Çalışma standart solüsyonundan 96 kuyucuklu plakanın kuyularına bir dizi halinde sırasıyla 0, 2, 4, 6, 8, 10 µL ekleyerek kuyucuk başına sırasıyla 0, 0,4, 0,8, 1,6, 2 µg GSH eklenmiş olur. Çalışma tamponu ile bu kuyucuklardaki toplam hacim 90 µL'ye getirilir.
- **Örneklerin ölçüm için hazırlanması:** Numune hazırlanması aşamasında bahsedilen ve perklorik asit eklenmesi ile elde edilen örneklerden 40 µL alınır

ve üzerine 20 µL buz soğukluğunda 6 N potasyum hidroksit eklenir. Böylelikle perklorik asit çöktürülür ve örnekler nötralize edilir. Buz üzerinde 5 dk inkübe edildikten sonra 4 °C’de 13.000 rpm’de 2 dk santrifüj edilir. Nötralize örneklerin her birinden 10 µL alınarak 96 kuyucuklu plakadaki kendine ait kuyuya transfer edilir.

- Kuyucuklara alınan örneklerin hacmi çalışma tamponu ile 90 µL’ye getirilir.
- Standart ve örnek kuyularına 10 µL OPA probu eklenir, iyice karıştırılır ve oda sıcaklığında 40 dk inkübe edilir. Örnek ve standartların rölatif floresans birimi (RFU), floresans plaka okuyucuda sırasıyla 340 ve 420 nm eksitasyon ve emisyon dalga boyunda ölçülür.

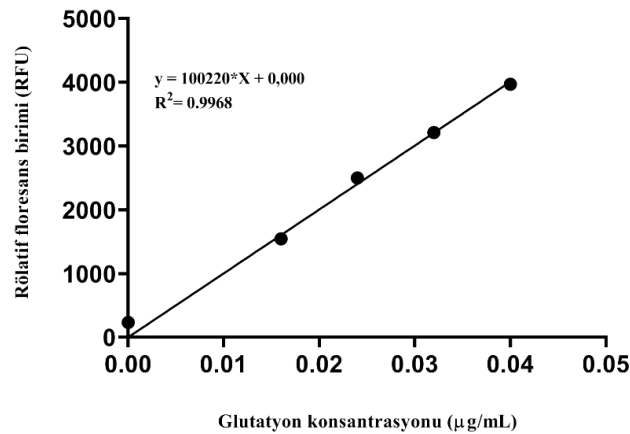
**Hesaplamalar:** Bütün örneklerin ve standartların RFU değerinden, örnek içermeyen kör tüpüne ait RFU değeri çıkarılır. RFU-GSH standart grafiği çizilir ve bu grafikten yararlanarak örneklerin GSH miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\text{Glutasyon konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}) = \text{Ga/Sv}$$

Ga = Standart grafiğinden elde edilen glutasyon miktarı (µg olarak)

Sv = Örnek kuyularına eklenen orijinal örnek hacmi (mL olarak)

Bu hesaplardan elde edilen GSH konsantrasyonu iki ile çarpılarak örneklerdeki gerçek GSH konsantrasyonu bulunur. İki ile çarpılmasının nedeni ise koruma ve nötralizasyon basamaklarında (perklorik asit ve potasyum hidroksit eklenmesi) örneğin iki kat dilüe olmasıdır.



Şekil 3.7. Redükte glutasyon standart grafiği.

### **Analiz ve İstatistiksel Yöntem**

Ölçüm sonuçları standart grafiklerin elde edilmesinden sonra, örnek sonuçlarının bu grafikten interpolasyonu ile elde edildi. Grafik çizimi, interpolasyon işlemleri ve verilerin istatistiksel değerlendirmesi GraphPad Prism (versiyon 8.0.1) programı veya Excel ile yapıldı. Ölçümlerde en az 3 deney tekrarı yapılmış olup, veriler istatistiksel olarak Mann-Whitney U ve One-Way ANOVA testleriyle (Tukey ve Bonferroni Post-Hoc testleriyle) değerlendirildi.

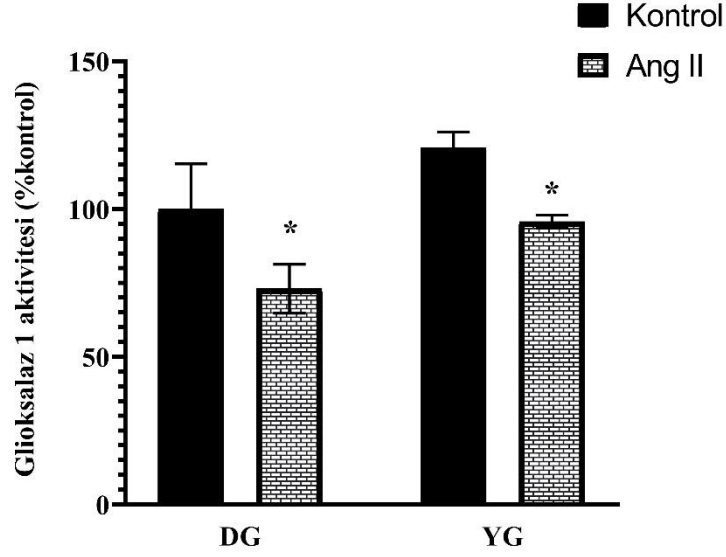
## 4. BULGULAR

Primer VDKH petrilere ekildi ve %80 doluluğa oluşan hücreler iki gruba ayrıldı ve ilk grup hücreler bir gece serumsuz, düşük glukozlu (1,0 g/L veya 5,5 mM) (DG) medyumla, ikinci grup ise serumsuz, yüksek glukoz (4,5 g/L veya 25 mM) (YG) içeren medyumla inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hücre medyumları taze medyumla değiştirildi, kontrol grubu hücrelere herhangi bir işlem yapılmadı. İnhibitör uygulanan hücrelere literatür bilgisine (Inagami ve Eguchi, 2000; Li ve ark., 2006; Obama ve ark., 2015; Forrester ve ark., 2018; Mondaca-Ruff ve ark., 2018) dayanarak 100 nM Ang II uygulamasından en az 30 dk önce inhibitör uygulandı ve bu süre sonunda Ang II ortama eklendi. Kontrol ve uygulama yapılan hücreler daha sonra 48 saat inkübasyona bırakıldı ve bu süre sonunda hücreler parçalanarak hücre lizatları elde edilerek bu lizatlardan ölçümler gerçekleştirildi. Kuşak sayısı 3-7 olan hücreler deneylerde kullanıldı. Glo1 aktivite ölçümü en az 3 tekrar yapılarak çalışıldı.

### **4.1. Anjiyotensin II Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Gliksalaz 1 Aktivitesini Azaltır**

Düşük ve yüksek glukoz ortamında 100 nM Ang II ile 48 saat inkübe edilen VDKH'nde Glo1 aktivitesi ölçüldü. Kontrol grubuna kıyasla Ang II'nin düşük glukoz ortamında Glo1 aktivitesini yaklaşık %27 düşürdüğü gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Düşük glukoz kontrol grubuna kıyasla yüksek glukoz kontrol grubunda Glo1 aktivitesinin arttığı (%20) tespit edildi ( $p > 0,05$ ). Yüksek glukoz ortamındaki hücreler kendi içinde karşılaştırıldığında kontrol grubuna kıyasla Ang II'nin bu grupta da Glo1 aktivitesini yaklaşık %20 azalttığı görüldü ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.1).



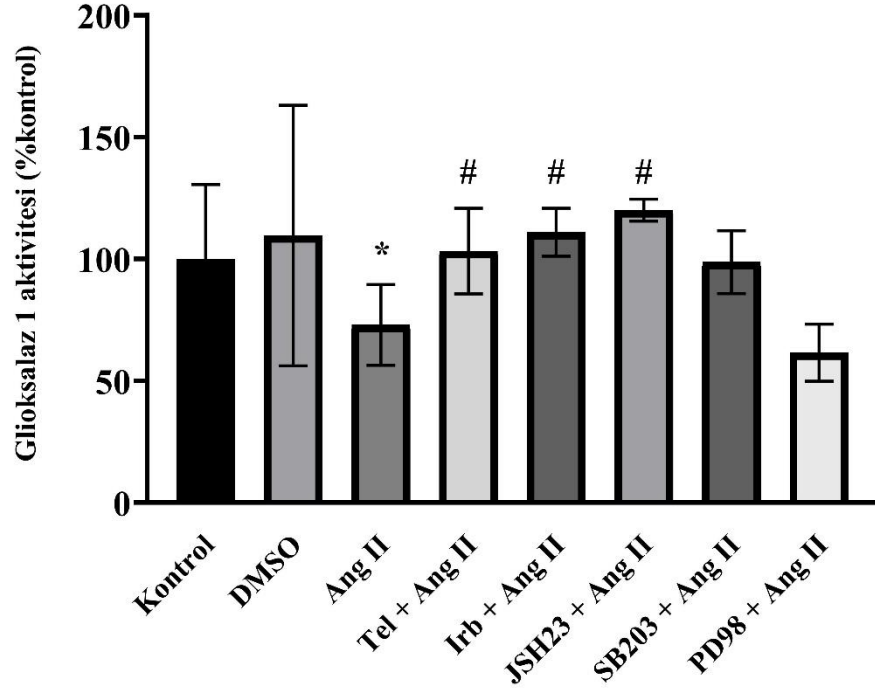


**Şekil 4.1.** VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 enzim aktivitesine etkisi. Hücelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II 48 saat süre ile düşük ve yüksek glukoz ortamında uygulandı. Düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 aktivitesini baskıladığı görüldü. Veriler  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  olarak ifade edildi. DG: düşük glukoz, YG: yüksek glukoz, n=3, \*:kendi kontrolüne karşı  $p < 0,05$ .

#### 4.1.1. Düşük Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF- $\kappa$ B, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının Glioksalaz 1 Aktivitesine Etkisi

Ang II'nin Glo1 aktivitesini baskılamasında AT1R rolünü belirlemek amacıyla düşük glukoz ortamındaki hücelere Ang II uygulaması öncesinde AT1R blokörleri telmisartan ve irbesartan (her ikisi de 10  $\mu$ M) uygulandı. Reseptör blokörü uygulamasından 30 dk sonra Ang II (100 nM) ortama ilave edilerek 48 saat inkübe edildi. Ayrıca Glo1 aktivitesinin Ang II ile azaldığı belirlendikten sonra Ang II'nin bu etkiyi nasıl oluşturduğunu belirlemek amacıyla Ang II ile uyarıldığı bilinen NF- $\kappa$ B, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK sinyal yolaklarının Glo1 aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemeyi amaçladık. Bu doğrultuda düşük glukoz ortamında bir gece serumsuz medyumla inkübasyona bırakılan hücelere, Ang II uyarımı öncesinde, NF- $\kappa$ B'nin nükleer translokasyonunu baskılayan NF- $\kappa$ B inhibitörü JSH23 (20  $\mu$ M), p38 MAPK inhibitörü SB203580 (10  $\mu$ M) ve ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 (20  $\mu$ M) inhibitörü uygulandı ve 30 dk sonra Ang II (100 nM) ortama eklenerek 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnhibitörlerin çözülmesinde dimetil sülfoksit (DMSO) kullanıldığı için sadece DMSO (%0,2 v/v) uygulanan hücrelerdeki Glo1 aktivite değişimi de izlendi. AT1R blokörleri olan telmisartan ve irbesartanın Ang II'nin neden olduğu Glo1 aktivitesini restore ettiği gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Aktiviteyi artırma bakımından telmisartan ve irbesartan arasında bir fark gözlemlenmedi. NF- $\kappa$ B inhibitörü

JSH-23 uygulanması Glo1 aktivitesini Ang II uygulanan gruba göre anlamlı derecede artırdığı gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Glo1 aktivitesinin p38 MAPK inhibitörü SB203580 ve ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 uygulanan grupta, Ang II uygulanan gruba göre anlamlı değişiklik göstermediği belirlendi (Şekil 4.2).

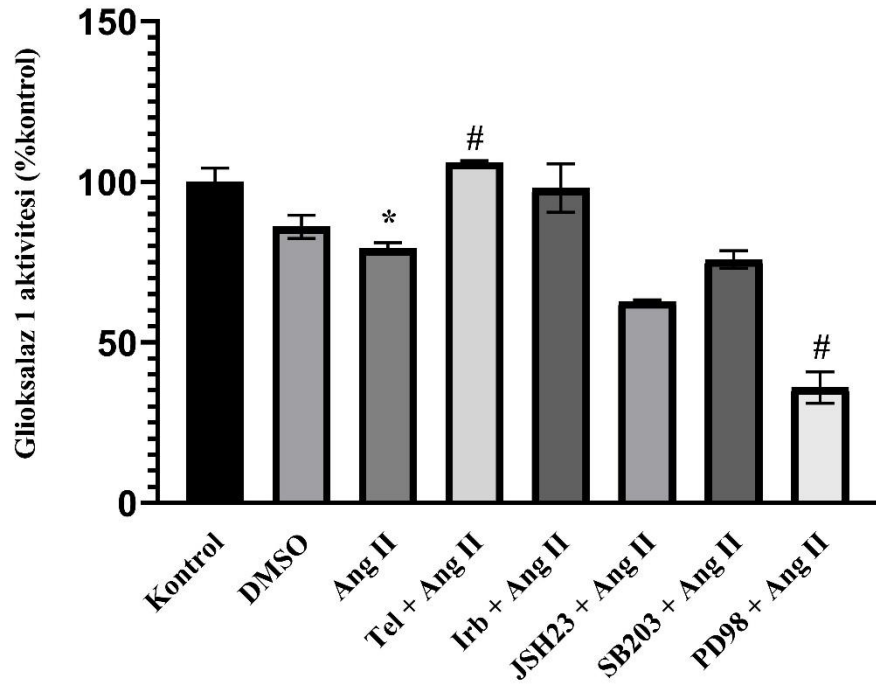


**Şekil 4.2.** VDKH'nde düşük glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 enzim aktivitesine etkisi. Hücrelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II 48 saat süre ile düşük glukoz ortamında uygulandı. Düşük glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 aktivitesini baskıladığı, AT1R blokörü telmisartan ve irbesartanın bu etkiyi ortadan kaldırdığı görüldü. p38 MAPK inhibitörü SB203580'ün Ang II'nin yol açtığı Glo1 aktivitesindeki düşüşü restore ettiği belirlendi. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=3, \*:kontrolle karşı, #: Ang II'ye karşı,  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2. Yüksek Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF- $\kappa$ B, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının Glioksalaz 1 Aktivitesine Etkisi

Anjiyotensin II'nin Glo1 aktivitesini baskılamasında AT1R rolünü belirlemek amacıyla yüksek glukoz ortamındaki hücrelere Ang II uygulaması öncesinde AT1R blokörleri telmisartan ve irbesartan (her ikisi de 10  $\mu$ M) uygulandı. Reseptör blokörü uygulamasından 30 dk sonra Ang II (100 nM) ortama ilave edilerek 48 saat inkübe edildi. Ayrıca Glo1 aktivitesinin Ang II ile azaldığı belirlendikten sonra Ang II'nin bu etkiyi nasıl oluşturduğunu belirlemek amacıyla Ang II ile uyarıldığı bilinen NF- $\kappa$ B, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK sinyal yolaklarının Glo1 aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemeyi amaçladık. Bu doğrultuda yüksek glukoz ortamında bir gece serumsuz medyumla inkübasyona bırakılan hücrelere, Ang II uyarımı öncesinde, NF- $\kappa$ B'nin nükleer translokasyonunu baskılayan NF- $\kappa$ B inhibitörü JSH23 (20  $\mu$ M), p38 MAPK

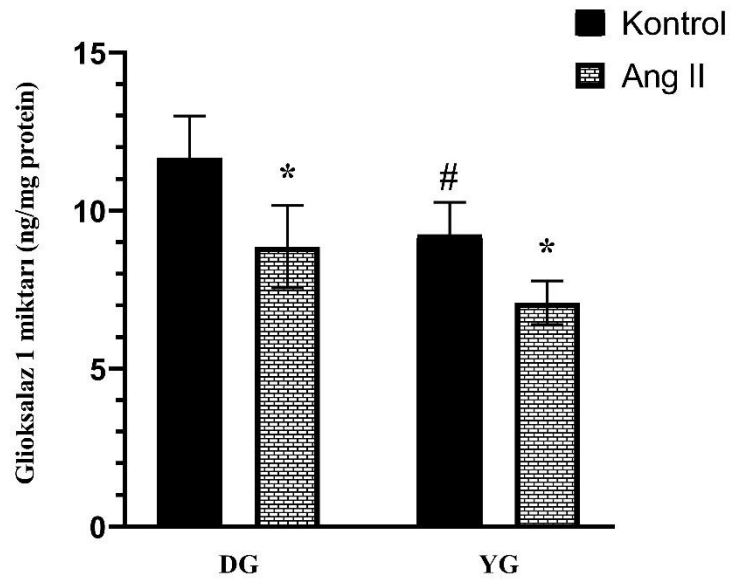
inhibitörü SB203580 (10  $\mu$ M) ve ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 (20  $\mu$ M) inhibitörü uygulandı ve 30 dk sonra Ang II (100 nM) ortama eklenerek 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnhibitörlerin çözülmesinde DMSO kullanıldığı için sadece DMSO (%0,2 v/v) uygulanan hücrelerdeki Glo1 aktivite değişimi de izlendi. AT1R blokörleri olan telmisartan ve irbesartanın, Ang II'nin neden olduğu Glo1 aktivitesindeki azalmayı düzelttiği gözlenirken, telmisartan uygulanan grupta anlamlı fark saptanırken ( $p<0,05$ ), irbesartan grubundaki fark anlamlı değildir ( $p>0,05$ ). Ang II uyarımlı Glo1 aktivite düşüşünde bir etkisi gözlenmedi. NF- $\kappa$ B inhibitörü JSH-23 ve p38 MAPK inhibitörü SB203580 uygulanan grupta Glo1 aktivitesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 uygulanan grupta Glo1 aktivitesinin, Ang II grubuna göre yaklaşık 2 kat düştüğü tespit edildi ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 enzim aktivitesine etkisi. Hücrelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II 48 saat süre ile yüksek glukoz ortamında uygulandı. Yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 aktivitesini baskıladığı, AT1R blokörü telmisartan ve irbesartanın bu etkiyi ortadan kaldırdığı görüldü. ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059'un Ang II'nin yol açtığı Glo1 aktivitesindeki düşüşü Ang II uygulanan hücrelere kıyasla çok daha fazla düşürdüğü belirlendi. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=3, \*:kontrolle karşı, #: Ang II'ye karşı,  $p<0,05$ .

## 4.2. Anjiyotensin II ve Yüksek Glukoz Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Glioksalaz 1 Enzim Miktarını Azaltır

Düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II (100 nM) ile 48 saat inkübe edilen VDKH'nde Glo1 enzim miktarı ölçüldü. Kontrol grubuna kıyasla Ang II'nin düşük glukoz ve yüksek glukoz ortamında Glo1 enzim miktarını yaklaşık %24 düşürdüğü gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Ayrıca düşük glukoz kontrol grubuna kıyasla yüksek glukoz kontrol grubunda Glo1 enzim miktarının yaklaşık %20 düştüğü tespit edildi ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.4).

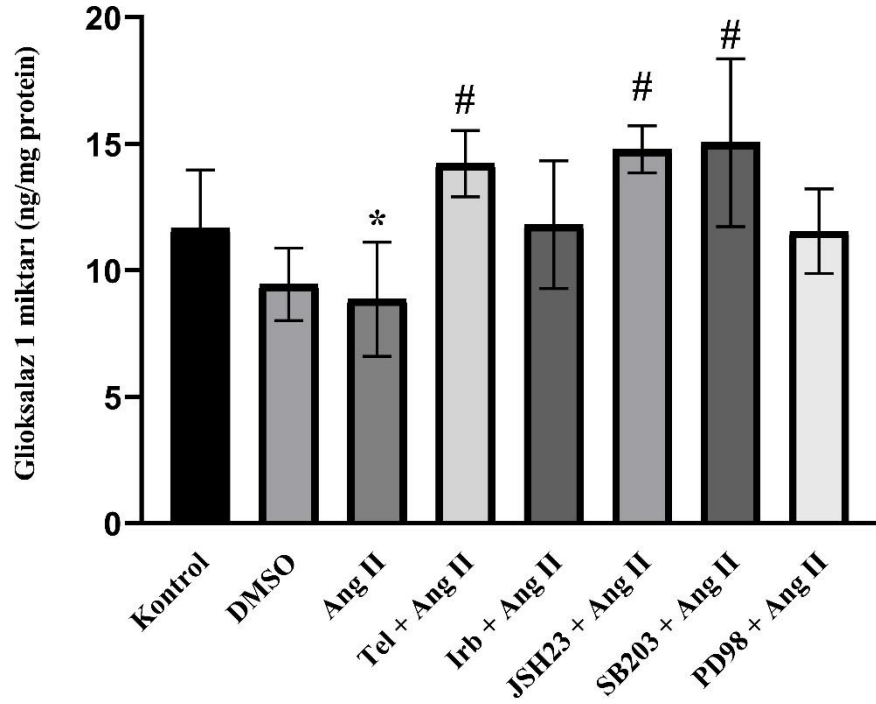


**Şekil 4.4.** VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 enzim miktarına etkisi. Hücrelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II 48 saat süre ile düşük ve yüksek glukoz ortamında uygulandı. Düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 enzim miktarını azalttığı görüldü. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. DG: düşük glukoz, YG: yüksek glukoz,  $n=3$ , \*: kendi kontrolüne karşı, #: düşük glukoz kontrole karşı,  $p<0,05$ .

### 4.2.1. Düşük Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF- $\kappa$ B, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının Glioksalaz 1 Enzim Miktarına Etkisi

Düşük glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 miktarını azalttığı belirlendikten sonra AT1R blokörleri olan telmisartan ve irbesartanın Ang II'nin neden olduğu Glo1 enzim miktarındaki azalmayı tersine çevirdiği gözlenirken, telmisartandaki fark anlamlı saptanırken ( $p<0,05$ ), irbesartanın etkisi anlamlı bulunamadı. Enzim miktarını artırma bakımından telmisartan ve irbesartan arasında anlamlı bir fark olmasa da telmisartanın daha etkili olduğu gözlemlendi. Glo1 enzim miktarının NF- $\kappa$ B inhibitörü JSH-23 ve p38 MAPK inhibitörü SB203580 uygulanan grupta, Ang II uygulanan gruba göre 2 kata yakın arttığı gözlemlendi ( $p<0,05$ ). ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 uygulanan grupta

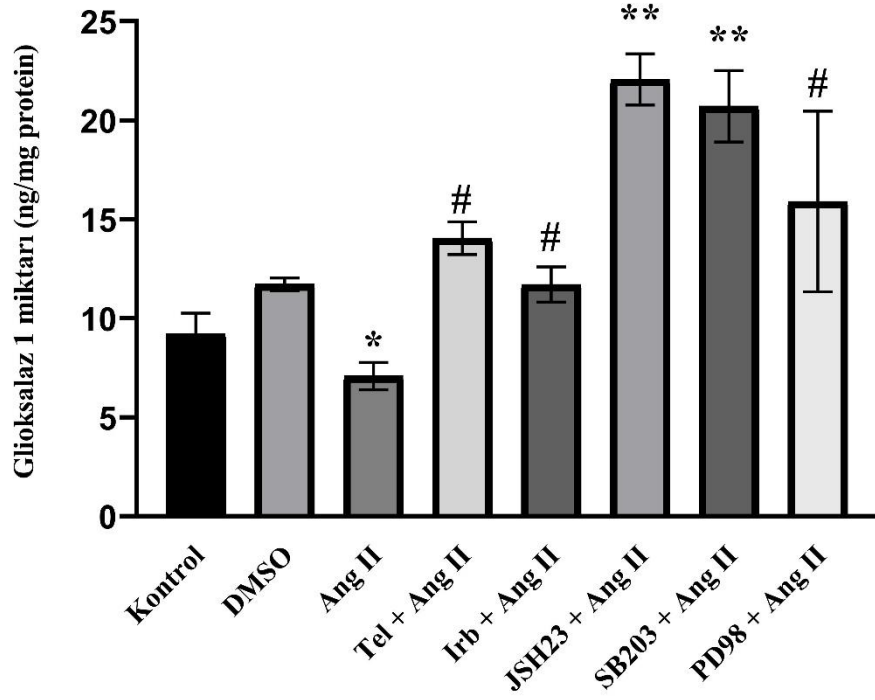
Glo1 enzim miktarının arttığı görülmesine karşın bu fark anlamlı bulunamadı (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** VDKH'nde düşük glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 enzim miktarına etkisi. Hücelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II 48 saat süre ile düşük glukoz ortamında uygulandı. Düşük glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 enzim miktarını azalttığı, bu azalmanın telmisartan ve irbesartan varlığında restore olduğu görüldü. Ayrıca JSH23 ve SB203580 varlığında da Ang II'nin azalttığı Glo1 enzim miktarının arttığı belirlendi. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=3, \*: kontrole karşı, #: Ang II'ye karşı, p<0,05.

#### 4.2.2. Yüksek Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF- $\kappa$ B, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının Gliksalaz 1 Enzim Miktarına Etkisi

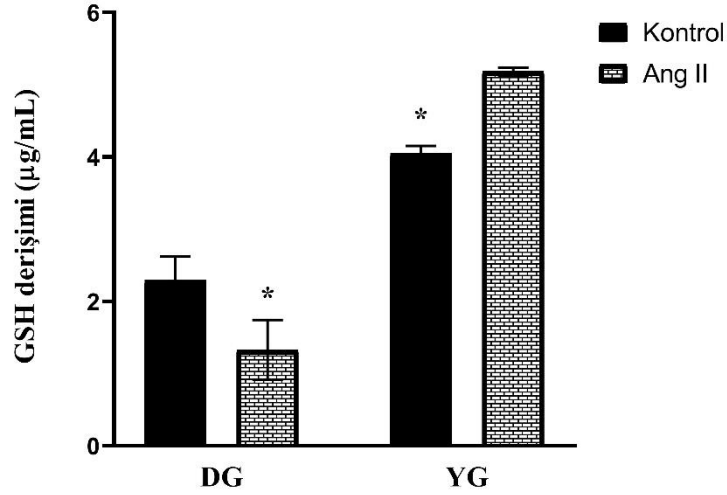
AT1R blokörleri telmisartan ve irbesartanın Ang II'nin düşürdüğü Glo1 enzim miktarını tekrar yükselttiği gözlenirken (p<0,05), aralarında anlamlı fark olmasa da düşük glukoz grubunda olduğu gibi telmisartanın daha etkili olduğu gözlemlendi. NF- $\kappa$ B inhibitörü JSH-23 ve p38 MAPK inhibitörü SB203580 uygulanan grupta Glo1 enzim miktarının Ang II grubuna göre kıyasla yaklaşık 3 kat arttığı gözlemlendi (p<0,001). Ayrıca ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 uygulanan grupta Glo1 enzim miktarının, Ang II grubuna göre yaklaşık 2 kat arttığı tespit edildi (p<0,05) (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 enzim miktarına etkisi. Hürelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II 48 saat süre ile yüksek glukoz ortamında uygulandı. Yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 enzim miktarını azalttığı, bu azalmanın telmisartan ve irbesartan varlığında restore olduğu görüldü. Ayrıca JSH23, SB203580 ve PD98059 varlığında da Ang II'nin azalttığı Glo1 enzim miktarının arttığı belirlendi. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=3, \*: kontrole karşı, #: Ang II'ye karşı, p<0,05.

#### 4.3. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Anjiyotensin II GSH Derişimini Azaltır

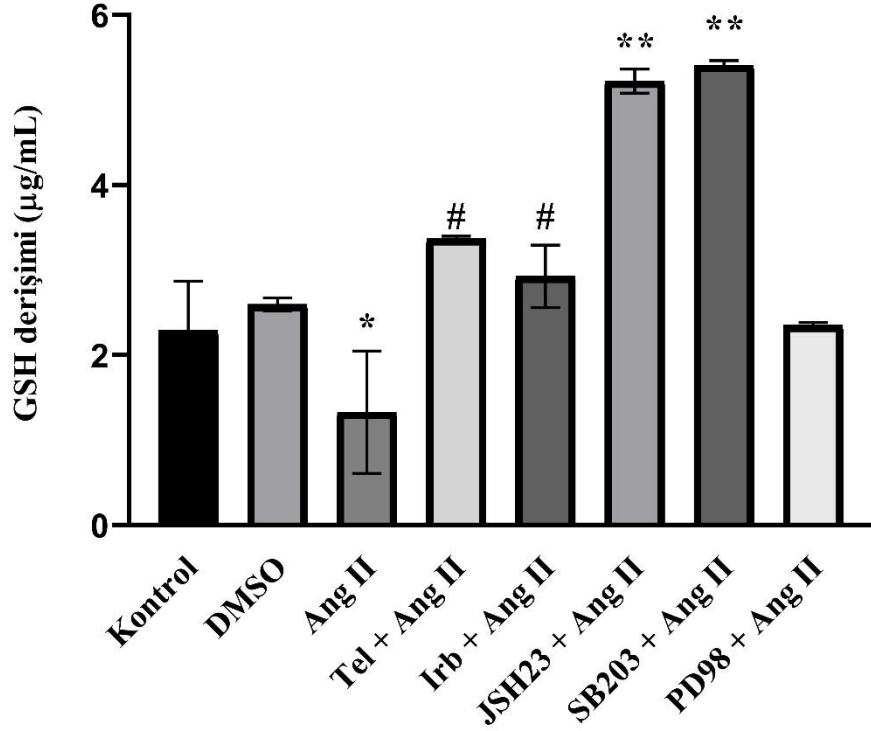
Düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II (100 nM) ile 48 saat inkübe edilen vasküler düz kas hücrelerinde GSH derişimi ölçüldü. Düşük glukoz ortamında kontrol grubuna kıyasla Ang II'nin GSH derişimini yaklaşık %42 düşürdüğü gözlemlendi (p<0,05). Ayrıca yüksek glukoz kontrol grubunda düşük glukoz kontrol grubuna kıyasla GSH derişiminin yaklaşık %78 arttığı belirlendi (p<0,05) (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin GSH derişimine etkisi. Hücrelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II 48 saat süre ile düşük ve yüksek glukoz ortamında uygulandı. Düşük glukoz ortamında Ang II'nin GSH derişimini düşürdüğü görüldü. Ayrıca yüksek glukozun GSH derişimini artırdığı belirlendi. Veriler  $\bar{X} \pm SD$  olarak ifade edildi. DG: düşük glukoz, YG: yüksek glukoz, n=3, \*:düşük glukoz kontrole karşı p<0,05.

#### **4.3.1. Düşük Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının GSH Derişimine Etkisi**

Ang II'nin GSH derişimini azaltmasında AT1R rolünü belirlemek amacıyla düşük glukoz ortamındaki hücrelere Ang II uygulaması öncesinde AT1R blokörleri olan telmisartan ve irbesartan uygulandı. Telmisartan ve irbesartanın Ang II'nin neden olduğu GSH derişimindeki azalmayı artırdığı gözlemlendi (p<0,05). GSH derişiminin NF-κB inhibitörü JSH-23 ve p38 MAPK inhibitörü SB203580 uygulanan grupta, Ang II uygulanan gruba göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi (p<0,001). ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 uygulanan grupta GSH derişiminin arttığı görülmesine karşın bu fark anlamlı bulunamadı (Şekil 4.8).

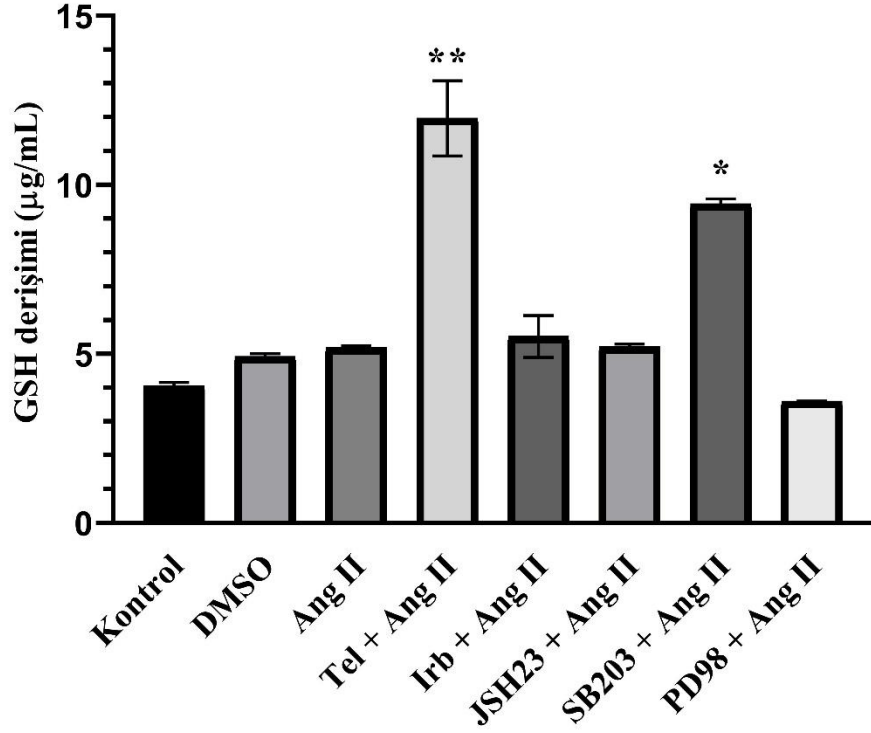


**Şekil 4.8.** VDKH'nde düşük glukoz ortamında Ang II'nin GSH derişimine etkisi. Hücelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II 48 saat süre ile düşük glukoz ortamında uygulandı. Düşük glukoz ortamında Ang II'nin GSH derişimini düşürdüğü görüldü. Bu düşüşün telmisartan ve irbesartan varlığında ortadan kalktığı belirlendi. Ayrıca JSH23 ve SB203508 varlığında da Ang II'nin yol açtığı GSH'daki düşüşün gerçekleşmediği gözlemlendi. Veriler  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=3, \*: kontrole karşı ve #: Ang II'ye karşı  $p < 0,05$ ; \*\*: Ang II'ye karşı  $p < 0,001$ .

#### 4.3.2. Yüksek Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF- $\kappa$ B, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının GSH Derişimine Etkisi

Yüksek glukoz ortamında Ang II'nin GSH derişimine etkisi belirlenemedi. Fakat Ang II uygulaması öncesi telmisartan verilen grupta Ang II grubuna kıyasla GSH düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0,001$ ). Bununla beraber p38 MAPK inhibitörü SB203580 uygulanan grupta, Ang II uygulanan gruba göre anlamlı derecede GSH artışı gözlemlendi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.9).

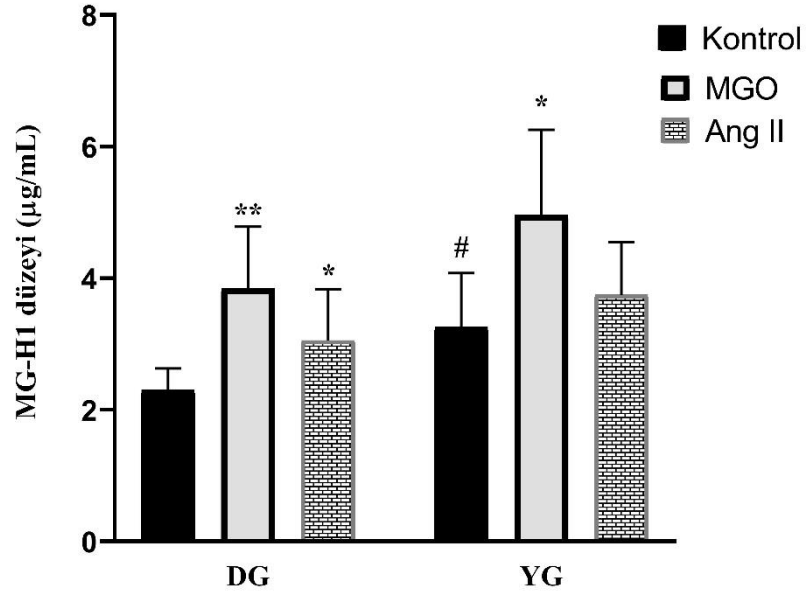




**Şekil 4.9.** VDKH’nde yüksek glukoz ortamında Ang II’nin GSH derişimine etkisi. Hücelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II 48 saat süre ile yüksek glukoz ortamında uygulandı. Yüksek glukoz ortamında Ang II’nin GSH derişimini düşürdüğü görüldü. Bu düşüşün telmisartan ve irbesartan varlığında ortadan kalktığı belirlendi. Ayrıca JSH23 ve SB203508 varlığında da Ang II’nin yol açtığı GSH’daki düşüşün gerçekleşmediği gözlemlendi. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=3, \*: Ang II’ye karşı  $p < 0,05$ ; \*\*: Ang II’ye karşı  $p < 0,001$ .

#### 4.4. Anjiyotensin II ve Yüksek Glukoz Vasküler Düz Kas Hücrelerinde MG-H1 Düzeyini Artırır

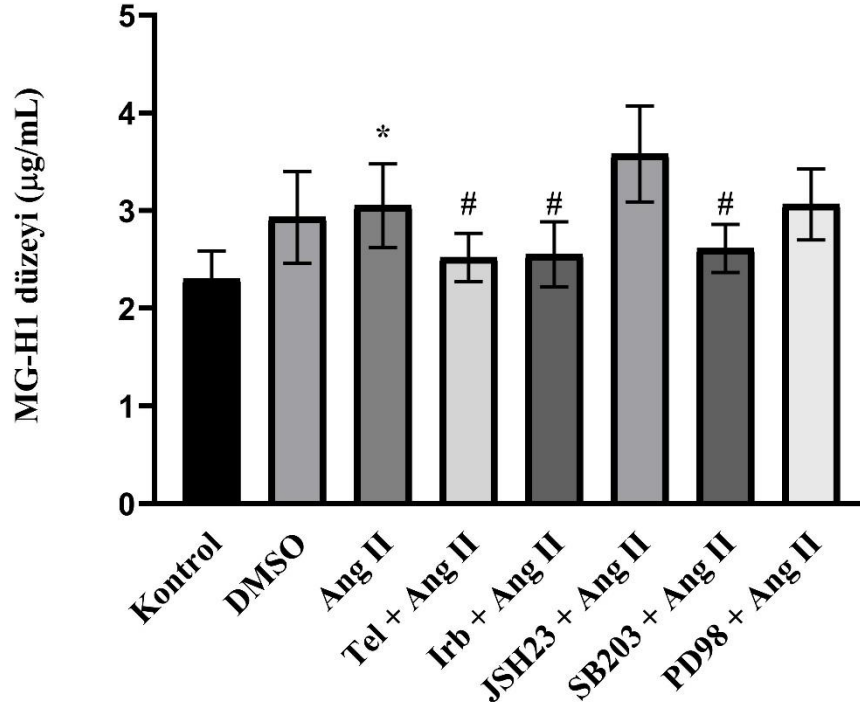
Düşük ve yüksek glukoz ortamındaki vasküler düz kas hücreleri Ang II (100 nM) ile 48 saat inkübe edilerek MGO’nun oluşturduğu hücre sel ana ürünlerden biri olan Metilglioksal-Hidroimidazolun 1 (MG-H1) ölçüldü. Ayrıca yine düşük ve yüksek glukoz ortamındaki hücelere MGO uygulanarak (200 µM, 48 saat) pozitif kontrol olarak kullanıldı. MGO uygulanmasının düşük ve yüksek glukoz grubunda MG-H1 oluşumunu artırdığı (sırasıyla yaklaşık %67,  $p < 0,001$  ve yaklaşık %52,  $p < 0,05$ ) gözlemlendi. Yüksek glukozun da tek başına MG-H1 düzeyini anlamlı şekilde %42 artırdığı görüldü ( $p < 0,05$ ). Ang II’nin ise düşük glukozda MG-H1 düzeyini anlamlı olarak %32,6 artırdığı, yüksek glukoz ortamında ise artmış olan MG-H1 düzeyini daha fazla artıramadığı görüldü (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin MG-H1 düzeyine etkisi. Hücrelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II, 48 saat süre ile düşük ve yüksek glukoz ortamında uygulandı. Ayrıca pozitif kontrol olarak hücrelere 200 µM MGO, 48 saat süre ile düşük ve yüksek glukoz ortamında uygulandı. Düşük ve yüksek glukoz grubunda MGO'nun MG-H1 düzeyini artırdığı belirlendi. Düşük glukoz ortamında Ang II'nin ve ayrıca tek başına yüksek glukozun MG-H1 düzeyini artırdığı görüldü. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. DG: düşük glukoz, YG: yüksek glukoz, MGO: metilgliksal, n=5, \*:kendi kontrolüne karşı p<0,05; \*\*: düşük glukoz kontrole karşı p<0,001, #: düşük glukoz kontrole karşı.

#### 4.4.1. Düşük Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının MG-H1 Düzeyine Etkisi

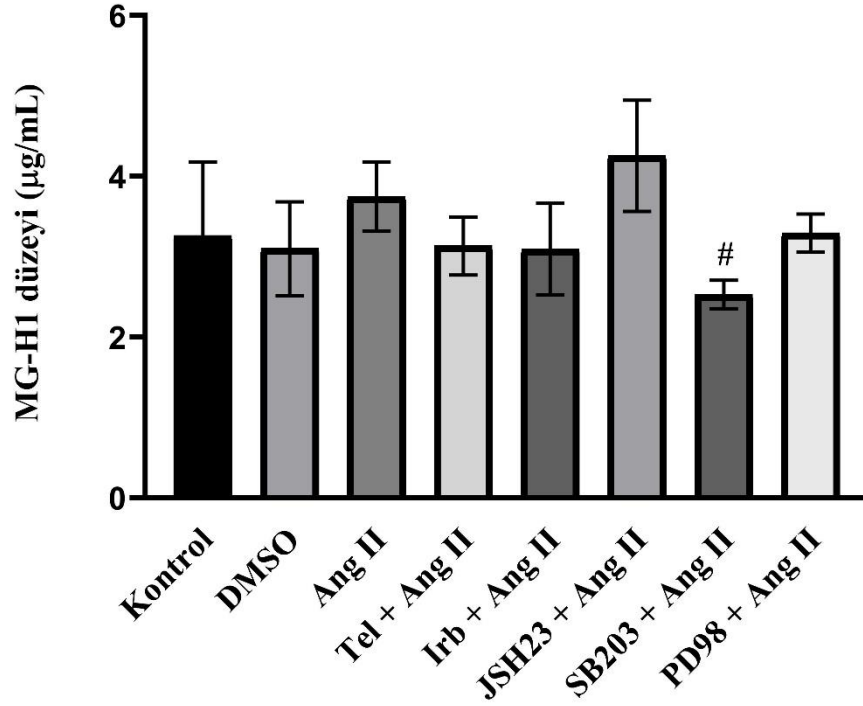
AT1R blokörleri olan telmisartan ve irbesartanın Ang II'nin neden olduğu MG-H1 düzeyindeki artışı baskıladığı gözlemlendi (p<0,05). MG-H1 düzeyinin NF-κB inhibitörü JSH-23 varlığından etkilenmediği, p38 MAPK inhibitörü SB203580 uygulanan grupta ise Ang II uygulanan gruba göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (p<0,05). ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 uygulanan grupta MG-H1 düzeyinin, Ang II uygulanan gruba göre anlamlı derecede değişmediği saptandı (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** VDKH'nde düşük glukoz ortamında Ang II'nin MG-H1 düzeyine etkisi. Hücrelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II, 48 saat süre ile düşük glukoz ortamında uygulandı. Düşük glukoz ortamında Ang II'nin MG-H1 düzeyini artırdığı, bu artışın telmisartan, irbesartan ve SB203580 varlığında azaldığı görüldü. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=5, \*: kontrole karşı, #: Ang II'ye karşı p<0,05.

#### 4.4.2. Yüksek Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının MG-H1 Düzeyine Etkisi

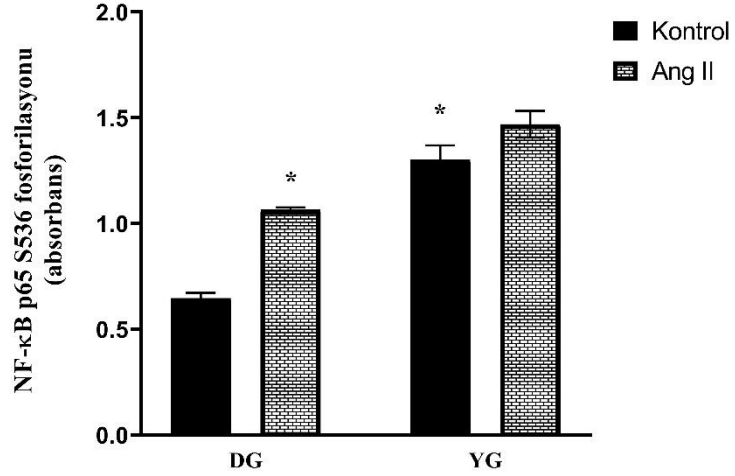
Anjiyotensin II'nin yüksek glukoz ortamındaki MG-H1 düzeyine etkisindeki Ang II Tip 1 Reseptörün (AT1R) rolünü belirlemek amacıyla Ang II uyarımı öncesinde hücrelere AT1R blokörleri olan telmisartan ve irbesartan uygulanmasının Ang II'nin neden olduğu anlamlı olmayan MG-H1 düzeyindeki artışı yine anlamlı olmayan şekilde kısmen baskıladığı gözlemlendi (p>0,05). Düşük glukoz grubuna benzer şekilde MG-H1 düzeyinin, NF-κB inhibitörü JSH-23 varlığından etkilenmediği, p38 MAPK inhibitörü SB203580 uygulanan grupta ise Ang II uygulanan gruba göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (p<0,05). ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 uygulanan grupta MG-H1 düzeyinin, Ang II uygulanan gruba göre anlamlı derecede değişmediği saptandı (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin MG-H1 düzeyine etkisi. Hücelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II, 48 saat süre ile yüksek glukoz ortamında uygulandı. Yüksek glukoz ortamında Ang II'nin MG-H1 düzeyine bir etkisinin olmadığı, SB203580 varlığında ise MG-H1 düzeyinin kontrol seviyesinin de altına düştüğü görüldü. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=5, \*: kontrole karşı, #: Ang II'ye karşı p<0,05.

#### 4.5. Anjiyotensin II ve Yüksek Glukoz Vasküler Düz Kas Hücrelerinde NF-κB p65 Alt Ünitesinde Serin 536 Fosforilasyonunu Artırır

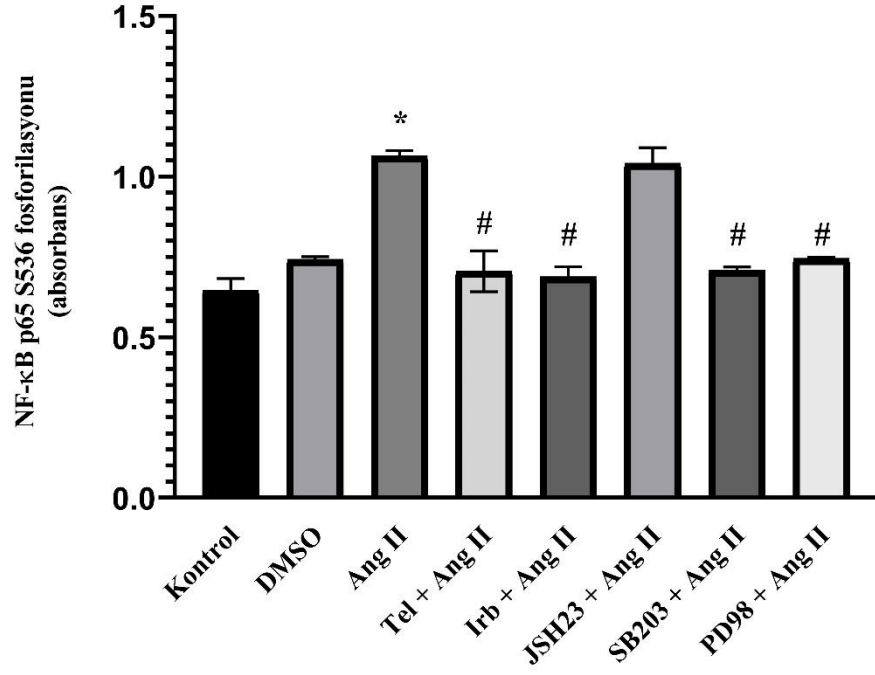
Düşük ve yüksek glukoz ortamındaki vasküler düz kas hücreleri Ang II (100 nM) ile 48 saat inkübe edilerek NF-κB proteini p65 alt ünitesine ait 536 no'lu serin amino asidi fosforilasyonu ölçüldü. Ang II'nin düşük glukozda NF-κB p65 S536 fosforilasyonunu yaklaşık %66 artırdığı gözlemlendi (p<0,05). Yüksek glukozun tek başına NF-κB p65 S536 fosforilasyonunu yaklaşık 2 kat artırdığı gözlenirken (p<0,05), yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 S536 fosforilasyonunu etkilemediği görüldü (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 S536 fosforilasyon düzeyine etkisi. Hücelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II, 48 saat süre ile düşük ve yüksek glukoz ortamında uygulandı. Düşük glukoz ortamında Ang II'nin ve ayrıca tek başına yüksek glukozun NF-κB p65 S536 fosforilasyon düzeyini artırdığı görüldü. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. DG: düşük glukoz, YG: yüksek glukoz, n=3, \*:düşük glukoz kontrole karşı p<0,05.

#### **4.5.1. Düşük Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının NF-κB p65 S536 Fosforilasyonuna Etkisi**

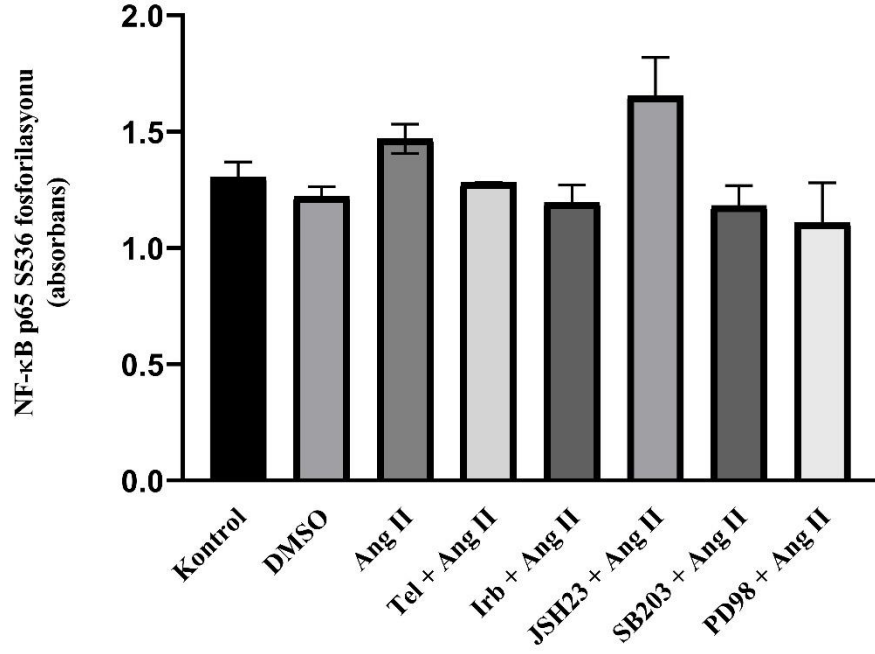
AT1R blokörleri olan telmisartan ve irbesartanın Ang II'nin neden olduğu NF-κB p65 S536 fosforilasyon düzeyindeki artışı kontrol düzeyine baskıladığı gözlemlendi (p<0,05). NF-κB p65 S536 fosforilasyon düzeyinin NF-κB inhibitörü JSH-23 varlığından etkilenmediği, p38 MAPK inhibitörü SB203580 ve ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 uygulanan grupta ise Ang II uygulanan gruba göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (p<0,05) (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** VDKH’nde düşük glukoz ortamında Ang II’nin NF-κB p65 S536 fosforilasyon düzeyine etkisi. Hücrelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II, 48 saat süre ile düşük glukoz ortamında uygulandı. Düşük glukoz ortamında Ang II’nin artırdığı NF-κB p65 S536 fosforilasyon düzeyinin telmisartan, irbesartan, SB203580 ve PD98059 varlığında azaldığı görüldü. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=3, \*:kontrolle karşı, #: Ang II’ye karşı p<0,05.

#### **4.5.2. Yüksek Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının NF-κB p65 S536 Fosforilasyonuna Etkisi**

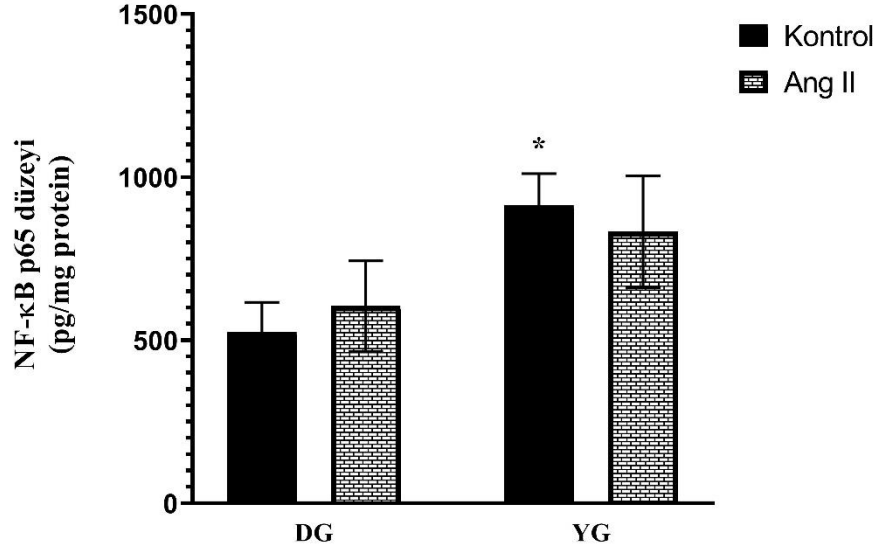
Ang II’nin NF-κB p65 S536 fosforilasyon düzeyine etkisinde AT1R ve NF-κB, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK sinyal yolaklarının etkisini incelediğimizde AT1R ve bahsi geçen sinyal yollarının herhangi bir etkisine rastlanmadı (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 S536 fosforilasyon düzeyine etkisi. Hücrelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II, 48 saat süre ile yüksek glukoz ortamında uygulandı. Yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 S536 fosforilasyon düzeyine etkisinin olmadığı belirlendi. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=3.

#### **4.6. Yüksek Glukoz Vasküler Düz Kas Hücrelerinde NF-κB p65 Seviyesini Artırır**

Düşük ve yüksek glukoz ortamındaki VDKH Ang II (100 nM) ile 48 saat inkübe edilerek NF-κB proteini p65 alt ünitesinin seviyesi ölçüldü. Ang II'nin düşük ve yüksek glukozda NF-κB p65 seviyesini anlamlı olarak etkilemediği gözlemlendi. Yüksek glukozun ise tek başına NF-κB p65 seviyesini yaklaşık %74 artırdığı gözlemlendi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.16).

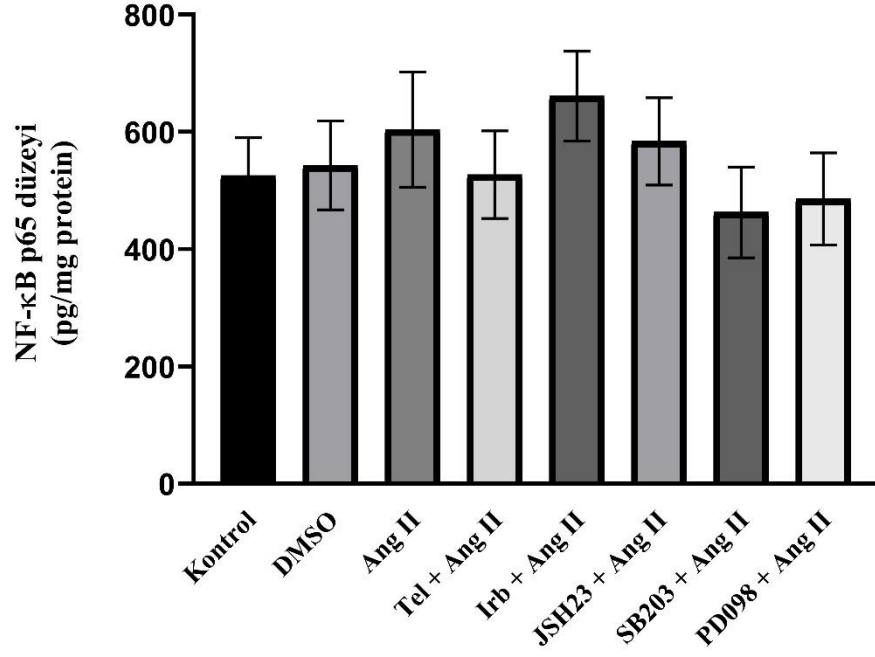


**Şekil 4.16.** VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 düzeyine etkisi. Hücrelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II, 48 saat süre ile düşük ve yüksek glukoz ortamında uygulandı. Düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 düzeyine etkisi görülmedi. Yüksek glukozun ise NF-κB p65 düzeyini artırdığı görüldü. Veriler  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  olarak ifade edildi. DG: düşük glukoz, YG: yüksek glukoz, n=3, \*:düşük glukoz kontrole karşı p<0,05.

#### **4.6.1. Anjiyotensin II Düşük Glukoz Ortamında Vasküler Düz Kas Hücrelerinde NF-κB p65 Seviyesini Etkilemez**

Düşük glukoz ortamında Anjiyotensin II'nin NF-κB p65 seviyesine anlamlı bir katkısı gözlenmese de Ang II uyarımlı sinyal yollarının ve AT1R'nin NF-κB p65 seviyesine etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla düşük glukoz ortamındaki hücrelere Ang II uygulaması öncesinde AT1R blokörleri olan telmisartan ve irbesartan uygulaması yapıldı. Telmisartan ve irbesartanın herhangi bir etkisi belirlenemedi. Ayrıca NF-κB, p38 ve ERK1/2 MAPK yollarının da etkisi saptanamadı (Şekil 4.17).

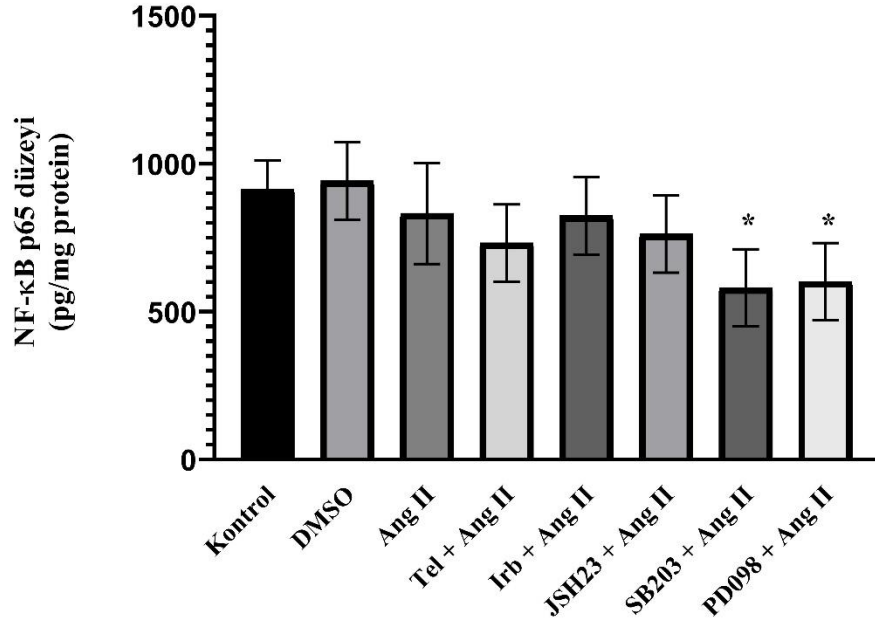




**Şekil 4.17.** VDKH’nde düşük glukoz ortamında Ang II’nin NF-κB p65 düzeyine etkisi. Hücelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II, 48 saat süre ile düşük glukoz ortamında uygulandı. Düşük glukoz ortamında Ang II’nin NF-κB p65 düzeyine anlamlı etkisi görülmedi. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=3.

#### **4.6.2. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Yüksek Glukoz Ortamında NF-κB p65 Seviyesini Artışında p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Rol Alır**

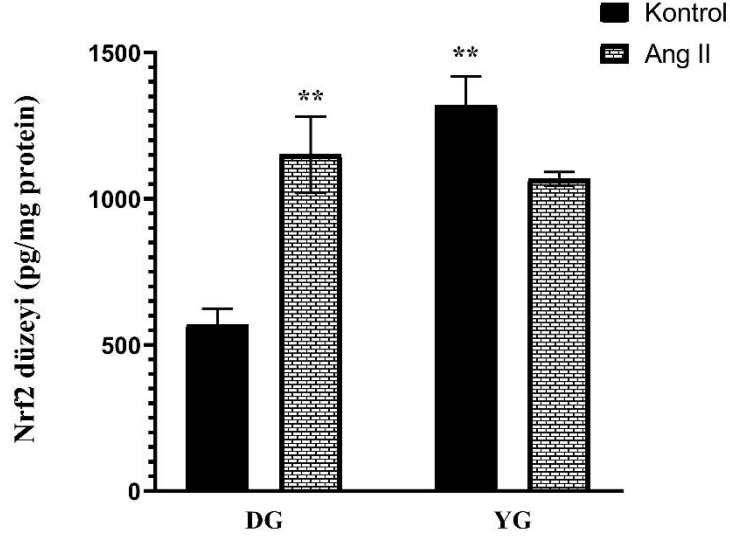
AT1R blokörü olan telmisartanın düşük glukoz ortamında inkübe edilen hücrelerde görüldüğü gibi NF-κB p65 seviyesini bir miktar azalttığı ( $p>0,05$ ), irbesartanın ise böyle bir etki oluşturmadığı gözlemlendi. Ayrıca NF-κB p65 seviyesinin p38 MAPK inhibitörü SB203580 ve ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 uygulanan grupta, kontrol seviyesine kıyasla yaklaşık %35’lik bir azalma tespit edildi ( $p<0,05$ ; Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 düzeyine etkisi. Hücelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II, 48 saat süre ile yüksek glukoz ortamında uygulandı. Yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 düzeyine anlamlı etkisi görülmezken, SB203580 ve PD98059 varlığında NF-κB p65 düzeyinin düştüğü belirlendi. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=3, \*: Ang II'ye karşı p<0,05.

#### 4.7. Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Anjiyotensin II ve Yüksek Glukoz Nrf2 Düzeyini Artırır

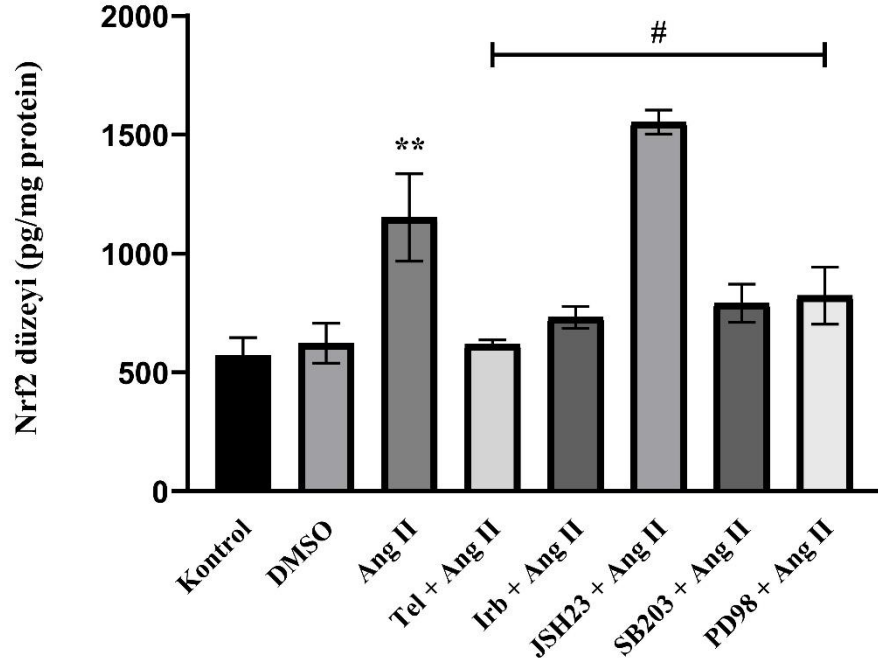
Düşük glukoz ortamında Ang II (100 nM) ile 48 saat inkübe edilen vasküler düz kas hücrelerinde herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubuna kıyasla Nrf2 düzeyinin yaklaşık 2 kat arttığı gözlemlendi ( $p < 0,001$ ). Ayrıca yüksek glukoz kontrol grubunda düşük glukoz kontrol grubuna kıyasla Nrf2 düzeyinin yaklaşık 2,3 kat arttığı belirlendi ( $p < 0,001$ ). Yüksek glukoz uygulanan hücrelerin grup içi karşılaştırılmasında ise Ang II'nin yüksek glukoz kontrol grubuna kıyasla Nrf2 düzeyi üzerinde bir etkisi olmadığı görüldü (Şekil 4.19).



**Şekil 4.19.** VDKH’nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II’nin Nrf2 düzeyine etkisi. Hücelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II, 48 saat süre ile düşük ve yüksek glukoz ortamında uygulandı. Düşük glukoz ortamında Ang II’nin ve ayrıca tek başına yüksek glukozun Nrf2 düzeyini artırdığı görüldü. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. DG: düşük glukoz, YG: yüksek glukoz, n=3, \*\*: düşük glukoz kontrole karşı  $p<0,001$ .

#### **4.7.1. Düşük Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF- $\kappa$ B, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının Nrf2 Düzeyine Etkisi**

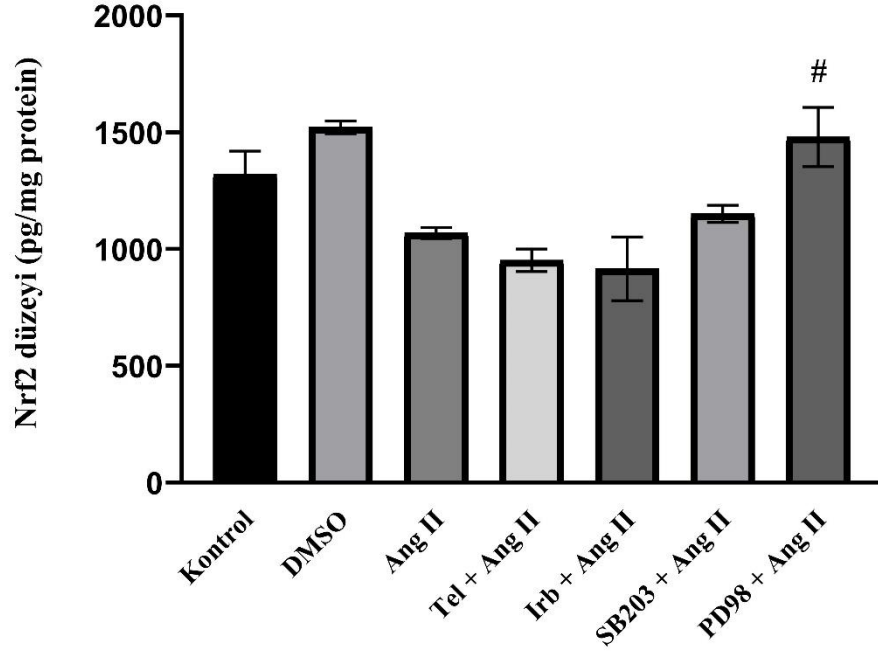
AT1R blokörleri olan telmisartan ve irbesartanın Ang II’nin neden olduğu Nrf2 düzeyindeki artışı baskıladığı gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Nrf2 düzeyindeki artışın p38 MAPK inhibitörü SB203580 ve ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 uygulanan grupta, Ang II uygulanan gruba göre anlamlı derecede azaldığı görülürken ( $p<0,05$ ), NF- $\kappa$ B inhibitörü JSH-23 uygulanan grupta ise Nrf2 düzeyinin Ang II grubuna göre anlamlı derecede arttığı belirlendi ( $p<0,05$ ; Şekil 4.20).



**Şekil 4.20.** VDKH’nde düşük glukoz ortamında Ang II’nin Nrf2 düzeyine etkisi. Hücrelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II, 48 saat süre ile düşük glukoz ortamında uygulandı. Düşük glukoz ortamında Ang II’nin Nrf2 düzeyini artırdığı, bu artışın telmisartan, irbesartan, SB203580 ve PD98059 varlığında ortadan kalktığı görüldü. JSH23 varlığında Ang II uyarımlı Nrf2 artışının daha fazla arttığı belirlendi. Veriler  $\bar{X} \pm SEM$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=3, \*\*: düşük glukoz kontrole karşı  $p < 0,001$ ; #: Ang II’ye karşı  $p < 0,05$ .

#### 4.7.2. Yüksek Glukoz Ortamında Anjiyotensin II Uyarımlı NF- $\kappa$ B, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK Sinyal Yolaklarının Nrf2 Düzeyine Etkisi

AT1R blokörleri telmisartan ve irbesartanının yüksek glukoz ortamında inkübe edilen hücrelerde Nrf2 düzeyine bir etkisinin olmadığı ( $p > 0,05$ ) görüldü. Ayrıca Nrf2 düzeyinin ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 uygulanan grupta, Ang II uygulanan gruba kıyasla yaklaşık %38’lik bir artış sağladığı görüldü ( $p < 0,05$ ; Şekil 4.21).



**Şekil 4.21.** VDKH'nde yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Nrf2 düzeyine etkisi. Hücelere 100 nM konsantrasyondaki Ang II, 48 saat süre ile yüksek glukoz ortamında uygulandı. Yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Nrf2 düzeyini anlamlı düzeyde değiştirmedığı belirlendi. PD98059 varlığında ise Nrf2 artışının meydana geldiği belirlendi. Veriler  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  olarak ifade edildi. Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, SB203: SB203580, PD98: PD98059, n=3, #: Ang II'ye karşı  $p < 0,05$ .

## 5. TARTIŞMA

Ülkemizin de aralarında bulunduğu gelişmekte olan ve gelişmiş toplumlarda yüksek mortalite ve morbiditeye sahip hastalıkların başında hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet ilk sıralarda yer almaktadır. Yapılan projeksiyonlarda ilerleyen yıllarda bu hastalıkların ve ilişkili patolojilerin dünya genelinde prevalansının artacağı ve daha ciddi boyutlara ulaşacağı öngörülmektedir (IDF, 2017; WHO, 2018). Hipertansiyon ve diyabetle ilişkili vaskülopatilerin kesişim noktasında bulunan öğelerden biri de damar yapısında meydana gelen yapısal ve fonksiyonel değişikliklerdir. Damar yapısında bulunan ve vasküler patolojilere aktif katkı sunan hücresel elemanların en önemlilerinden birisi vasküler düz kas hücreleridir ki, bu sebeple uzun yıllardır araştırma konusu olmuştur. VDKH'nde aktive ettiği sinyal yolları üzerinden bu hücrelerin proliferasyon, migrasyon, kontraktilite ve apoptozis gibi süreçlerine katkı sağlayan en önemli etkenler arasında Ang II ve hiperglisemi yer almaktadır. Ang II, RAS'ın efektör peptididir ve ana görevi olan vazokonstriksiyon ve kan basıncının düzenlenmesinden bağımsız olarak inflamasyon, endotel disfonksiyonu, ateroskleroz, hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliğinde rol alır (Mehta ve Griendling, 2007; Libby ve ark., 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterildiği üzere hipergliseminin yol açtığı dikarbonil stresi ve artan MGO düzeyi, VDKH'nin patolojik süreçlere katkısında önemli rol oynar. Hiperglisemi durumunda artan glikolitik aktivite sonucunda, glikoliz yan ürünü olarak ortaya çıkan MGO düzeyi yükselmekte ve insülin rezistansı, hipertansiyon, ateroskleroz ve diyabetik mikro komplikasyonlara katkıda bulunmaktadır. MGO detoksifikasyonu sağlayan glioksalaz sistemi bileşenlerinden Glo1 enzimi aktivitesi ve ekspresyonunda azalma da yine artmış MGO düzeylerine yol açmaktadır (Nigro ve ark., 2017).

MGO'nun RAS sistemine etkisini inceleyen Dhar ve ark.'nın çalışmasında fruktozla 16 hafta boyunca beslenen Sprague Dawley sıçanlarda, artmış kan basıncıyla beraber MGO derişimi ve RAS bileşenlerinin düzeylerinde artış saptanmıştır. Bu sıçanların aortasında Ang II ve AT1R ekspresyonunun mRNA ve protein seviyesinde yaklaşık 2 kat, böbrekte ise yaklaşık 1,5 kat arttığı bu çalışmada bildirilmiştir (Dhar ve ark., 2013). Aynı araştırma grubunun bir diğer çalışmasında ise erkek Sprague Dawley sıçanlara 4 hafta boyunca mini pompa yardımıyla sürekli MGO infüzyonu yapıldığında ilk bahsettiğimiz çalışmalarındaki bulgulara oldukça benzer bulgulara

ulaştıklarını bildirmişlerdir. Sıçanlara MGO infüzyonu aortada ve VDKH'nde MGO düzeyi, kan basıncı, plazma katekolaminlerinde (norepinefrin, epinefrin ve dopamin), plazma anjiyotensin, renin ve aldosteron konsantrasyon artışı ile sonuçlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada sıçan torasik aorta düz kas hücre hattı (primer olmayan A10 hücre hattı) ile yapılan deneylerde 24 saat MGO uygulamasının (30 µM) veya yüksek glukozun VDKH'nde AT1R ekspresyonu, anjiyotensinler (total olarak I, II ve III), anjiyotensinojen ve  $\alpha_{1D}$  reseptör ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Dhar ve ark., 2014). MGO'nun hipertansiyon gelişimine katkı yaptığını söyleyen pek çok yayın olsa da mekanizma kesin olarak aydınlatılmış değildir. Sorumlu mekanizmalardan biri Vasdev ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada bildirildiği üzere MGO'nun vasküler  $Ca^{2+}$  kanallarına bağlanmak suretiyle intraselüler sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu yükseltmek olabilir (Vasdev ve ark., 1998). MGO uyarımlı hipertansiyonda bir diğer olası mekanizmanın ise oksidatif stres olabileceği Wang ve ark.'nın yaptığı çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmalarda normotansif WKY sıçanlara kıyasla spontan hipertansif sıçanlarda artmış oksidatif stres ve AGE ile birlikte artmış MGO düzeyleri paralel bulunmuştur. Dolayısıyla artmış MGO seviyesi artmış ROS ve AGE oluşumuna yol açabilmekte ve hipertansiyon gelişimine neden olabilmektedir. Artmış ROS düzeyleri, tamamı hipertansiyon gelişimine katkıda bulunan endotel disfonksiyonu, VDKH hipertrofisi ve hiperplazisi gibi yapısal ve fonksiyonel değişikliklere açabilir (Wang ve ark., 2004; Wang ve ark., 2005). Diğer taraftan Vasdev ve ark.'nın çalışmasında içme suyunda %0,2-0,8 MGO verilmesi WKY sıçanlarda kan basıncını anlamlı düzeyde artırırken, Guo ve ark. ise kendi yapmış oldukları çalışmada 4 haftaya kadar %1 MGO verilen Sprague Dawley sıçanlarda kan basıncında anlamlı bir artış gözleyemediklerini bildirmişlerdir. Buna sebep etkenlerden biri olarak da Sprague Dawley sıçanlara kıyasla WKY sıçan plazmasında daha yüksek Ang II seviyesi bulunması olabileceğini belirtmişlerdir ((Vasdev ve ark., 1998; Guo ve ark., 2009).

Yapılan çalışmaları göz önüne aldığımızda hipertansiyon ve hiperglisemi/MGO ilişkisinin mevcut olduğunu söyleyebiliriz. MGO'nun RAS aktivasyonu, hipertansiyon gelişimi ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi üzerine yapılan çok sayıda çalışma olsa da Ang II'nin doğrudan MGO detoksifikasyonu yapan gliksalaz sistemi ve bileşenlerine etkisini inceleyen çalışmalar çok azdır. Bu bağlamda yaptığımız çalışmada Ang II'nin VDKH'nde Glo1 aktivitesi ve enzim düzeyini baskılayarak MGO düzeyini artırdığını, GSH düzeyini azalttığını ve beklenmedik

şekilde Nrf2 düzeyini artırmasına rağmen bu etkileri gerçekleştirdiğini belirledik. Bunun yanı sıra yüksek glukozun MGO derişimini artırdığını ve Glo1 baskılanmasında rol aldığını tespit ettik. Hem Ang II'nin hem de yüksek glukozun bu etkilerinde p38 MAPK ve NF-κB sinyal yollarının rol aldığını belirledik.

Primer kültüre edilen VDKH'nde düşük glukoz ortamında 100 nM derişimde Ang II ile 48 saat inkübasyonun Glo1 enzim aktivitesi ve düzeyinde anlamlı azalmaya neden olduğunu belirledik. Yüksek glukozun Glo1 aktivitesine anlamlı bir etkisi belirlenemezken, yüksek glukoz ortamında Ang II'nin (100 nM, 48 saat) Glo1 aktivitesi ve düzeyini düşük glukoz ortamında olduğu gibi anlamlı olarak düşürdüğünü gözlemledik (Şekil 4.1 ve 4.4). Miller ve ark. retinal vaskülopati odağında yaptıkları çalışmada, kültüre edilmiş sığır retinal endotel ve perisit hücrelerini Ang II ile uyardıklarında (100 nM, 24 saat) her iki hücre tipinde de Glo1 mRNA ve aktivitesinde anlamlı düşüş olduğunu, candesartan uygulanmasının (1 µM) bu düşüşü ortadan kaldırdığını rapor etmişlerdir. Yine aynı çalışmada RAS overekspresyonuna sahip transgenik Ren-2 sıçanlarda çalışılmış, diyabetik Ren-2 sıçanlarda retinal Glo1 aktivitesinin ve Glo1 mRNA düzeyinin diyabetik olmayan Ren-2 sıçanlara kıyasla daha düşük olduğu, candesartanın düşen Glo1 düzeyi ve aktivitesini restore ettiği belirtilmiştir (Miller ve ark., 2010). Diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının (nefropati, retinopati ve nöropati) incelendiği pre-klinik çalışmalarda böbrek, retina ve sinirde Glo1 aktivitesinin azaldığı ve MG-H1 düzeyinin arttığı ortaya konmuştur (Barati ve ark., 2007; Karachalias ve ark., 2010; Palsamy ve Subramanian, 2011; Bierhaus ve ark., 2012). Glo1 aktivitesinin düşmesi de Glo1-MGO dengesinin MGO lehine bozulması sonucu MGO düzeyinin yükselmesi ile sonuçlanmaktadır (Nigro ve ark., 2017). Glo1 aktivitesi GSH gerektirdiği için ortamdaki GSH konsantrasyonunun Glo1 aktivitesi ile ilişkili olduğu söylenmektedir (Rabbani ve ark., 2016). Dolayısıyla VDKH'nde sadece yüksek glukoz uygulamasının Glo1 aktivitesinde bir azalma olmamasını GSH düzeyi ile açıklamak mümkündür. Çünkü çalışmamızda yüksek glukoz uyguladığımız kontrol grubu hücrelerinde, düşük glukoz kontrol grubuna göre daha yüksek GSH düzeylerini belirledik. Yüksek glukoz uygulanmasında GSH düzeylerinde yaklaşık 2 kat bir artış olmasına karşın Glo1 aktivitesinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Dolayısıyla düşük glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 aktivitesini düşürmesine sebep olarak Ang II ile miktarı azalan GSH miktarı ilişkilendirilebilirse de çalışmamız sonuçlarına göre yüksek glukoz ortamında bu ilişki belirlenememiştir.



Bu sonuçlar yüksek glukoz varlığında aktive/inhibe olan diğer sinyal yollarının veya başka faktörlerin de artmayan aktivitede rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Miller ve ark. yaptıkları çalışmada AT1R blokörü olarak candesartan kullanmışlardır (Miller ve ark., 2010). AT1R blokörleri temel ortak fonksiyonları olan kan basıncını düşürme dışında beklenmedik etkiler yapabilmektedirler. Örnek olarak losartanın ürikozürik etkisi ve telmisartanın PPAR- $\gamma$  aktivitesini uyarması verilebilir (Dézsi, 2016). Bu çalışmada AT1R blokörü olarak telmisartan ve irbesartan kullanılmış ve birinin diğerine herhangi bir üstünlüğü olup olmadığının belirlenmesi de amaçlanmıştır. Düşük glukoz ortamında Ang II uygulanmadan önce telmisartan ve irbesartan verilmesinin Ang II'nin yol açtığı Glo1 aktivitesindeki düşüşü ortadan kaldırdığı görülmüş ve Glo1 aktivitesindeki artış yönünden telmisartan ve irbesartan arasında bir fark belirlenememiştir. Diğer taraftan yüksek glukoz ortamında Ang II'nin neden olduğu Glo1 aktivitesindeki düşüşü önlemede her iki inhibitörün uygulandığı grupta da Glo1 aktivitesinde bir artış görülse de irbesartan uygulanan grupta bu fark anlamlı tespit edilememiştir. Benzer bir durum düşük glukoz ortamında GSH düzeyini restore etme bakımından telmisartan ve irbesartan arasında bir farklılık olmamasına karşın, yüksek glukoz ortamında Ang II'nin GSH üzerinde bir etkisi olmasa da telmisartan varlığında artmış GSH düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.8. ve 4.9). Bu bulguyu daha önceden belirtildiği üzere telmisartanın PPAR- $\gamma$  aktivitesini uyarması ve bunun sonucunda ortamdaki yüksek glukoz varlığına bağlı oksidatif stresin azalmasıyla ilişkilendirilebiliriz (Descorbeth ve Anand-Srivastava, 2010; Polvani ve ark., 2012).

Çalışmamızda VDKH'nde Ang II uygulamasının (100 nM, 48 s) sadece Glo1 aktivitesi üzerinde değil enzimin protein düzeyinde ekspresyonunda da etkili olduğunu gözlemledik. Hem düşük hem de yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 düzeyini anlamlı olarak düşürdüğünü belirledik. Düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II, Glo1 düzeyini yaklaşık 1,3 kat düşürürken tek başına yüksek glukozun da enzim miktarını yaklaşık 1,25 kat düşürdüğünü belirledik (Şekil 4.4). Miller ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada sığır retinal endotel ve perisit hücrelerinde Ang II'nin Glo1 ekspresyonu üzerinde baskılayıcı olduğunu belirtmişler fakat bunu mRNA düzeyleri üzerinden göstermişlerdir (Miller ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda ise Ang II'nin Glo1 enzim miktarının protein seviyesinde de azalmış olduğu ortaya konmuştur. Düşük glukoz grubunda telmisartan ve irbesartan enzim düzeyini artırmış

gözükmesine karşın irbesartana bağlı artış anlamlı bulunmazken (Şekil 4.5), yüksek glukoz grubunda her iki blokör de Ang II uyarımlı Glo1 protein düzeyindeki düşüşü anlamlı şekilde düzeltmiştir (Şekil 4.6). Bu artış yönünden yüksek glukoz grubunda telmisartan ve irbesartan arasında anlamlı fark olmasa da telmisartanın Glo1 protein düzeyini bir miktar daha fazla artırdığı görülebilmektedir (1,2 kat).

Glo1 aktivitesinde ve enzim miktarındaki azalma MGO artışı ile sonuçlanmaktadır. Hücrede MGO birikimi protein glikasyonuna neden olmakta ve fizyolojik olarak en çok bulunan ve en önemli ürünlerden biri olan MG-H1 oluşumuna neden olmaktadır. Dolayısıyla MG-H1 ölçümü doğrudan MGO düzeyini yansıtmaktadır. Çalışmamızda düşük glukoz ortamında Ang II (100 nM, 48 s) uyguladığımız hücrelerde artmış MG-H1 düzeyleri belirledik. Dolayısıyla Ang II uyarımlı Glo1 aktivitesi ve enzim miktarındaki azalma MGO düzeyini artırarak MG-H1 seviyesini artırmıştır. Yüksek glukozun da tek başına MG-H1 düzeyini artırmaya yeterli olduğunu çalışmamız sonucunda belirledik. Yüksek glukoz varlığında Ang II artmış MG-H1 düzeylerini anlamlı olarak daha fazla artıramamıştır. Fakat düşük glukoz ortamında yüksek glukozun artırdığı MG-H1 seviyelerine benzer bir artış sağlamıştır. Miller ve ark.'nın çalışmasında RAS aktivasyonuna sahip Ren-2 sıçanlarla yapılan deneylerde diyabetik olmayan Ren-2 sıçanlara kıyasla diyabetik Ren-2 sıçanlarda Glo1 aktivitesi ve mRNA düzeyleri daha düşük bulunmuş, MGO glikasyonu ile oluşan MGO-AGE düzeyi ise daha yüksek saptanmıştır. Ren-2 sıçanlarla mukayese etmek için Sprague Dawley sıçanlar kullanılmış ve bu sıçanlar diyabetik ve diyabetik olmayan olarak iki gruba ayrıldığında diyabetik Sprague Dawley sıçanlarda Glo1 mRNA düzeyleri daha düşük saptanmış fakat anlamlı olmadığı belirtilmiştir. Sprague Dawley sıçanların Glo1 aktivitesi ve MG-H1 düzeyleri hakkında ise bu çalışmada herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Düşük glukoz ortamında Ang II'nin yol açtığı MG-H1 artışı telmisartan ve irbesartan varlığında azalmıştır. Aslında yüksek glukoz ortamında da Ang II az miktarda da olsa MG-H1 miktarını artırmış, telmisartan ve irbesartan bu etkiyi ortadan kaldırmış gözükse de istatistiksel olarak anlam tespit edilmemiştir. Ang II uyarımıyla gerek Glo1 aktivite ve enzim miktarı gerek MG-H1 düzeyine baktığımızda AT1R blokörleri telmisartan ve irbesartan varlığında Ang II'nin etkilerinin ortadan kalktığını görmekteyiz ki bu durum olayın AT1R aktivasyonu üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. Sonuç olarak çalışmamız kapsamında

VDKH'nde Ang II'nin Glo1 aktivite ve protein düzeyini düşürdüğünü MG-H1 ölçümlerimiz doğrulamaktadır.

Glioksalaz 1 aktivite ve ekspresyonu fizyolojik olarak yaşlanma ile birlikte azalmaktadır. Glo1 düzeyi ile yaşam süresi arasındaki ilişki *Caenorhabditis elegans*'da yaptıkları çalışmayla Morcos ve ark. tarafından gösterilmiştir (Morcos ve ark., 2008). Bu gözlem daha sonra kemirgenlerde yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (Ikeda ve ark., 2011; Fleming ve ark., 2013; Gu ve ark., 2014). Yaşlanmayla birlikte farelerde vasküler RAS değişikliklerini inceleyen Yoon ve ark., 2 ve 12 aylık olanlara kıyasla 24 aylık farelerde anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ve Ang II düzeylerinde artış olduğunu ortaya koymuşlardır (Yoon ve ark., 2016). Yaşlanmayla azalan Glo1 aktivitesi ve ekspresyonu dışında diyabette görülen yüksek MGO düzeylerinde daha farklı bir mekanizma olduğu açıktır. Hiperglisemiye bağlı ROS artışının RAGE ve ligandlarının ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Yao ve Brownlee, 2010). RAGE aktivasyonu olduğunda Glo1 ekspresyonu negatif olarak regüle edilmektedir (Rabbani ve ark., 2014). Hiperglisemiye bağlı olarak RAGE aktivasyonu oldukça uzun süreli (> 1 hafta) NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Bierhaus ve ark., 2001). Hiperglisemiye benzer şekilde Ang II'nin de RAGE ekspresyonunu artırdığı hem podositlerde ve VDKH'nde hem de farelerde gösterilmiştir (RAGE aktivasyonu ERK1/2 MAPK üzerinden Ang II miktarını da artırmaktadır) (Koka ve ark., 2006; Ihara ve ark., 2007; Ruster ve ark., 2009). Yine hiperglisemiye benzer şekilde Ang II'nin NF- $\kappa$ B aktivasyonu yaptığı da bilinmektedir (Wolf ve ark., 2002; Zahradka ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2005). NF- $\kappa$ B yaşlanma ile ilişkili olduğu gibi inflamatuvar yanıtın da hücrel önemli bir elemanıdır. Hiperglisemi, yaşlanma ve aterosklerotik süreçlere katkıda inflamatuvar rolü, ayrıca Ang II sinyalizasyonu ile aktive olması sebepleriyle çalışmamızda NF- $\kappa$ B rolünü sorgulayarak Ang II'nin Glo1 aktivite ve ekspresyonunu baskılamadaki mekanizmaları anlamaya çalıştık.

NF- $\kappa$ B immün sistemin homeostazı ve inflamatuvar yanıtın ana düzenleyicisi olan bir transkripsiyon faktörüdür. RelA/p65, c-Rel, p50 ve p52 birimlerinin bir araya gelmesiyle farklı hetero ve homodimer yapıları oluştururlar. p65 alt ünitesi transaktivasyon bölgesi içerir ve bu sayede fosforilasyona açıktır. Bu fosforilasyonların doğrudan NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile ilişkisi vardır. NF- $\kappa$ B aktivasyonu

ve sonrasında gerçekleşen hedef genlerin transkripsiyonu NF- $\kappa$ B alt ünitelerinin ekspresyonu ile düzenlendiği kadar, gerçekleşen fosforilasyonlarla da düzenlenir. p65 alt ünitesinde 536 no'lu serin (S536) fosforilasyonu NF- $\kappa$ B'nin artmış transaktivasyonu ile sonuçlanır. Bulgularımızda düşük glukoz ortamında Ang II'nin ve tek başına yüksek glukozun NF- $\kappa$ B p65 alt ünitesinde S536 fosforilasyonunu yaklaşık 2 kat artırdığını belirledik (Şekil 4.13). AT1R blokörlerinin bu fosforilasyonu baskıladığını belirleyerek de olayın AT1R aktivasyonu üzerinden gerçekleştiğini göstermiş olduk (Şekil 4.14). Sonuçlarımız yukarıda bahsi geçen Ang II ve yüksek glukoz uyarımlı NF- $\kappa$ B aktivasyonunu gösteren çalışmalarla uyumludur (Wolf ve ark., 2002; Zahradka ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2005; Huang ve Siragy, 2010). Kim ve ark.'nın yaptıkları çalışmada yaşlanmayla birlikte AT1R ve Ang II ekspresyonunun arttığını, artan Ang II'nin ise NF- $\kappa$ B p65 S536 fosforilasyonu yaptığını ortaya koymuşlardır. Bu gözlem yaşlanmayla birlikte ekspresyonu azalan Glo1 ekspresyonunda NF- $\kappa$ B rolünü gösterdiği gibi, bulgularımızla yan yana getirildiğinde Ang II'nin NF- $\kappa$ B aktivasyonu yaparak Glo1 aktivite ve ekspresyonunu azaltmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu gözlemler diyabetlilerde yüksek glukoz varlığına bağlı olarak artmış MGO seviyeleri ve yine yüksek glukozun aktive ettiği NF- $\kappa$ B aktivasyonu üzerinden gerçekleşen Glo1 ekspresyon ve aktivitesinin azalması ile ilişkili olabileceği sonucunu doğurmaktadır. JSH-23, NF- $\kappa$ B transkripsiyonel aktivitesini baskılayan bir ajandır. NF- $\kappa$ B p65 alt ünitesinin nükleusa göçünü engelleyerek bu işlevi gerçekleştiren bir translokasyon inhibitörüdür (Shin ve ark., 2004). JSH-23 uygulanan VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Glo1 aktivitesi etkilenmezken, her iki grupta da yaklaşık 2 kat ekspresyon artışı belirledik. Bu gözlem de Ang II'nin NF- $\kappa$ B aracılı olarak Glo1 ekspresyonu üzerinde baskılayıcı bir etkisi olduğunu önermektedir.

Ang II'nin p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK fosforilasyonuna/aktivasyonuna neden olduğunu hem bizim daha önceki çalışmalarımız, hem de diğer araştırmacılar ortaya koymuştur (Natarajan ve ark., 1999; Kirca ve ark., 2017; Kirca ve Yesilkaya, 2018). Mevcut çalışma kapsamındaki verilerimiz Ang II ve yüksek glukozun p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK aktivitesini uyardığı (doğrudan ölçümünü yapmamış olsak da) ve bu aktivasyonların da NF- $\kappa$ B p65 S536 fosforilasyonunu artırdığını göstermektedir (Şekil 4.14). Ang II'nin p65 S536 fosforilasyonundan bağımsız olarak total p65 düzeyini nasıl etkilediği sorusuna yanıt aradığımızda, Ang II'nin düşük ve yüksek glukoz

ortamında total p65 seviyesini etkilemediğini belirledik. Fakat tek başına yüksek glukozun total p65 ekspresyonunu yaklaşık 2 kat artırdığını belirledik. Düşük glukoz ortamında Ang II uyarımlı p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK aktivasyonunun p65 ekspresyonu üzerinde anlamlı bir etkisi tespit edilemese de, yüksek glukoz ortamında bu etkinin anlamlı düzeyde olduğunu belirledik. Bunun nedeni ise yüksek glukoz ortamında Ang II uygulanmasının, p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK aktivasyonunun hem yüksek glukoz hem de Ang II'nin kendisi tarafından uyarılması sonucunda düşük glukoz ortamındaki aktivasyondan çok daha kuvvetli bir aktivasyonun gerçekleşmiş olma ihtimalidir. Keza Ang II ve yüksek glukozun p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK aktivasyonundaki rolünü inceleyen Natarajan ve ark. yapmış oldukları çalışmada VDKH'nde Ang II'nin ve yüksek glukozun ayrı ayrı p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK aktivasyonu yaptıklarını, bu aktivasyonunun yüksek glukoz ortamında Ang II uygulandığında daha güçlü olduğunu ortaya koymuşlardır (Natarajan ve ark., 1999). Glo1 miktarının düşük glukoz ortamında p38 MAPK inhibisyonu yapıldığında arttığını, yüksek glukoz ortamında ise p38 MAPK ve ERK1/2 MAPK inhibisyonu yapılan her iki grupta da arttığını, enzim miktarındaki artışın p38 MAPK inhibitörü verildiğinde daha belirgin olduğu gözlemledik. Bunun nedeni ise Natarajan ve ark. yapmış oldukları çalışmada görülebileceği üzere yüksek glukoz indüklü ERK1/2 aktivasyonunun p38 MAPK'a kıyasla daha erken başlaması ve daha erken sonlanması olabilir. p38 MAPK aktivasyonu ise daha uzun sürede gerçekleşiyor gözükmektedir.

NF- $\kappa$ B ve p38 MAPK yollarının inhibe edilmesiyle düşük glukoz ortamında Glo1 aktivitesinin artışı, bu yolların inhibitörlerinin verildiği durumda (Şekil 4.2) intraselüler GSH konsantrasyonu artışı ile ilişkili olabilir. Düşük glukoz ortamında GSH derişimini azaltan Ang II, NF- $\kappa$ B ve p38 MAPK inhibe edildiğinde aynı performansı sergileyememiştir. Ang II varlığında VDKH'nde GSH konsantrasyonundaki azalma intraselüler oksidatif stresin artmasıyla ilişkili olabilir. Ang II'nin Nox aktivasyonu ile süperoksit oluşumunu artırdığı en başta Griendling ve ark. tarafından, sonrasında diğer araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Griendling ve ark., 1994; Nguyen Dinh Cat ve ark., 2013). Biz de daha önceki çalışmalarımızda Ang II'nin ROS'u artırdığını ve Nox üzerinden Ang II'nin p38 MAPK aktivasyonu yaptığını da belirlemiştik (Caglar ve ark., 2012; Oguz ve ark., 2017). Ek olarak artmış ROS düzeyinin NF- $\kappa$ B aracılı transkripsiyonu artıracığı da ifade edilmiştir. Bu tablo çalışmamızdaki düşük glukoz ortamında VDKH'nde NF- $\kappa$ B ve p38 MAPK

inhibisyonu gerçekleştiğinde hücresel GSH derişiminin artması (şekil 4.8) ve buna bağlı olarak Glo1 aktivitesinin restore olduğu, verilerimizle uyum içerisinde. Yüksek glukoz ortamında bu durumun gözlenememesinin sebebi ise GSH konsantrasyonu yükselmiş olsa bile Glo1 ekspresyonu azaldığı için Glo1 aktivitesinin düşmesi olarak yorumlanabilir. Ang II'nin GSH derişimini azalttığını ve olayın AT1R aracılı gerçekleştiğini gösteren başka çalışmalar da mevcuttur (Desideri ve ark., 2003; Doughan ve ark., 2008; Babu ve ark., 2016). Bu çalışmalarda daha kısa süre (4-18 saat) Ang II uygulanmasının GSH düzeyine etkisi gösterilmişken, çalışmamızda 48 saat Ang II uygulamasının da GSH düzeyini düşürdüğünü diğer çalışmalarla uyumlu olarak ortaya koyduk.

Yüksek glukoz-GSH ilişkisini inceleyen çalışmalara baktığımızda bu ilişkinin karmaşık olduğunu, yüksek glukozun insan ve sıçan VDKH'nde intraselüler GSH konsantrasyonunu azalttığını belirten veriler olduğu gibi (Tachi ve ark., 1998; Hattori ve ark., 2000), endotelial hücrelerde GSH derişiminin yüksek glukozdan etkilenmediğini belirten (Kashiwagi ve ark., 1994) ve insan VDKH'nde yüksek glukozun total ve redükte GSH derişimini etkilemediğini bildiren (Peir ve ark., 2016) alışmalar mevcuttur. Biz ise çalışmamızda yüksek glukozun GSH derişimini artırdığını belirledik (şekil 4.7). Bu gözlem yüksek glukoz ortamında Ang II uyarımlı Glo1 ekspresyonundaki azalma ve ortamda MGO konsantrasyonunun artışına bağlı olarak Glo1 aktivitesini artırmak için hücrelerin adaptif olarak GSH düzeyini yükseltmek yönünde çaba göstermiş olabileceklerini düşündürmektedir. Yüksek glukozun GSH düzeyini artırması diğer çalışmalarla uyumlu gözükme de yüksek glukozun Nrf2 ekspresyonunu artırdığını belirlediğimiz verimiz (şekil 4.19) de GSH artışını destekler niteliktedir. Hücrede antioksidan yanıtın ana düzenleyicisi olarak kabul edilen ve antioksidan enzimlerin transkripsiyonunu düzenleyen, kendisi de bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2 ile GSH arasında doğrudan bir ilişki kurmak mümkündür ve Nrf2 aktivasyonunda GSH artışı beklenebilir. Zira hem bunu destekler nitelikte çalışmalar mevcuttur (Suh ve ark., 2004; Ha ve ark., 2006; Johnson ve ark., 2008; Harvey ve ark., 2009; Steele ve ark., 2013) hem de Nrf2'nin transkripsiyonunu indüklediği hedef genlerden biri de GSH sentezindeki hız kısıtlayıcı basamağı katalizleyen  $\gamma$ -Glutamilsistein ligaz (GCL) enzimidir (Baird ve Dinkova-Kostova, 2011).

Nrf2 knockout farelerde GSH sentezi ve ilişkili enzim miktarları düşmekte, sonuçta embriyonik letal bir tablonun ortaya çıktığı bildirilmiştir (Y. Chan ve Kwong, 2001; Abdul-Aziz ve ark., 2015). Ayrıca Nrf2 artışı ve GSH indirekt ilişkisini destekler nitelikteki çalışmalardan birinde Chen ve ark. yine Nrf2 knockout fare karaciğerinde GSH biyosentezi, rejenerasyonu, faydalanımı ve transportu ile ilişkili genlerde azalmış ekspresyon tespit etmişlerdir. Yine bu çalışmada kan GSH değerlerinde de bir düşme gözlenmektedir (Chen ve ark., 2016). Jiang ve ark. yapmış oldukları çalışmada diyabetik nefropatili hastaların biyopsi örneklerinde ve streptozotosin uyarımlı diyabetik nefropati oluşturulan farelerde Nrf2 hedef genlerinin artışı bildirmişlerdir (Jiang ve ark., 2010). Ayrıca 48 saat yüksek glukoz uygulamasının Nrf2 ekspresyonunu artırdığı primer költüre sıçan Müller hücrelerinde gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2012). İnterlökin-1 $\beta$ 'nin (IL-1 $\beta$ ) artışının p38 MAPK ve NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile gerçekleştiğini bildiren Tran ve ark.'nın çalışmasında 24 saatlik inkübasyon sonucunda GSH düzeyinin artışı da görülmektedir. Yine bu çalışmada IL-1 $\beta$ 'ya bağlı olarak ROS seviyesi de artmıştır (Tran ve ark., 2004). Buradan yola çıkarak çalışmamızın sonuçları intraselüler ROS artışında, GSH düzeyi oluşan oksidatif stresi kompanse etmek için uyarılan Nrf2 artışına paralel olarak artış gösterebileceğini önermektedir. Ayrıca düşük glukoz ortamında GSH ve Nrf2 üzerinde NF- $\kappa$ B ve p38 MAPK etkisini, yüksek glukoz ortamında ise GSH üzerine p38 MAPK etkisini belirledik. Bu gözlemlerimiz literatürde önerilen mekanizmalarla (Zipper ve Mulcahy, 2000; Lewis ve ark., 2015) uyumludur.

Verilerimizde Nrf2 konsantrasyonlarına baktığımızda Ang II'nin yüksek glukoz gibi Nrf2 düzeyini artırdığı görülebilir. Doğrudan Ang II'nin Nrf2 ile ilişkisine baktığımızda aslında burada da birbirinden farklı sonuçlar görmekteyiz. Kang ve ark.'nın renal epitel hücrelerinde 24 ve 48 saat Ang II uygulanmasına müteakip Nrf2 ve ilişkili gen ekspresyonunda düşme ortaya koymuşlardır (Kang ve ark., 2011). Diğer taraftan Parga ve ark. ise 24 saat Ang II uygulamasının farklı nöronal hücre hatlarında Nrf2 ve ilişkili gen ekspresyonlarının azalmayıp, aksine arttığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca bu gözlemi *in vivo* olarak da tespit etmişlerdir (Parga ve ark., 2018). Ang II'nin etkisini inceleyen pek çok çalışmada genellikle 100 nM konsantrasyon tercih edilmektedir. Parga ve ark.'nın çalışması 24 saat 100 nM Ang II uygulamasına dayanırken, Kang ve ark.'nın çalışması 24 ve 48 saat 2-4  $\mu$ M Ang II uygulamasını içerir ki bu oldukça yüksek bir doz kabul edilebilir (20-40 kat). Biz de çalışmamızda

100 nM dozu tercih ederek 48 saat 100 nM Ang II uygulaması yaptığımızda Nrf2 ekspresyonunun arttığını tespit ettik ki Parga ve ark. gözlemi ile uyum göstermektedir. Sonuçlarımızda yüksek glukozun Nrf2'yi Ang II'den daha fazla artırdığını görmekteyiz. Diğer taraftan düşük glukozda Ang II, GSH derişimini düşürürken, yüksek glukoz ortamında anlamsız da olsa kontrole kıyasla bir miktar daha GSH derişimini artmaktadır. Bu gözlemi ise Ang II'nin tek başına daha alt seviyede bir oksidatif stres oluşturduğunu ve bunun sonucunda ilk etapta mevcut intraselüler GSH'da bir düşmeye neden olduğunu, daha yüksek bir oksidatif stres durumunda ise oksidatif strese karşı koymak adına hücrenin GSH ile ilişkili gen aktivasyonu üzerinden GSH miktarını artırmış olabileceği yorumu yapılabilir.

Kanser hücreleri ile VDKH'nin sinyal iletiminde ve buldukları çevreye yanıtlarında keşim kümeleri bulunmaktadır (Marsboom ve Archer, 2008). Yüksek glukoz ortamında artan proliferasyonları, her iki hücre grubunda da bu durumun istenmemesi ve yüksek glukoz varlığı ya da büyüme faktörü (ya da Ang II gibi büyüme faktörü etkisi yapan) etkisinde proliferasyonla ilişkili sinyal yollarının aktivasyonu bunlara örnek verilebilir (Duan ve ark., 2014). Kanser hücrelerinin hücre içi ROS artışı ve apoptozisin uyarılması ile ölmesi mümkündür ki anti kanser ilaçların bir kısmının mekanizması buna dayanmaktadır (Yang ve ark., 2018). Bu sebeple pek çok kanser hücresinde artmış ROS bulunurken aynı zamanda artmış antioksidan protein ekspresyonuyla da antioksidan yanıtı uyararak hücre içi ROS düzeyini düşürüp proliferasyon yolunu tercih ederken, apoptozise giden yolu bloke edebilir (Liou ve Storz, 2010; Kumari ve ark., 2018). Ang II uyarımıyla Nrf2 ekspresyonundaki artışı belki de bu şekilde düşünmek daha mantıklıdır. Diğer yandan çalışmamız kapsamında olmayan faktörler (RAGE ve HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu gibi) de Ang II indüklü Glo1 aktivite ve ekspresyonunda etkili olabilir.

Ang II'nin RAGE ekspresyonunu artırdığını ve Glo1'in RAGE tarafından negatif olarak regüle edildiğini daha önceki bölümlerde bahsetmiştik. Ayrıca Glo1 HIF-1 $\alpha$  tarafından da negatif olarak regüle edilmektedir ki Ang II'nin HIF-1 $\alpha$  indüksiyonu yaptığı hem VDKH'nde hem başka hücrelerde gösterilmiştir (Richard ve ark., 2000; Pagé ve ark., 2002; Wolf ve ark., 2004; Chen ve ark., 2005) ve VDKH'ndeki HIF-1 $\alpha$ 'nın kan basıncının düzenlenmesinde rolü olduğu da belirtilmiştir (Huang ve ark., 2013). Ang II uyarımlı ve HIF-1 $\alpha$  aracılı vasküler yeniden modellenmede (Imanishi



ve ark., 2014) negatif regüle edilen Glo1 aktivite ve ekspresyonu da etkili olabilir. Fakat RAGE aktivasyonu ve HIF-1 $\alpha$  indüksiyonunun da NF- $\kappa$ B ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Ang II ve yüksek glukoz uygulaması bir yandan Nrf2 ekspresyonunu artırır ve sonuçta Nrf2 ekspresyon artışına bağlı olarak Glo1 ekspresyonunda ve aktivitesinde bir artış beklenir. Çünkü Glo1 sentezini sağlayan gen dizisinde Nrf2 bağlanma bölgesi mevcuttur. Fakat böyle bir artış görülmediği gibi Ang II ve yüksek glukoz varlığında Glo1 ekspresyonunda azalma gözledik. Ang II'nin etkilediği pek çok sinyal yolu mevcuttur ve bunlardan olan p38 MAPK ve NF- $\kappa$ B p65 aktivasyonu ile Glo1 ekspresyonunu baskıladığını saptadık. Çalışmamızın sonuçları Ang II uyarımıyla gerçekleşen NF- $\kappa$ B p65 ve p38 MAPK'ın Glo1 ekspresyonunda etkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Chen ve ark. da yaptıkları çalışmada ERK1/2 MAPK aracılı NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile Glo1 ekspresyonunun baskılanabileceği bir mekanizma önermişlerdir (Chen ve ark., 2015). Nigro ve ark.'nın oldukça yeni olan çalışmalarında Glo1 ekspresyonu baskılandığında (knock-down) artmış NF- $\kappa$ B p65 düzeyleri belirlenmiştir (Nigro ve ark., 2019). Bu gözlemler bulgularımızda yer alan artmış NF- $\kappa$ B p65 düzeyleri ve azalmış Glo1 ekspresyonu ile paralellik arz etmektedir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada sıçan aortasından izole edilen ve primer kültürü yapılan vasküler düz kas hücrelerinde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II (48 saat, 100 nM) uygulamasının Glo1 aktivitesi, Glo1 ekspresyonu, intraselüler GSH ve MGO derişimi (MG-H1 olarak), NF-κB p65 ünitesi ekspresyonu ve S536 fosforilasyonu ile Nrf2 ekspresyonu üzerine etkisi incelenmiştir.

Deneyle sonucunda VDKH'nde düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin Glo1 aktivitesini düşürdüğü belirlendi. Düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin ve ayrıca tek başına yüksek glukozun Glo1 ekspresyonunu baskıladığı görüldü. Ang II uyarımlı aktivite ve ekspresyon azalmasının AT1R aracılı gerçekleştiğini, telmisartan ve irbesartan varlığında bu etkilerin ortadan kalktığı tespit edildi. Ayrıca Ang II ve yüksek glukozun neden olduğu Glo1 ekspresyonundaki azalmada NF-κB p65 ve p38 MAPK aktivasyonu gerçekleştiğini ve bu aktivasyon sayesinde Glo1 ekspresyonunun düştüğü belirlendi. Glo1 aktivite ve ekspresyonunun azaldığı durumlarda intraselüler MGO konsantrasyonunun arttığı görüldü. Düşük glukoz ortamında Ang II'nin GSH derişimini düşürdüğü, yüksek glukoz ortamında bu etkinin olmadığı ve yüksek glukozun GSH konsantrasyonunu artırdığı belirlendi. Düşük glukoz ortamında Ang II indüklü GSH düşüşünün AT1R aracılı gerçekleştiği ve olayın NF-κB ve p38 MAPK aktivasyonu aracılı gerçekleştiği tespit edildi. Yüksek glukoz ortamında telmisartanın beklenmedik bir GSH artışına yol açtığı ve p38 MAPK aktivasyonuna bağlı GSH derişimi azalması gözlemlenirken, düşük glukoz ortamında NF-κB etkisi gözlenmedi.

Yüksek glukozun ve düşük glukoz ortamında Ang II'nin hücrel MGO derişimini artırdığı, Ang II'nin etkisini AT1R üzerinden gösterdiği belirlendi. Ang II indüklü MGO artışında düşük ve yüksek glukoz ortamında p38 MAPK aktivasyonunun önemli olduğu gözlendi. Düşük glukoz ortamında Ang II'nin ve bundan bağımsız olarak yüksek glukozun NF-κB p65 biriminde S536 fosforilasyonunu artırdığı, Ang II indüklü fosforilasyonun AT1R aracılı olduğu ve bu fosforilasyonda Ang II indüklü p38 ve ERK1/2 MAPK aktivasyonu tespit edildi. Düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin NF-κB p65 ekspresyonuna etkisi belirlenemezken, yüksek glukozun p65 ekspresyonunu artırdığı ve bu artışta yine p38 ve ERK1/2 MAPK aktivasyonunun rolü olduğu ortaya çıkartıldı. Ayrıca düşük glukozda Ang II'nin ve ayrıca yüksek glukozun

tek başına Nrf2 miktarını artırdığı belirlendi. Ang II'nin bu etkisinde AT1R'nin aracı olduğu, olayda p38 ve ERK1/2 MAPK aktivasyonu da gerektiği tespit edildi. Ayrıca NF-κB translokasyonu inhibe edildiğinde Nrf2 derişiminin artışı ortaya konuldu. Yüksek glukozun indüklediği Nrf2 artışında ise p38 MAPK rolü belirlenemezken, ERK1/2 MAPK aktivasyonun rolü olduğu tespit edildi.

Bu bilgiler ışığında Ang II'nin gerek sistemik olarak ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıklara yol açabilen vasküler patolojilere katkıda bulunması, gerek damar yapısındaki vasküler düz kas hücreleri üzerinde proliferasyon ve inflamasyonu uyarması gibi etkilerine ek olarak, obeziteden yaşlanmaya, diyabetik komplikasyonlardan kardiyovasküler hastalıklara kadar pek çok zararlı etkisi gösterilmiş olan MGO konsantrasyonunu artırdığını mevcut çalışmamızla ortaya koymuş olduk. Ayrıca diyabetlilerde konsantrasyonu 4-5 kat artmış olan MGO'nun VDKH'nin yüksek glukozu maruz bırakılması sonucunda arttığını ve bu artışta MGO detoksifikasyonundan primer sorumlu Glioksalaz 1 enziminin azalan ekspresyonu olduğunu da belirledik. Böylelikle diğer araştırmacılar tarafından MGO indüklü RAS aktivasyonu, AT1R ve Ang II ekspresyon artışını ortaya koyarak glioksalaz sisteminin RAS üzerine etkisini gösterdikleri çalışmalara ek olarak biz de bu çalışmayla RAS sistemi efektör peptidlerinden Ang II'nin glioksalaz sistemi ana enzimi Glo1 üzerinde negatif düzenleyici olduğunu ortaya koyarak MGO-RAS veya glioksalaz sistemi-RAS ilişkisinin tek taraflı olmadığını, çift yönlü olabileceğini göstermiş olduk.

Çalışmamızın amaçlarından birisi de kullanılan AT1R blokörleri telmisartan ve irbesartan arasında bir karşılaştırma sunmak ve varsa birinin diğerine üstün yönlerini ortaya çıkarmaktı. Genel olarak aralarında anlamlı bir fark gözlenirse de yüksek glukoz ortamında telmisartanın intraselüler GSH seviyesini yükseltmesi ve Glo1 aktivitesini artırması, düşük ve yüksek glukoz ortamında Ang II'nin etkilerini antagonize etmede irbesartana kıyasla bir adım öne geçmektedir. Dolayısıyla hipertansiyon tedavisi alan diyabetli bireylerde veya pre-diyabetlilerde telmisartan kullanımı daha faydalı olabilir. Tablo 6.1'de düşük glukoz ortamında, Tablo 6.2'de ise yüksek glukoz ortamında elde edilen toplu sonuçlar sunulmuştur.

**Tablo 6.1.** Düşük glukoz ortamındaki toplu sonuçlar.

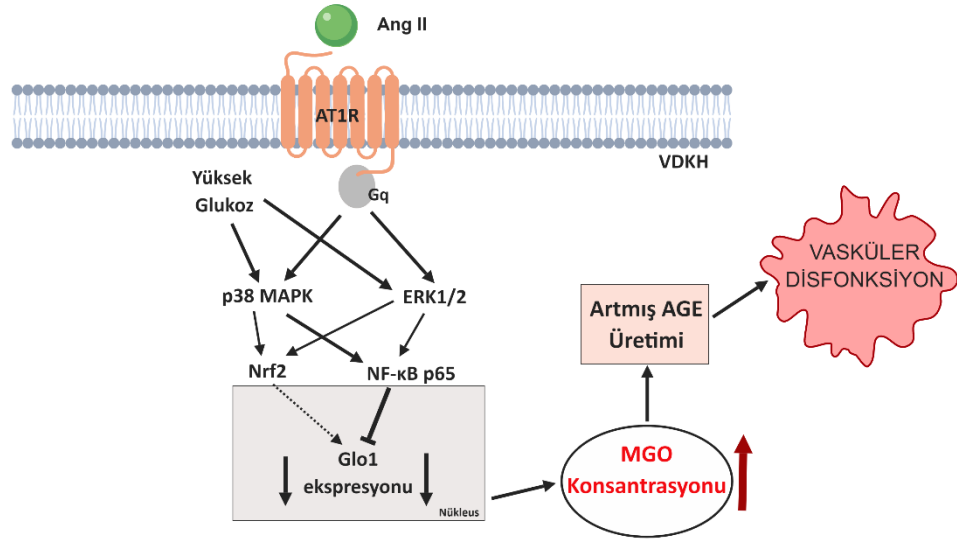
Düşük Glukoz Grubu	Glo1 aktivitesi (%kontrol)	Glo1 Miktarı (ng/mg protein)	GSH Derişimi (µg/mL)	MG-H1 Düzeyi (µg/mL)	Fosfo p65 (S536) (absorbans)	Total p65 (pg/mg protein)	Nrf2 (pg/mg protein)
<b>Kontrol</b>	100	11,6	2,3	2,3	0,64	525	570
<b>Ang II</b>	73	8,8	1,3	3,1	1,06	604	1152
<b>Telm+ Ang II</b>	103	14,2	3,4	2,5	0,70	526	617
<b>Irb+ Ang II</b>	111	11,8	2,9	2,6	0,68	660	732
<b>JSH+ Ang II</b>	120	14,8	5,2	3,6	1,04	583	1553
<b>SB203+ Ang II</b>	98	15,1	5,4	2,6	0,71	462	791
<b>PD98+ Ang II</b>	62	11,5	2,4	3,1	0,74	485	823

**Tablo 6.2.** Yüksek glukoz ortamındaki toplu sonuçlar.

Yüksek Glukoz Grubu	Glo1 aktivitesi (%kontrol)	Glo1 Miktarı (ng/mg protein)	GSH Derişimi (µg/mL)	MG-H1 Düzeyi (µg/mL)	Fosfo p65 (S536) (absorbans)	Total p65 (pg/mg protein)	Nrf2 (pg/mg protein)
<b>Kontrol</b>	100	9,2	4,0	3,3	1,30	913	1320
<b>Ang II</b>	80	7,1	5,2	3,7	1,47	832	1068
<b>Telm+ Ang II</b>	106	14,0	12,0	3,1	1,28	732	951
<b>Irb+ Ang II</b>	98	11,7	5,5	3,1	1,20	823	915
<b>JSH+ Ang II</b>	63	22,1	5,2	4,2	1,65	762	
<b>SB203+ Ang II</b>	75	20,7	9,4	2,5	1,18	580	1150
<b>PD98+ Ang II</b>	36	15,9	3,6	3,3	1,11	601	1480

Ang II'nin Glo1 üzerindeki etkilerine NF-κB aracılık ediyor gözükmektedir. NF-κB yaşlılık, kanser, diyabet, ateroskleroz ve genel olarak kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olsa da immün sistem için vazgeçilemez oluşu bu önemli yolağa karşı farmasötik yaklaşımı zorlaştırmaktadır. NF-κB ile ilgili spesifik inhibitörlerin geliştirilmesi pek çok hastalık için olduğu gibi özellikle yüksek MGO düzeyleri gözlenen retinopati ve nefropati gibi diyabetik komplikasyon(lar)a sahip bireyler için de yaşam kalitesi ve süresini pozitif yönde etkileyecektir.

Benzer şekilde p38 MAPK inhibisyonu üzerinde yıllardır çalışılan bir konu olsa da kardiyovasküler hastalıklar temel alındığında güvenilir bir terapötik ajan hala bulunmuş değildir. NF- $\kappa$ B aktivasyonunda p38 MAPK'ın da rol aldığı düşünüldüğünde bu alandaki gelişmeler belki de kardiyovasküler hastalıklar açısından daha büyük faydalar sağlayacaktır. Diyabetlilerde yüksek glukozla bağlı olarak kanda yüksek MGO derişimi gözlene de Ang II'nin de MGO düzeylerini etkileyebileceği ve diyabetli olmayan hipertansif kişilerde yüksek MGO düzeyleri olabileceği çalışmamız sonuçlarına bakıldığında ihtimal dahilindedir. İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılacak ileri *in vivo* çalışmalar bu konudaki bilgi dağarcığımızı önemli katkılar sunacaktır. Son olarak çalışmamıza ait bulgular Şekil 6.1.'de özet olarak resmedilmiştir.



Şekil 6.1. Ang II ve yüksek glukozun Glo1 ekspresyonunu baskılaması.

## KAYNAKLAR

- Abdul-Aziz, A., MacEwan, D., Bowles, K., & Rushworth, S. Oxidative stress responses and nrf2 in human leukaemia. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015: 1-7.
- Abordo, E. A., Minhas, H. S., & Thornalley, P. J. Accumulation of  $\alpha$ -oxoaldehydes during oxidative stress: A role in cytotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 1999;58(4): 641-648.
- An, Y. S., Kwon, J. H., Kang, Y. H., Kim, I. J., Kim, Y. K., & Son, S. M. Migration of vascular smooth muscle cells by high glucose is reactive oxygen dependent. *Korean Diabetes J*. 2008; 32 (3): 185-195.
- Anand, D. V., Lim, E., Darko, D., Bassett, P., Hopkins, D., Lipkin, D., . . . Lahiri, A. Determinants of progression of coronary artery calcification in type 2 diabetes role of glycemic control and inflammatory/vascular calcification markers. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(23): 2218-2225.
- Andr as, R., & Brown, D. L. Effect of inhibition of the renin-angiotensin system on development of type 2 diabetes mellitus (meta-analysis of randomized trials). *Am J Cardiol*. 2007;99(7): 1006-1012.
- Arai, M., Yuzawa, H., Nohara, I., Ohnishi, T., Obata, N., Iwayama, Y., . . . Itokawa, M. Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(6): 589-597.
- Arias-Salvatierra, D., Silbergeld, E. K., Acosta-Saavedra, L. C., & Calderon-Aranda, E. S. Role of nitric oxide produced by inos through nf- $\kappa$ b pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by lipopolysaccharide. *Cell Signal*. 2011;23(2): 425-435.
- Babu, S., Karnewar, S., Gopaju, R., Gollavilli, p. n., Ram Narra, S., Kumar, J., & Kotamraju, S. Resveratrol attenuates monocyte-to-macrophage differentiation and associated inflammation via modulation of intracellular gsh homeostasis: Relevance in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2016;96: 392-405.

Bader, M. Ace2, angiotensin-(1-7), and mas: The other side of the coin. *Pflugers Arch.* 2013;465(1): 79-85.

Baird, L., & Dinkova-Kostova, A. T. The cytoprotective role of the keap1-nrf2 pathway. *Arch Toxicol.* 2011;85(4): 241-272.

Barati, M. T., Merchant, M. L., Kain, A. B., Jevans, A. W., McLeish, K. R., & Klein, J. B. Proteomic analysis defines altered cellular redox pathways and advanced glycation end-product metabolism in glomeruli of db/db diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;293(4): F1157-F1165.

Bessueille, L., Fakhry, M., Hamade, E., Badran, B., & Magne, D. Glucose stimulates chondrocyte differentiation of vascular smooth muscle cells and calcification: A possible role for il-1 $\beta$ . *FEBS Lett.* 2015;589(19PartB): 2797-2804.

Bierhaus, A., Fleming, T., Stoyanov, S., Leffler, A., Babes, A., Neacsu, C., . . . Nawroth, P. P. Methylglyoxal modification of nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nat Med.* 2012;18(6): 926-933.

Bierhaus, A., Schiekofer, S., Schwaninger, M., Andrassy, M., Humpert, P. M., Chen, J., . . . Nawroth, P. P. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ b. *Diabetes.* 2001;50(12): 2792-2808.

Bornfeldt, K. E. 2013 Russell Ross memorial lecture in vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(4): 705-714.

Bosch, J., Yusuf, S., Gerstein, H. C., Pogue, J., Sheridan, P., Dagenais, G., . . . Holman, R. R. Effect of ramipril on the incidence of diabetes. *N Engl J Med.* 2006;355(15): 1551-1562.

Caglar, S., Cetin, A., Uzuner, F., Tokay, A., Kirca, M., & Yesilkaya, A. The role of at1 receptor, ras and nad (p) h oxidase on p38 mapk phosphorylation by angiotensin ii stimulation in primary cultured vascular smooth muscle cells. *Turk Biyokim Derg.* 2012;37(4): 407-416.

Carrillo-Sepulveda, M. A., & Matsumoto, T. Phenotypic modulation of mesenteric vascular smooth muscle cells from type 2 diabetic rats is associated with decreased caveolin-1 expression. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34(5): 1497-1506.

Ceriello, A. The emerging challenge in diabetes: The "metabolic memory". *Vascul Pharmacol*. 2012;57(5-6): 133-138.

Chan, W. H., Wu, H. J., & Shiao, N. H. Apoptotic signaling in methylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-jun n-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2. *J Cell Biochem*. 2007;100(4): 1056-1069.

Chaplin, N. L., Nieves-Cintrón, M., Fresquez, A. M., Navedo, M. F., & Amberg, G. C. Arterial smooth muscle mitochondria amplify hydrogen peroxide microdomains functionally coupled to l-type calcium channels. *Circ Res*. 2015;117(12): 1013-1023.

Chen, T. H., Wang, J. F., Chan, P., & Lee, H. M. Angiotensin ii stimulates hypoxia-inducible factor 1alpha accumulation in glomerular mesangial cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1042: 286-293.

Chen, C.-C., Wu, M.-L., Doerksen, R., Ho, C.-T., & Huang, T. Andrographolide induces apoptosis via down-regulation of glyoxalase 1 and hmg-coa reductase in hl-60 cells. *J Funct Foods*. 2015;14: 226-235.

Chen, Y., Xu, Y., Zheng, H., Fu, J., Hou, Y., Wang, H., . . . Pi, J. The role of nuclear factor e2-related factor 2 and uncoupling protein 2 in glutathione metabolism: Evidence from an in vivo gene knockout study. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;478(1):87-92.

Chen, Y., Zhang, H., Liu, H., Li, K., Jia, M., & Su, X. High glucose upregulated vascular smooth muscle endothelin subtype b receptors via inhibition of autophagy in rat superior mesenteric arteries. *Ann Vasc Surg*. 2018;52: 207-215.

Cheng, A. S., Cheng, Y. H., Chiou, C. H., & Chang, T. L. Resveratrol upregulates nrf2 expression to attenuate methylglyoxal-induced insulin resistance in hep g2 cells. *J Agric Food Chem*. 2012;60(36): 9180-9187.



Choudhary, R., Kapoor, M. S., Singh, A., & Bodakhe, S. H. Therapeutic targets of renin-angiotensin system in ocular disorders. *J Curr Ophthalmol*. 2016;29(1): 7-16.

Coble, J. P., Grobe, J. L., Johnson, A. K., & Sigmund, C. D. Mechanisms of brain renin angiotensin system-induced drinking and blood pressure: Importance of the subfornical organ. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;308(4): R238-249.

Cominacini, L., Pasini, A. F., Garbin, U., Davoli, A., Tosetti, M. L., Campagnola, M., . . . Sawamura, T. Oxidized low density lipoprotein (ox-ldl) binding to ox-ldl receptor-1 in endothelial cells induces the activation of nf-kappab through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2000;275(17): 12633-12638.

Costantino, S., Paneni, F., & Cosentino, F. Hyperglycemia: A bad signature on the vascular system. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2015;5(5): 403-406.

Cui, M., Cai, Z., Chu, S., Sun, Z., Wang, X., Hu, L., . . . He, B. Orphan nuclear receptor nur77 inhibits angiotensin ii-induced vascular remodeling via downregulation of betacatenin. *Hypertension*. 2016; 67 (1): 153-162.

de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., & Unger, T. International union of pharmacology. Xxiii. The angiotensin ii receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3): 415-472.

Descorbeth, M., & Anand-Srivastava, M. B. Role of oxidative stress in high-glucose- and diabetes-induced increased expression of gq/11alpha proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(9): 1395-1405.

Desideri, G., Bravi, M. C., Tucci, M., Croce, G., Marinucci, M. C., Santucci, A., . . . Ferri, C. Angiotensin ii inhibits endothelial cell motility through an at1-dependent oxidant-sensitive decrement of nitric oxide availability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(7): 1218-1223.

Dézsi, C. A. The different therapeutic choices with arbs. Which one to give? When? Why? *Am J Cardiovasc Drugs*. 2016;16(4): 255-266.

Dhar, A., Desai, K., Kazachmov, M., Yu, P., & Wu, L. Methylglyoxal production in vascular smooth muscle cells from different metabolic precursors. *Metabolism*. 2008;57(9): 1211-1220.

Dhar, I., Dhar, A., Wu, L., & Desai, K. M. Increased methylglyoxal formation with upregulation of renin angiotensin system in fructose fed sprague dawley rats. *Plos One*. 2013;8(9): e74212.

Dhar, I., Dhar, A., Wu, L., & Desai, K. M. Methylglyoxal, a reactive glucose metabolite, increases renin angiotensin aldosterone and blood pressure in male sprague-dawley rats. *Am J Hypertens*. 2014;27(3): 308-316.

Diep, Q. N., Amiri, F., Touyz, R. M., Cohn, J. S., Endemann, D., Neves, M. F., & Schiffrin, E. L. Pparalpha activator effects on ang ii-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension*. 2002;40(6): 866-871.

Dobler, D., Ahmed, N., Song, L., Eboigbodin, K. E., & Thornalley, P. J. Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by rgd and gfoget motif modification. *Diabetes*. 2006;55(7): 1961-1969.

Dosso, A. A., Rungger-Brandle, E., & Leuenberger, P. M. Ultrastructural alterations in capillaries of the diabetic hypertensive rat retina: Protective effects of ace inhibition. *Diabetologia*. 2004;47(7): 1196-1201.

Doughan, A. K., Harrison, D. G., & Dikalov, S. I. Molecular mechanisms of angiotensin ii-mediated mitochondrial dysfunction: Linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res*. 2008;102(4): 488-496.

Duan, W., Shen, X., Lei, J., Xu, Q., Yu, Y., Li, R., . . . Ma, Q. Hyperglycemia, a neglected factor during cancer progression. *BioMed Res Int*. 2014: 10.

Duerrschmid, C., Trial, J., Wang, Y., Entman, M. L., & Haudek, S. B. Tumor necrosis factor: A mechanistic link between angiotensin-ii-induced cardiac inflammation and fibrosis. *Circ Heart Fail*. 2015;8(2): 352-361.

El-Najjar, N., Kulkarni, R. P., Nader, N., Hodeify, R., & Machaca, K. Effects of hyperglycemia on vascular smooth muscle  $Ca^{2+}$  signaling. *Biomed Res Int.* 2017; 3691349.

Favre, G. A., Esnault, V. L., & Van Obberghen, E. Modulation of glucose metabolism by the renin-angiotensin-aldosterone system. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;308(6): E435-449.

International Diabetes Federation (IDF). *IDF Diabetes Atlas*, 8th edn (2017). <http://www.diabetesatlas.org>. Erişim Tarihi: 13.03.2019.

Fleming, T. H., Theilen, T. M., Masania, J., Wunderle, M., Karimi, J., Vitas, S., . . . Nawroth, P. P. Aging-dependent reduction in glyoxalase 1 delays wound healing. *Gerontology.* 2013;59(5): 427-437.

Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., . . . Eguchi, S. Angiotensin ii signal transduction: An update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2018;98(3): 1627-1738.

Forrester, S. J., Kawai, T., O'Brien, S., Thomas, W., Harris, R. C., & Eguchi, S. Epidermal growth factor receptor transactivation: Mechanisms, pathophysiology, and potential therapies in the cardiovascular system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016;56: 627-653.

Fukuda, D., Enomoto, S., Hirata, Y., Nagai, R., & Sata, M. The angiotensin receptor blocker, telmisartan, reduces and stabilizes atherosclerosis in apoE and at1ar double deficient mice. *Biomed Pharmacother.* 2010;64(10): 712-717.

Garrido, A. M., & Griendling, K. K. NADPH oxidases and angiotensin ii receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;302(2): 148-158.

Giacco, F., Du, X., D'Agati, V. D., Milne, R., Sui, G., Geoffrion, M., & Brownlee, M. Knockdown of glyoxalase 1 mimics diabetic nephropathy in nondiabetic mice. *Diabetes.* 2014;63(1): 291-299.

Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D., & Alexander, R. W. Angiotensin ii stimulates nadh and nadph oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74(6): 1141-1148.

Gu, Q., Wang, B., Zhang, X. F., Ma, Y. P., Liu, J. D., & Wang, X. Z. Contribution of receptor for advanced glycation end products to vasculature-protecting effects of exercise training in aged rats. *Eur J Pharmacol.* 2014;741: 186-194.

Gunther, S., Alexander, R. W., Atkinson, W. J., & Gimbrone, M. A., Jr. Functional angiotensin ii receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1982;92(2): 289-298.

Guo, Q., Mori, T., Jiang, Y., Hu, C., Osaki, Y., Yoneki, Y., . . . Ito, S. Methylglyoxal contributes to the development of insulin resistance and salt sensitivity in sprague-dawley rats. *J Hypertens.* 2009;27(8): 1664-1671.

Ha, K. N., Chen, Y., Cai, J., & Sternberg, P., Jr. Increased glutathione synthesis through an are-nrf2-dependent pathway by zinc in the rpe: Implication for protection against oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(6): 2709-2715.

Hall, J. L., Matter, C. M., Wang, X., & Gibbons, G. H. Hyperglycemia inhibits vascular smooth muscle cell apoptosis through a protein kinase c-dependent pathway. *Circ Res.* 2000;87(7): 574-580.

Hamoudane, M., Amakran, A., Bakrim, N., & Nhiri, M. Decreased blood levels of glyoxalase i and diabetic complications. *Int J Diabetes Dev Ctries.* 2015;35(3): 496-501.

Hanssen, N. M. J., Scheijen, J., Jorsal, A., Parving, H. H., Tarnow, L., Rossing, P., . . . Schalkwijk, C. G. Higher plasma methylglyoxal levels are associated with incident cardiovascular disease in individuals with type 1 diabetes: A 12-year follow-up study. *Diabetes.* 2017; 66(8): 2278-2283.

Harvey, C. J., Thimmulappa, R. K., Singh, A., Blake, D. J., Ling, G., Wakabayashi, N., . . . Biswal, S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(4): 443-453.

Hattori, Y., Hattori, S., Sato, N., & Kasai, K. High-glucose-induced nuclear factor kappaB activation in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2000;46(1): 188-197.

Hu, C., Dandapat, A., Chen, J., Liu, Y., Hermonat, P. L., Carey, R. M., & Mehta, J. L. Over-expression of angiotensin ii type 2 receptor (agtr2) reduces atherogenesis and modulates lox-1, endothelial nitric oxide synthase and heme-oxygenase-1 expression. *Atherosclerosis.* 2008;199(2): 288-294.

Hu, C., Dandapat, A., & Mehta, J. L. Angiotensin ii induces capillary formation from endothelial cells via the lox-1 dependent redox-sensitive pathway. *Hypertension.* 2007;50(5): 952-957.

Huang, J., & Siragy, H. M. Regulation of (pro)renin receptor expression by glucose-induced mitogen-activated protein kinase, nuclear factor-kappaB, and activator protein-1 signaling pathways. *Endocrinology.* 2010;151(7): 3317-3325.

Huang, Y., Di Lorenzo, A., Jiang, W., Cantalupo, A., Sessa, W. C., & Giordano, F. J. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in vascular smooth muscle regulates blood pressure homeostasis through a peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -angiotensin ii receptor type 1 axis. *Hypertension.* 2013;62(3): 634-640.

Huybers, S., & Bindels, R. J. Vascular calcification in chronic kidney disease: New developments in drug therapy. *Kidney Int.* 2007;72(6): 663-665.

Hyslop, P. A., Hinshaw, D. B., Halsey Jr, W. A., Schraufstatter, I. U., Sauerheber, R. D., Spragg, R. G., . . . Cochrane, C. G. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of adp phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1988;263(4): 1665-1675.

Ihara, Y., Egashira, K., Nakano, K., Ohtani, K., Kubo, M., Koga, J., . . . Sunagawa, K. Upregulation of the ligand-rage pathway via the angiotensin ii type i receptor is essential in the pathogenesis of diabetic atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43(4): 455-464.

Ikeda, Y., Inagi, R., Miyata, T., Nagai, R., Arai, M., Miyashita, M., . . . Nangaku, M. Glyoxalase i retards renal senescence. *Am J Pathol.* 2011;179(6): 2810-2821.

Imanishi, M., Tomita, S., Ishizawa, K., Kihira, Y., Ueno, M., Izawa-Ishizawa, Y., . . . Tamaki, T. Smooth muscle cell-specific hif-1alpha deficiency suppresses angiotensin ii-induced vascular remodelling in mice. *Cardiovasc Res.* 2014;102(3): 460-468.

Inagami, T., & Eguchi, S. Angiotensin ii-mediated vascular smooth muscle cell growth signaling. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33: 619-624.

Ives, H. E., Schultz, G. S., Galardy, R. E., & Jamieson, J. D. Preparation of functional smooth muscle cells from the rabbit aorta. *J Exp Med.* 1978;148(5): 1400-1413.

Jeong, I. K., Oh, D. H., Park, S. J., Kang, J. H., Kim, S., Lee, M. S., . . . Yoo, H. J. Inhibition of nf- $\kappa$ b prevents high glucose-induced proliferation and plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Exp Mol Med.* 2011;43(12): 684-692.

Jiang, T., Chang, Q., Zhao, Z., Yan, S., Wang, L., Cai, J., & Xu, G. Melatonin-mediated cytoprotection against hyperglycemic injury in müller cells. *PLoS One.* 2012;7(12):e5066

Jiang, T., Huang, Z., Lin, Y., Zhang, Z., Fang, D., & Zhang, D. D. The protective role of nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2010;59(4): 850-860.

Johnson, J. A., Johnson, D. A., Kraft, A. D., Calkins, M. J., Jakel, R. J., Vargas, M. R., & Chen, P.-C. The nrf2-are pathway: An indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147: 61-69.

Kanda, A., & Ishida, S. (pro)renin receptor: Involvement in diabetic retinopathy and development of molecular targeted therapy. *J Diabetes Investig.* 2019;10(1): 6-17.

Kang, S. J., You, A., & Kwak, M. K. Suppression of nrf2 signaling by angiotensin ii in murine renal epithelial cells. *Arch Pharm Res.* 2011;34(5): 829-836.

Kanter, J. E., Johansson, F., LeBoeuf, R. C., & Bornfeldt, K. E. Do glucose and lipids exert independent effects on atherosclerotic lesion initiation or progression to advanced plaques? *Circ Res.* 2007;100(6): 769-781.

Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Rabbani, N., & Thornalley, P. J. Increased protein damage in renal glomeruli, retina, nerve, plasma and urine and its prevention by thiamine and benfotiamine therapy in a rat model of diabetes. *Diabetologia.* 2010;53(7): 1506-1516.

Kashiwagi, A., Asahina, T., Ikebuchi, M., Tanaka, Y., Takagi, Y., Nishio, Y., . . . Shigeta, Y. Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by h<sub>2</sub>o<sub>2</sub> in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabetologia.* 1994;37(3): 264-269.

Kassan, M., Galan, M., Partyka, M., Saifudeen, Z., Henrion, D., Trebak, M., & Matrougui, K. Endoplasmic reticulum stress is involved in cardiac damage and vascular endothelial dysfunction in hypertensive mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(7): 1652-1661.

Kawasaki, T., Akanuma, H., & Yamanouchi, T. Increased fructose concentrations in blood and urine in patients with diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25(2): 353-357.

Kim, M. J., Kim, D. W., Lee, B. R., Shin, M. J., Kim, Y. N., Eom, S. A., . . . Choi, S. Y. Transduced tat-glyoxalase protein attenuates streptozotocin-induced diabetes in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;430(1): 294-300.

Kirca, M., Oguz, N., Cetin, A., Uzuner, F., & Yesilkaya, A. Uric acid stimulates proliferative pathways in vascular smooth muscle cells through the activation of p38 mapk, p44/42 mapk and pdgfrbeta. *J Recept Signal Transduct Res.* 2017;37(2): 167-173.

Kirca, M., & Yesilkaya, A. Losartan inhibits egfr transactivation in vascular smooth muscle cells. *Turk J Med Sci.* 2018;48(6): 1364-1371.

Kiyan, Y., Tkachuk, S., Hilfiker-Kleiner, D., Haller, H., Fuhrman, B., & Dumler, I. OxLdl induces inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via urokinase receptor association with cd36 and tlr4. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;66: 72-82.

Koka, V., Wang, W., Huang, X. R., Kim-Mitsuyama, S., Truong, L. D., & Lan, H. Y. Advanced glycation end products activate a chymase-dependent angiotensin ii-generating pathway in diabetic complications. *Circulation*. 2006;113(10): 1353-1360.

Krishna, S. M., Seto, S. W., Jose, R. J., Li, J., Morton, S. K., Biros, E., . . . Gollidge, J. Wnt signaling pathway inhibitor sclerostin inhibits angiotensin ii-induced aortic aneurysm and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(3): 553-566.

Kumari, S., Badana, A. K., G, M. M., G, S., & Malla, R. Reactive oxygen species: A key constituent in cancer survival. *Biomark Insights*. 2018;13: 1177271918755391-1177271918755391.

Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z., & Michel, J. B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: A cell that can take on multiple roles. *cell that can take on multiple roles. Cardiovasc Res*. 2012;95(2): 194-204.

Lavoie, J. L., & Sigmund, C. D. Minireview: Overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*. 2003;144(6): 2179-2183.

Lewis, K. N., Wason, E., Edrey, Y. H., Kristan, D. M., Nevo, E., & Buffenstein, R. Regulation of nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents. *PNAS*. 2015;112(12): 3722-3727.

Li, H., Telemaque, S., Miller, R. E., & Marsh, J. D. High glucose inhibits apoptosis induced by serum deprivation in vascular smooth muscle cells via upregulation of bcl-2 and bcl-xl. *Diabetes*. 2005;54(2): 540-545.

Li, X., & Giachelli, C. M. Sodium-dependent phosphate cotransporters and vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2007;16(4): 325-328.

Li, X., Yang, H. Y., & Giachelli, C. M. Bmp-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2008;199(2): 271-277.

Li, Y., Song, Y.-H., Mohler, J., & Delafontaine, P. Ang ii induces apoptosis of human vascular smooth muscle via extrinsic pathway involving inhibition of akt



phosphorylation and increased fasl expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(5): H2116-H2123.

Liang, B., Wang, S., Wang, Q., Zhang, W., Viollet, B., Zhu, Y., & Zou, M. H. Aberrant endoplasmic reticulum stress in vascular smooth muscle increases vascular contractility and blood pressure in mice deficient of amp-activated protein kinase-alpha2 in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(3): 595-604.

Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347): 317-325.

Lim, S., Lee, S. Y., Seo, H. H., Ham, O., Lee, C., Park, J. H., . . . Hwang, K. C. Regulation of mitochondrial morphology by positive feedback interaction between pkcdelta and drp1 in vascular smooth muscle cell. *J Cell Biochem*. 2015;116(4): 648-660.

Liou, G.-Y., & Storz, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*. 2010;44(5): 479-496.

Liu, X., Luo, F., Pan, K., Wu, W., & Chen, H. High glucose upregulates connective tissue growth factor expression in human vascular smooth muscle cells. *BMC Cell Biol*. 2007;8(1): 1.

Maessen, D. E., Stehouwer, C. D., & Schalkwijk, C. G. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128(12): 839-861.

Marsboom, G., & Archer, S. L. Pathways of proliferation: New targets to inhibit the growth of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2008;103(10): 1047-1049.

McLellan, A. C., Thornalley, P. J., Benn, J., & Sonksen, P. H. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)*. 1994;87(1): 21-29.

McMurray, J. J., Holman, R. R., Haffner, S. M., Bethel, M. A., Holzhauer, B., Hua, T. A., . . . Califf, R. M. Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2010;362(16): 1477-1490.

- Mehta, P. K., & Griendling, K. K. Angiotensin ii cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1): C82-C97.
- Miller, A. G., Tan, G., Binger, K. J., Pickering, R. J., Thomas, M. C., Nagaraj, R. H., . . . Wilkinson-Berka, J. L. Candesartan attenuates diabetic retinal vascular pathology by restoring glyoxalase-i function. *Diabetes.* 2010;59(12): 3208-3215.
- Miller, A. G., Zhu, T., & Wilkinson-Berka, J. L. The renin-angiotensin system and advanced glycation end-products in diabetic retinopathy: Impacts and synergies. *Curr Clin Pharmacol.* 2013;8(4): 285-296.
- Min, D. S., Shin, E. Y., & Kim, E. G. The p38 mitogen-activated protein kinase is involved in stress-induced phospholipase d activation in vascular smooth muscle cells. *Exp Mol Med.* 2002;34(1): 38-46.
- Misra, A., & Bloomgarden, Z. Metabolic memory: Evolving concepts. *J Diabetes.* 2018;10(3): 186-187.
- Miyake, A., Nishimoto, F., Sakata, M., Minekawa, R., Kimura, T., Oskamoto, Y., . . . Walker, C. L. Dual repressive effect of angiotensin ii-type 1 receptor blocker telmisartan on angiotensin ii-induced and estradiol-induced uterine leiomyoma cell proliferation. *Hum Reprod.* 2007;23(2): 440-446.
- Mondaca-Ruff, D., Riquelme, J. A., Quiroga, C., Norambuena-Soto, I., Sanhueza-Olivares, F., Villar-Fincheira, P., . . . Chiong, M. Angiotensin ii-regulated autophagy is required for vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Front Pharmacol.* 2018;9: 1553.
- Mondorf, U. F., Geiger, H., Herrero, M., Zeuzem, S., & Piiper, A. Involvement of the platelet-derived growth factor receptor in angiotensin ii-induced activation of extracellular regulated kinases 1 and 2 in human mesangial cells. *FEBS Lett.* 2000;472(1): 129-132.
- Montezano, A. C., Nguyen Dinh Cat, A., Rios, F. J., & Touyz, R. M. Angiotensin ii and vascular injury. *Curr Hyperten Rep.* 2014;16(6): 431.

Moravski, C. J., Skinner, S. L., Stubbs, A. J., Sarlos, S., Kelly, D. J., Cooper, M. E., . . . Wilkinson-Berka, J. L. The renin-angiotensin system influences ocular endothelial cell proliferation in diabetes: Transgenic and interventional studies. *Am J Pathol.* 2003;162(1): 151-160.

Morcos, M., Du, X., Pfisterer, F., Hutter, H., Sayed, A. A. R., Thornalley, P., . . . Nawroth, P. P. Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* 2008;7(2): 260-269.

Munger, M. A. Use of angiotensin receptor blockers in cardiovascular protection: Current evidence and future directions. *P T.* 2011;36(1): 22-40.

Muto, A., Fitzgerald, T. N., Pimiento, J. M., Maloney, S. P., Teso, D., Paszkowiak, J. J., . . . Dardik, A. Smooth muscle cell signal transduction: Implications of vascular biology for vascular surgeons. *J Vasc Surg.* 2007;Suppl A: A15-24.

Myojo, M., Nagata, D., Fujita, D., Kiyosue, A., Takahashi, M., Satonaka, H., . . . Hirata, Y. Telmisartan activates endothelial nitric oxide synthase via ser1177 phosphorylation in vascular endothelial cells. *PLoS One.* 2014;9(5): e96948.

Natarajan, R., Scott, S., Bai, W., Yerneni, K. K. V., & Nadler, J. Angiotensin ii signaling in vascular smooth muscle cells under high glucose conditions. *Hypertension.* 1999;33(1): 378-384.

Nguyen Dinh Cat, A., Montezano, A. C., Burger, D., & Touyz, R. M. Angiotensin ii, nadph oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(10): 1110-1120.

Nigro, C., Leone, A., Longo, M., Prevezano, I., Fleming, T. H., Nicolò, A., . . . Miele, C. Methylglyoxal accumulation de-regulates *hoxa5* expression, thereby impairing angiogenesis in glyoxalase 1 knock-down mouse aortic endothelial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(1): 73-85.

Nigro, C., Leone, A., Raciti, G. A., Longo, M., Mirra, P., Formisano, P., . . . Miele, C. Methylglyoxal-glyoxalase 1 balance: The root of vascular damage. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1).

Obama, T., Takayanagi, T., Kobayashi, T., Bourne, A. M., Elliott, K. J., Charbonneau, M., . . . Eguchi, S. Vascular induction of a disintegrin and metalloprotease 17 by angiotensin ii through hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ . *Am J Hypertens.* 2015;28(1): 10-14.

Oguz, N., Kirca, M., Cetin, A., & Yesilkaya, A. Effect of uric acid on inflammatory cox-2 and ros pathways in vascular smooth muscle cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 2017;37(5): 500-505.

Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1995;75(3): 487-517.

Owens, G. K., Kumar, M. S., & Wamhoff, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84(3): 767-801.

Ozasa, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Tateno, K., Ito, K., Kudo-Sakamoto, Y., . . . Komuro, I. Notch activation mediates angiotensin ii-induced vascular remodeling by promoting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res.* 2013;36(10): 859-865.

Pagé, E. L., Robitaille, G. A., Pouysségur, J., & Richard, D. E. Induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 2002;277(50): 48403-48409.

Palsamy, P., & Subramanian, S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via nrf2–keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2011;1812(7): 719-731.

Parga, J. A., Rodriguez-Perez, A. I., Garcia-Garrote, M., Rodriguez-Pallares, J., & Labandeira-Garcia, J. L. Angiotensin ii induces oxidative stress and upregulates neuroprotective signaling from the nrf2 and klf9 pathway in dopaminergic cells. *Free Radic Biol Med.* 2018;129: 394-406.

Pasquier, J., Hoarau-Vechot, J., Fakhro, K., Rafii, A., & Abi Khalil, C. Epigenetics and cardiovascular disease in diabetes. *Curr Diab Rep.* 2015;15(12): 108.

Peiró, C., Romacho, T., Azcutia, V., Villalobos, L., Fernández, E., Bolaños, J. P., . . . Sánchez-Ferrer, C. F. Inflammation, glucose, and vascular cell damage: The role of the pentose phosphate pathway. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15(1): 82.

Phillips, S. A., & Thornalley, P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem.* 1993;212(1): 101-105.

Pistrosch, F., Natali, A., & Hanefeld, M. Is hyperglycemia a cardiovascular risk factor? *Diabetes Care.* 2011;34 Suppl 2: S128-31.

Polvani, S., Tarocchi, M., & Galli, A. Ppargamma and oxidative stress: Con(beta) catenating nrf2 and foxo. *PPAR Res.* 2012: 641087.

Rabbani, N., Adaikalakoteswari, A., Rossing, K., Rossing, P., Tarnow, L., Parving, H. H., & Thornalley, P. J. Effect of irbesartan treatment on plasma and urinary markers of protein damage in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Amino Acids.* 2012;42(5): 1627-1639.

Rabbani, N., & Thornalley, P. J. Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(3): 309-317.

Rabbani, N., & Thornalley, P. J. Dicarbonyl proteome and genome damage in metabolic and vascular disease. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(2): 425-432.

Rabbani, N., & Thornalley, P. J. Glyoxalase centennial conference: Introduction, history of research on the glyoxalase system and future prospects. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(2): 413-418.

Rabbani, N., & Thornalley, P. J. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis lc-ms/ms with corroborative prediction in physiological samples. *Nat Protoc.* 2014;9(8): 1969-1979.

Rabbani, N., & Thornalley, P. J. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;458(2): 221-226.

Rabbani, N., Xue, M., & Thornalley, P. J. Activity, regulation, copy number and function in the glyoxalase system. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(2): 419-424.

Rabbani, N., Xue, M., & Thornalley, P. J. Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. *Glycoconj J.* 2016;33(4): 513-525.

Rask-Madsen, C., & King, G. L. Vascular complications of diabetes: Mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab.* 2013;17(1): 20-33.

Regnault, V., Lacolley, P., Nicoletti, A., Michel, J.-B., & Li, Z. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: A cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res.* 2012;95(2): 194-204.

Reiniger, N., Lau, K., McCalla, D., Eby, B., Cheng, B., Lu, Y., . . . Schmidt, A. M. Deletion of the receptor for advanced glycation end products reduces glomerulosclerosis and preserves renal function in the diabetic ove26 mouse. *Diabetes.* 2010;59(8): 2043-2054.

Richard, D. E., Berra, E., & Pouyssegur, J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000;275(35): 26765-26771.

Roifman, I., Beck, P. L., Anderson, T. J., Eisenberg, M. J., & Genest, J. Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: A systematic review. *Can J Cardiol.* 2011;27(2): 174-182.

Ruiz, E., Gordillo-Moscoso, A., Padilla, E., Redondo, S., Rodriguez, E., Reguillo, F., . . . Tejerina, T. Human vascular smooth muscle cells from diabetic patients are resistant to induced apoptosis due to high bcl-2 expression. *Diabetes.* 2006;55(5): 1243-1251.

Ruster, C., Bondeva, T., Franke, S., Tanaka, N., Yamamoto, H., & Wolf, G. Angiotensin ii upregulates rage expression on podocytes: Role of at2 receptors. *Am J Nephrol.* 2009;29(6): 538-550.

Satou, R., Shao, W., & Navar, L. G. Role of stimulated intrarenal angiotensinogen in hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2015;9(4): 181-190.

Savoia, C., Burger, D., Nishigaki, N., Montezano, A., & Touyz, R. M. Angiotensin ii and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Rev Mol Med.* 2011;(13): e11.

Schalkwijk, C. G. Vascular age-ing by methylglyoxal: The past, the present and the future. *Diabetologia.* 2015;58(8): 1715-1719.

Schalkwijk, C. G., Stehouwer, C. D., Engelen, L., Ferreira, I., Persson, F., Rossing, P., . . . Parving, H.-H. Irbesartan treatment does not influence plasma levels of the advanced glycation end products  $\alpha$  (1-carboxymethyl)lysine and  $\alpha$  (1-carboxyethyl)lysine in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. A randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(11): 3573-3577.

Schiffrin, E. L., Lipman, M. L., & Mann, J. F. Chronic kidney disease: Effects on the cardiovascular system. *Circulation.* 2007;116(1): 85-97.

Shepherd, J. T., & Vanhoutte, P. M. The human cardiovascular system: Facts and concepts. 6<sup>th</sup> ed. New York: Raven Press, 1979.

Shin, H.-M., Kim, M.-H., Kim, B. H., Jung, S.-H., Kim, Y. S., Park, H. J., . . . Kim, Y. Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nf-kb without affecting ikb degradation. *FEBS Lett.* 2004;571(1-3): 50-54.

Shinohara, M., Thornalley, P. J., Giardino, I., Beisswenger, P., Thorpe, S. R., Onorato, J., & Brownlee, M. Overexpression of glyoxalase-i in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest.* 1998;101(5): 1142-1147.

Sigmund, C. D. Endothelial and vascular muscle ppargamma in arterial pressure regulation: Lessons from genetic interference and deficiency. *Hypertension.* 2010;55(2): 437-444.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., . . . Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1): 76-85.

Song, B., Jin, H., Yu, X., Zhang, Z., Yu, H., Ye, J., . . . Zhong, J.-C. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates oxidative stress and vsmc proliferation via the jak2/stat3/socs3 and profilin-1/mapk signaling pathways. *Regul Pept.* 2013;185: 44-51.

Steele, M. L., Fuller, S., Patel, M., Kersaitis, C., Ooi, L., & Munch, G. Effect of nrf2 activators on release of glutathione, cysteinylglycine and homocysteine by human u373 astroglial cells. *Redox Biol.* 2013;1: 441-445.

Steinbrecher, U. P., Parthasarathy, S., Leake, D. S., Witztum, J. L., & Steinberg, D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81(12): 3883-3887.

Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., Liu, R.-M., & Hagen, T. M. Decline in transcriptional activity of nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(10): 3381-3386.

Sun, J., Xu, Y., Dai, Z., & Sun, Y. Intermittent high glucose enhances proliferation of vascular smooth muscle cells by upregulating osteopontin. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;313(1): 64-69.

Sun, X., Han, F., Yi, J., Hou, N., & Cao, Z. The effect of telomerase activity on vascular smooth muscle cell proliferation in type 2 diabetes in vivo and in vitro. *Mol Med Rep.* 2013;7(5): 1636-1640.

Tachi, Y., Okuda, Y., Bannai, C., Okamura, N., Bannai, S., & Yamashita, K. High concentration of glucose causes impairment of the function of the glutathione redox cycle in human vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1998;421(1): 19-22.

Tan, G., Jaworski, K., Ninkovic, S., & Wilkinson-Berka, J. L. Valsartan but not atenolol improves vascular pathology in diabetic ren-2 rat retina. *Am J Hypertens.* 2007;20(4): 423-430.



Taye, A., Saad, A. H., Kumar, A. H., & Morawietz, H. Effect of apocynin on nadph oxidase-mediated oxidative stress-lox-1-enos pathway in human endothelial cells exposed to high glucose. *Eur J Pharmacol.* 2010;627(1-3): 42-48.

Thornalley, P. J. Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J.* 1988;254(3): 751-755.

Thornalley, P. J. Glyoxalase i--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 6): 1343-1348.

Thornalley, P. J., & Rabbani, N. Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(3): 318-325.

Thornalley, P. J., Waris, S., Fleming, T., Santarius, T., Larkin, S. J., Winklhofer-Roob, B. M., . . . Rabbani, N. Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16): 5432-5442.

Touyz, R. M., & Schiffrin, E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin ii in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4): 639-672.

Tran, P. O., Parker, S. M., LeRoy, E., Franklin, C. C., Kavanagh, T. J., Zhang, T., . . . Robertson, R. P. Adenoviral overexpression of the glutamylcysteine ligase catalytic subunit protects pancreatic islets against oxidative stress. *J Biol Chem.* 2004;279(52): 53988-53993.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). Ölüm Nedeni İstatistikleri. 2018;sayı: 27620.

Tyson, K. L., Reynolds, J. L., McNair, R., Zhang, Q., Weissberg, P. L., & Shanahan, C. M. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(3): 489-494.

Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., & Griending, K. K. P38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling

pathways activated by angiotensin ii. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem.* 1998;273(24): 15022-15029.

van Zwieten, P. A. Angiotensin ii receptor antagonists (at(1)-blockers, arbs, sartans): Similarities and differences. *Neth Heart J.* 2006;14(11): 381-387.

Vasdev, S., Ford, C. A., Longerich, L., Parai, S., Gadag, V., & Wadhawan, S. Aldehyde induced hypertension in rats: Prevention by n-acetyl cysteine. *Artery.* 1998;23(1): 10-36.

Virmani, R., Robinowitz, M., Geer, J. C., Breslin, P. P., Beyer, J. C., & McAllister, H. A. Coronary artery atherosclerosis revisited in korean war combat casualties. *Arch Pathol Lab Med.* 1987;111(10): 972-976.

Wang, C. C. L., Sorribas, V., Sharma, G., Levi, M., & Draznin, B. Insulin attenuates vascular smooth muscle calcification but increases vascular smooth muscle cell phosphate transport. *Atherosclerosis.* 2007;195(1): e65-e75.

Wang, K., Deng, X., Shen, Z., Jia, Y., Ding, R., Li, R., . . . Jie, W. High glucose promotes vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating proto-oncogene serine/threonine-protein kinase pim-1 expression. *Oncotarget.* 2017;8(51): 88320-88331.

Wang, X., Chang, T., Jiang, B., Desai, K., & Wu, L. Attenuation of hypertension development by aminoguanidine in spontaneously hypertensive rats: Role of methylglyoxal. *Am J Hypertens.* 2007;20(6): 629-636.

Wang, X., Desai, K., Chang, T., & Wu, L. Vascular methylglyoxal metabolism and the development of hypertension. *J Hypertens.* 2005;23(8): 1565-1573.

Wang, X., Desai, K., Clausen, J. T., & Wu, L. Increased methylglyoxal and advanced glycation end products in kidney from spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int.* 2004;66(6): 2315-2321.

Wang, X., Jia, X., Chang, T., Desai, K., & Wu, L. Attenuation of hypertension development by scavenging methylglyoxal in fructose-treated rats. *J Hypertens.* 2008;26(4): 765-772.

Wang, Y. S., Wang, H. Y., Liao, Y. C., Tsai, P. C., Chen, K. C., Cheng, H. Y., . . . Juo, S. H. MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation. *Cardiovasc Res.* 2012;95(4): 517-526.

Westwood, M. E., & Thornalley, P. J. Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation endproduct-modified serum albumins. *J Protein Chem.* 1995;14(5): 359-372.

Winterbourn, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* 2008;4(5): 278-286.

Wolf, G., Schroeder, R., & Stahl, R. A. Angiotensin ii induces hypoxia-inducible factor-1 alpha in pc 12 cells through a posttranscriptional mechanism: Role of at2 receptors. *Am J Nephrol.* 2004;24(4): 415-421.

Wolf, G., Wenzel, U., Burns, K. D., Harris, R. C., Stahl, R. A., & Thaiss, F. Angiotensin ii activates nuclear transcription factor-kappab through at1 and at2 receptors. *Kidney Int.* 2002;61(6): 1986-1995.

World Health Organization (WHO). World Health Statistics (2018). <https://www.who.int>. Erişim Tarihi: 13.03.2019.

Xi, G., Shen, X., Wai, C., White, M. F., & Clemmons, D. R. Hyperglycemia induces vascular smooth muscle cell dedifferentiation by suppressing insulin receptor substrate-1-mediated p53/klf4 complex stabilization. *J Biol Chem.* 2018;294(7): 2407-2421.

Xie, Y., Wang, L., Sun, H., Wang, Y., Yang, Z., Zhang, G., . . . Yang, W. Polysaccharide from alfalfa activates raw 264.7 macrophages through mapk and nf- $\kappa$ b signaling pathways. *Int J Biol Macromol.* 2019;126: 960-968.

Xu, J., Qin, X., Wang, Z., Zhang, X., & Gao, F. High glucose induces vascular contraction through mitochondrial membrane potential (mmp)-miro-mlc pathway. *Faseb J.* 2017;31:1\_supplement, 1080.20-1080.20.

- Xue, M., Rabbani, N., Momiji, H., Imbasi, P., Anwar, M. M., Kitteringham, N., . . . Thornalley, P. J. Transcriptional control of glyoxalase 1 by nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. *Biochem J.* 2012;443(1): 213-222.
- Xue, M., Rabbani, N., & Thornalley, P. J. Glyoxalase in ageing. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(3): 293-301.
- Y. Chan, J., & Kwong, M. Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1517(1): 19-26.
- Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M. J., Roberts, M. S., Tang, M., & Liang, X. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1): 266-266.
- Yao, D., Brownlee, M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (rage) and rage ligands. *Diabetes.* 2010;59(1): 249-255.
- Yoon, H. E., Kim, E. N., Kim, M. Y., Lim, J. H., Jang, I.-A., Ban, T. H., . . . Choi, B. S. Age-associated changes in the vascular renin-angiotensin system in mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2016: 6731093.
- Zahradka, P., Werner, J. P., Buhay, S., Litchie, B., Helwer, G., & Thomas, S. Nf-kappab activation is essential for angiotensin ii-dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(12): 1609-1621.
- Zeng, S., Zhang, Q. Y., Huang, J., Vedantham, S., Rosario, R., Ananthakrishnan, R., . . . Schmidt, A. M. Opposing roles of rage and myd88 signaling in extensive liver resection. *Faseb J.* 2012;26(2): 882-893.
- Zhang, H., Li, H., Xi, H. S., & Li, S. Hif1 $\alpha$  is required for survival maintenance of chronic myeloid leukemia stem cells. *Blood.* 2012;119(11): 2595-2607.
- Zhang, L., Cheng, J., Ma, Y., Thomas, W., Zhang, J., & Du, J. Dual pathways for nuclear factor  $\kappa$ b activation by angiotensin ii in vascular smooth muscle. *Circ Res.* 2005;97(10): 975-982.

Zhang, L., Ma, Y., Zhang, J., Cheng, J., & Du, J. A new cellular signaling mechanism for angiotensin ii activation of nf- $\kappa$ b. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(6): 1148-1153.

Zhang, W., Chen, S., Zhang, Z., Wang, C., & Liu, C. Fam3b mediates high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration via inhibition of mir-322-5p. *Sci Rep.* 2017;7(1): 2298.

Zhao, Y., Vanhoutte, P., & Leung, S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015;129(2): 83-94.

Zhou, L., Li, Y., Hao, S., Zhou, D., Tan, R. J., Nie, J., . . . Liu, Y. Multiple genes of the renin-angiotensin system are novel targets of wnt/beta-catenin signaling. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(1): 107-120.

Zipper, L. M., & Mulcahy, R. T. Inhibition of erk and p38 map kinases inhibits binding of nrf2 and induction of gcs genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;278(2): 484-492.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	Mustafa	Uyruğu	Türk
Soyadı	KIRÇA	Tel no	505 618 8538
Doğum tarihi	1986	e-posta	mkircax@gmail.com

### Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Kayseri Lisesi	2003
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2013
Doktora	Akdeniz Üniversitesi	2019

### İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi	2010-2015
Araştırma Görevlisi	Kütahya Dumlupınar Üniversitesi	2015-2018
Araştırma Görevlisi	Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi	2018-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	76

## Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Vasküler düz kas hücrelerinde Ang II ve EGF uyarımı sonucu p44/42 MAPK yolunun aktivasyonunda AT1R ve EGFR Transaktivasyonunun İncelenmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi	2011-2013
Primer Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Metilglioksalın Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis Üzerine Etkisi	TÜBİTAK	2018-2019

## Yayınlar ve Bildiriler:

- Kirca, M., & Yesilkaya, A. Losartan inhibits egfr transactivation in vascular smooth muscle cells. Turk J Med Sci. 2018;48(6): 1364-1371.
- Kirca, M., Oguz, N., Cetin, A., Uzuner, F., & Yesilkaya, A. Uric acid stimulates proliferative pathways in vascular smooth muscle cells through the activation of p38 mapk, p44/42 mapk and pdgfrbeta. J Recept Signal Transduct Res. 2017;37(2): 167-173.
- Oguz, N., Kirca, M., Cetin, A., & Yesilkaya, A. Effect of uric acid on inflammatory cox-2 and ros pathways in vascular smooth muscle cells. J Recept Signal Transduct Res. 2017;37(5): 500-505.
- Caglar, S., Cetin, A., Uzuner, F., Tokay, A., Kirca, M., & Yesilkaya, A. The role of at1 receptor, ras and nad (p) h oxidase on p38 mapk phosphorylation by angiotensin ii stimulation in primary cultured vascular smooth muscle cells. Turk Biyokim Derg. 2012;37(4): 407-416.

- Oğuz N., Uzuner F., Çetin A., Kirca M., Yeşilkaya A. Uric acid and Ang II induced p44/42 MAPK and p38 MAPK phosphorylations in vascular smooth muscle cells. A preliminary study. The 5th Embo Meeting Advancing The Life Sciences, Amsterdam, Hollanda, 21-24 Eylül 2013, pp.213-213.
- Soylu H., Kirca M., Avcı S., Kiliç L., Özbey Ünlü Ö., Acar N., et al. Effects of Abirateron Acetate and Docetaxel Therapy on Notch1, Jagged1 and Hes1 Expressions in Human Prostate Cancer Cell Lines, 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Antalya, Türkiye, 18-21 Mayıs 2017, pp.315-315.