



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



İN VİTRO HİPERGLİSEMİK ORTAMDA GÖZLENEN EDCF YANITLARINA RHO-KİNAZ VE AMPK SİNYAL YOLAKLARININ KATKISI

Cennet BALÇILAR

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. V. Melih ALTAN**

**ANKARA
2017**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İN VİTRO HİPERGLİSEMİK ORTAMDA GÖZLENEN EDCF
YANITLARINA RHO-KİNAZ VE AMPK SİNYAL
YOLAKLARININ KATKISI**

Cennet BALCILAR

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. V. Melih ALTAN

2. DANIŞMAN

Yrd. Doç.Dr. Işıl ÖZAKCA

**Bu araştırma, TÜBİTAK tarafından 115S995 proje numarasıyla
desteklenmiştir.**

ANKARA

2017

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “ İn vitro hiperglisemik ortamda gözlenen EDCF yanıtlarına Rho-kinaz ve AMPK sinyal yollarının katkısı” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Cennet BALCILAR

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalında Cennet BALCILAR tarafından hazırlanan “İn vitro hiperglisemik ortamda gözlenen EDCF yanıtlarına Rho-kinaz ve AMPK sinyal yollarının katkısı” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/04/2017



Prof. Dr. Nuray ARI

Ankara Üni. Eczacılık Fak.

Jüri Başkanı



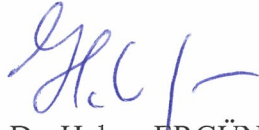
Prof. Dr. V. Melih ALTAN

Bezmi Alem Vakıf Üni. Eczacılık Fak.



Prof. Dr. A. Tanju ÖZÇELİKAY

Ankara Üni. Eczacılık Fak.



Prof. Dr. Hakan ERGÜN

Ankara Üni. Tıp Fak.



Yrd. Doç. Dr. Şahika GÜNER

Ufuk Üni. Tıp Fak.

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. K. Zafer KARAER

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
1.GİRİŞ	1
1.1 EDRF	3
1.2 EDHF	3
1.3 EDCF	4
1.4 Rho-kinaz yolağı	6
1.5 AMPK yolağı	11
1.6 Rho-kinaz ve AMPK etkileşimi	15
2.GEREÇ ve YÖNTEMLER	19
2.1 Kullanılan Gereçler	19
2.1.1 Malzemeler	19
2.1.2 Kimyasal maddeler	20
2.2 Kullanılan Yöntemler	21
2.2.1 Deney hayvanları	21
2.2.2 Deney gruplarının oluşturulması	22
2.2.3 Kan şekeri ve beden ağırlığı ölçümü	22
2.2.4 Organ banyosu deneyleri	23
2.2.4.1 EDCF yanıtlarının değerlendirilmesi	23
2.2.4.2 <i>In vitro</i> hiperglisemik ortam oluşturulması	24
2.2.4.3 AMPK aktivitesinin değerlendirilmesi	25
2.2.4.4 Rho-kinaz aktivitesinin değerlendirilmesi	25
2.2.4.5 Rho-kinaz inhibisyonunun EDCF yanıtları üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi	26
2.2.4.6 AMPK inhibisyonunun EDCF yanıtları üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi	27
2.2.4.7 Rho-kinaz ve AMPK inhibisyonlarının EDCF yanıtları üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi	27
2.2.5 Western-blot deneyleri	28
2.2.5.1 Doku homojenizasyonu	28
2.2.5.2 Protein miktar tayini	29
2.2.5.3 SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	29
2.2.5.4 Proteinlerin membrana transferi	31

2.2.5.5 Poliakrilamid jel boyanması	31
2.2.5.6 Membranlardaki sinyallerin görüntülenmesi ve analizi	32
2.2.6 İstatistiksel analiz	32
3.BULGULAR	33
3.1 Kan şekeri ve beden ağırlığı ölçümü	33
3.2 Organ banyosu deneyleri	33
3.2.1 EDCF-aracılı kasılma yanıtlarının karakterizasyonu	33
3.2.2 <i>In vitro</i> hiperglisemik koşulun EDCF-aracılı kasılma yanıtına etkisi	35
3.2.3 Kısa dönem (4 haftalık) STZ ile indüklenen diabetin endotel-aracılı yanıtlara etkisi	36
3.2.4 4 haftalık diabetin Rho-kinaz etkinliğine etkisi	38
3.2.5 4 haftalık diabetin AMPK etkinliğine etkisi	40
3.2.6 Rho-kinaz inhibitörünün EDCF yanıtlarına etkisi	41
3.2.7 Rho-kinaz inhibitörü Y27632 ve AMPK inhibitörü CC'nin kontrol ve diabetik EDCF yanıtları üzerindeki etkisi	43
3.3 Western blot deneyleri	43
3.3.1 4 haftalık diabetin AMPK/ACC fosforilasyon düzeyleri ile ROCK2 protein düzeyleri üzerindeki olası etkisi	44
3.3.1 <i>In vitro</i> tedavilerin AMPK/ACC fosforilasyon ve ROCK2 protein düzeylerine etkisi	45
4.TARTIŞMA	47
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	57
ÖZET	58
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	69

ÖNSÖZ

Vasküler tonus normal fizyolojik koşullarda endotel-kaynaklı gevşeme faktörleri (EDRF), endotel-kaynaklı hiperpolarizasyon faktörleri (EDHF) ve endotel-kaynaklı kastırıcı faktörler (EDCF) tarafından kontrol edilmektedir. Çalışmamızda vasküler tonusu kontrol eden ve patolojik koşullarda artan EDCF yanıtları değerlendirilmiştir. EDCF etkisi hipertansiyon ve diyabet gibi endotel fonksiyonlarının bozulduğu hastalıkların yanında yaşlanma, hiperglisemi ve hipoksi gibi oksidatif stresin arttığı koşullarda da artmaktadır.

Hiperglisemik ve diyabetik koşullarda EDCF yanıtındaki olası artışın mekanizması, damar düz kas tonusüne etkisi olduğu bilinen/gösterilen iki kinaz yolağının aktivitesi ile değerlendirilmiştir. Bu yolaklardan biri vasküler düz kas kontraksiyonunda rol alan, ayrıca hipertansiyon, koroner vazospazm, inme, aterosklerozis, kalp yetmezliği ve diyabet gibi patolojilerde aktivitesi artan Rho-kinaz yolağıdır. Rho-kinaz inhibitörleri, spontan hipertansif sıçanlarda yapılan çalışmada artmış olan EDCF yanıtı azaltmış (Dennis ve ark., 2010), STZ-diyabetik sıçanlarda ise vasküler kasılmayı inhibe etmiştir (Li ve ark., 2014). Çalışmamızda değerlendirdiğimiz diğer yolak ise hücresel enerji sensörü olarak bilinen, aynı zamanda arteriyel düz kasta endotel bağımlı ve endotel bağımsız gevşemeyi sağlayarak vasküloprotektif etkisi olan AMPK yolağıdır. AMPK aktivasyonu Rho-kinaz aktivasyonunun tersine hipertansiyon ve diyabet gibi hastalıklarda azalmaktadır. STZ-diyabetik sıçanlarda (Wang ve ark., 2009) ve Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) sıçanlarda (Lee ve ark., 2005) yapılan çalışmalarda AMPK aktivasyonunun deprese olması deneysel olarak bu durumu kanıtlamaktadır. Benzer patolojilerde ters etki göstermeleri bu iki kinaz yolağı arasında ilişki olabileceğini

düşündürmektedir. Anjiotensin II ile indüklenen hipertansif farelerde resveratrol tedavisinin AMPK aktivasyonu ile Rho-kinaz aktivitesini azaltarak kan basıncını düzenlemesi (Cao ve ark., 2014), yüksek yağ diyeti verilen farelerde metabolik anomalilerin Rho-kinaz inhibitörü ile AMPK-aracılı olarak düzeltilmesi ve bu olumlu etkilerinin AMPK geni silinmiş farelerde ortadan kalkması (Noda ve ark., 2014) bu iki kinaz yolu arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda öncelikli olarak akut hiperglisemik koşullarda EDCF yanıtlarında nasıl bir değişim olduğu değerlendirilmiştir. Fakat inkübasyon süresinin uzamasıyla EDCF yanıtlarının hem normoglisemik hem de hiperglisemik ortamda beklenenin tersine azalması nedeniyle kısa dönem (4 hafta)- STZ diabetik sıçanlarda çalışmaya devam etmeye karar verilmiştir. Kısa dönem STZ- diabetik sıçanlarda artan EDCF yanıtlarına Rho-kinaz ve AMPK yollarının katkısı araştırılmıştır. Bu iki yolun birbirine etkisi incelenerek mekanizma aydınlatılmaya çalışılmıştır.

TÜBİTAK tarafından desteklenen çalışmamız Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Doktora eğitimim boyunca her daim bana olan inancı, güveniyle ve paylaştığı bilgi birikimiyle doktoramı iyi bir şekilde tamamlamamı sağlayan, bana farmakolojiyi sevdiren, danışman hocam, Sayın Prof. Dr. V. Melih ALTAN'a,

Tez çalışmam süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. A. Tanju ÖZÇELİKAY'a,

Hem iş hayatımda hem bilimsel çalışmalarında her daim destekleriyle yanımda olan, vizyonumu geliştirmeme yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Hakan ERGÜN'e,

Tez çalışmam süresince verdiği destek ve bilgilerle yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Şahika GÜNER'e,

Çalışmam süresince her türlü bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, gerek laboratuvar becerilerimi gerekse bilimsel araştırma yeteneğimi geliştirmemde çok payı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Işıl ÖZAKCA'ya,

Destekleriyle yanımda olan Sayın Prof. Dr. Nuray ARI, Prof. Dr. Gülgün OZANSOY, Prof. Dr. Serap GÜR, Prof. Dr. Arzu ONAY BEŞİKÇİ, Doç. Dr. Ebru ARIOĞLU İNAN'a,

İhtiyacım olan her an yardımına koşan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Sayın Soner MAMUK, Ecz. Ceren UYAR, Ecz. Mesut ÇİÇEK, Başak DUMAN DALKILIÇ'a,

Hayatta en büyük destekçilerim olan eşim Can BALCILAR, babam Prof. Dr. İbrahim BOLAT, annem Saadet BOLAT, kardeşlerim Sami BOLAT ve Betül BOLAT'a,

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro
Ach	Asetilkolin
ADP	Adenozin difosfat
AGE	İleri glukasyon son ürünü (<i>Advanced glycation end product</i>)
AICAR	5- aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleosit
AMP	Adenozin monofosfat
AMPK	Adenozin Monofosfatı Aktive eden Kinaz
ATP	Adenozin trifosfat
CC	Compound C
COX	Siklooksijenaz
dk	Dakika
EDCF	Endotel kaynaklı kasıtırıcı faktörler (<i>endothelium-derived contractile factor</i>)
EDHF	Endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörleri (<i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>)
EDRF	Endotel kaynaklı gevşeme faktörleri (<i>endothelium-derived relaxation factor</i>)
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
GDP	Guanin difosfat
GTP	Guanin trifosfat
MLC	Miyozin hafif zincir (Myosin light chain)
MLCK	Miyozin hafif zincir kinaz (<i>Myosin light chain kinase</i>)

MLCP	Miyozin hafif zincir fosfataz (<i>Myosin light chain phosphatase</i>)
MYPT1	Miyozin fosfataz hedef alt ünite (<i>myosin phosphatase target subunit</i>)
NO	Nitrik oksit
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
Phe	Fenilefrin
PKC	Protein kinaz C
ROCK	Rho-kinaz
STZ	Streptozotosin
TXA ₂	Tromboksan A ₂

ŞEKİLLER

Şekil 1.1 EDRF ve EDHF'nin vasküler düz kas hücresinde gevşeme yanıtı oluşturma mekanizması	4
Şekil 1.2 EDCF üretim ve etki mekanizması	5
Şekil 1.3 ROCK'un sistemik regülatör yapısı ve ana uyarıcıları	8
Şekil 1.4 ROCK'un düzenlediği hücre fonksiyonları	9
Şekil 1.5 Vasküler düz kas hücrelerinde kasılma sinyal mekanizması	10
Şekil 1.6 AMPK'nın α , β ve γ alt ünitelerinin yapısı	12
Şekil 1.7 AMPK'nın düzenlediği metabolik yollar ve hedef proteinler	13
Şekil 1.8 AMPK aktivasyonunun vasküler etkisi ve AMPK'ı aktive eden ajanlar	14
Şekil 1.9 Rho-kinaz aktivitesindeki değişikliğin AMPK aktivitesine etkisi	17
Şekil 3.1 A23187 ile indüklenen EDCF-aracılı kasılma yanıtının karakterizasyonu	34
Şekil 3.2 Farklı koşullarda denenen in vitro hiperglisemi inkübasyonunun A23187-aracılı EDCF yanıtları üzerindeki etkileri	36
Şekil 3.3 4 haftalık diabetin A23187-aracılı EDCF yanıtına ve Phe ile ön kısıtılan damarlarda farklı ajanlarla gevşeme yanıtlarına etkisi	37
Şekil 3.4 Kontrol ve 4 haftalık diabetik hayvanlarda Y27632 (10^{-5} M, 30dk) inkübasyonunun L-NAME (10^{-4} M,30dk) varlığında A23187 aracılı EDCF yanıtına etkisi	39
Şekil 3.5 Farklı konsantrasyondaki Y27632 inkübasyonlarının A23187-aracılı EDCF yanıtları üzerindeki etkileri	40
Şekil 3.6 Kontrol ve 4 haftalık diabetik hayvanlarda AICAR (500 μ M, 30dk) inkübasyonunun L-NAME (10^{-4} M,30dk) varlığında A23187 aracılı EDCF yanıtına etkisi	41
Şekil 3.7 Y27632 ve CC inkübasyonlarının A23187-aracılı EDCF yanıtlarına etkisi	42
Şekil 3.8 4 haftalık diabetin AMPK ve ACC fosforilasyonları ile ROCK2 protein düzeyleri üzerindeki etkisi	45
Şekil 3.9 4 haftalık diabet ve kontrol grubuna ait torasik aort preparatlarında in vitro L-NAME (10^{-4} M, 30 dk) ve Y27632 (kontrol için: 10^{-7} M, 30 dk; diabet için: 10^{-8} M, 30 dk) inkübasyonları varlığında CC (20 μ M, 40 dk) inkübasyonunun fosforile AMPK ve ACC ile ROCK2 protein düzeyleri üzerindeki etkisi	46

1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus prevalansı dünya genelinde obezitenin artması, fiziksel aktivitenin azalması, popülasyonun yaş ortalamasının artması gibi sonuçlara bağlı olarak artmaktadır (Steven ve Haffner, 2006). Diabet prevalansı 2000 yılında 177 milyon (%2,8) olarak tespit edilmiş ve 2030 yılında bu sayının ikiye katlanarak 366 milyon (%4,4) olması beklenmektedir (Wild ve ark., 2004).

Diabetes Mellitus karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmasında bozukluklara sebep olan metabolik bir hastalıktır. Diabetes Mellitus tip 1 ve tip 2 olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Tip 1 diabette pankreasın β hücrelerinin harabiyeti sonucu insülin üretiminde problem oluşmaktadır. Tip 2 diabette ise insülin üretiminde problem olmamasına karşın hedef hücrelerde insülin direnci vardır. Diabetin insüline-bağımlı (tip 2) ve insüline-bağımlı olmayan (tip 1) tüm formları hiperglisemiyle karakterizedir (Giacco ve Brownlee, 2010).

Diabet kaynaklı mortalite ve morbiditenin en önemli nedenleri mikrovasküler (retinopati, nöropati, nefropati) ve makrovasküler (kardiyovasküler ve serebrovasküler) komplikasyonlardır (Csanyi ve ark., 2007). Kronik hiperglisemi diabetik komplikasyonun gelişmesinde ana etken olarak tanımlanmaktadır (Qian ve ark., 2010).

Hipergliseminin hücre hasarına neden olmasının altında yatan mekanizmalar şu şekilde sıralanabilir (Giacco ve Brownlee, 2010):

1. glukoz ve diğerk şekerlerin akışı (flux) ile polyol yolağı artışı
2. intraselüler ileri glikasyon son ürünlerinin (*advanced glycation end products*, AGEs) artışı
3. AGE reseptör ekspresyonunun ve bu reseptörü aktive eden ligandların artışı
4. protein kinaz C (PKC) izoformunun aktivasyonu
5. heksozamin yolağının aşırı aktivitesi

Hipergliseminin neden olduğı hücresele problemler ile ilişkilendirilen ve yukarıda belirtilen mekanizmaların ana etkeni olarak reaktif oksijen ürünlerinin (*reactive oxygen species*) mitokondriyel aşırı üretimi gösterilmektedir (Brownlee, 2005).

Hiperglisemi yaptığı hasar sonucu vasküler homeostaziste birçok değışiklik meydana getirmektedir. Hipergliseminin indüklediğı bu değışiklerden biri de nitrik oksit (NO)-bağımlı vazodilatasyonun azalmasıyla karakterize olan endotel fonksiyon bozukluğudur (Steingberg ve ark., 2000). Endotel fonksiyon bozukluğunun, diabetik hasta ve deney modelinde yapılan birçok çalışmada makro- ve mikroanjiyopatide anahtar rol oynayabileceğı gösterilmiştir (De Viriesse ve ark., 2000; Feletou ve Vanhoutte, 2004). Aynı zamanda tip 1 ve tip 2 diabetik insan ve deneysel modelde endotel kaynaklı gevşemenin bozulduğı gösterilmiştir (De Viriesse ve ark., 2000).

Vasküler tonus fizyolojik koşullarda endotel kaynaklı gevşeme faktörleri (*endothelium-derived relaxation factor*, EDRF), endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörleri (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF) ve endotel kaynaklı kastırıcı faktörler (*endothelium-derived contractile factor*, EDCF) tarafından kontrol edilmektedir (Feletou ve Vanhoutte, 2006; Pieper, 1998). Sözü edilen faktörler arasında belirli bir denge bulunmaktadır. Bu faktörlerin arasındaki dengede meydana gelen değışiklik(ler) ise kan basıncında değışime neden olmaktadır (Dennis ve Rush., 2010). Tip 2 diabette gözlenen endotel-kaynaklı gevşeme yanıtındaki azalmanın EDRF üretiminin azalmasının bir sonucu olabileceğı gibi EDCF düzeyindeki artışın da etkili olabileceğı ileri sürülmektedir (Matsumoto ve ark., 2006).

EDCF'nin etkisi endotel fonksiyonlarında bozulmanın görüldüğü hipertansiyon, kronik diabet gibi patolojilerin yanı sıra reaktif oksijen ürünlerinin üretiminin arttığı akut hiperglisemi, hipoksi, yaşlanma gibi durumlarda daha fazla görülmektedir (Vanhoutte ve ark., 2005).

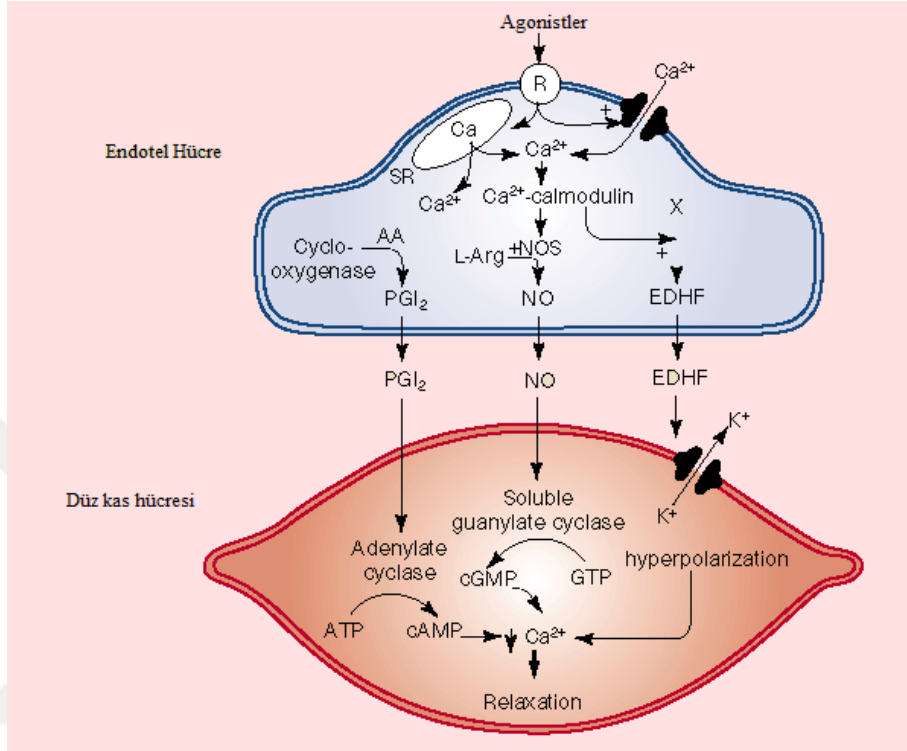
1.1. EDRF

İlk kez 1980'de Furchgott ve Zawadzki, vasküler dokuda asetilkolin (Ach) ile gevşeme için endotel hücrelerinin gerekli olduğunu ve vasküler düz kasta endotelden salıverilen EDRF' nin gevşemeyi sağladığını kanıtlamışlardır (Furchgott ve Zawadzki, 1980). Endotel hücrelerinden nörotransmitterler, hormonlar, mekanik gerime yanıt olarak hücrenin bulunduğu koşula göre EDRF ve/veya EDCF salıverilmektedir (Shen ve ark., 2003). EDRF, NO ve prostaglandin I₂ (prostasiklin, PGI₂)'i kapsamaktadır (Kang, 2014). EDRF, K⁺ kanallarının aktivasyonu aracılığıyla vasküler düz kas gevşemesini indüklemektedir. PGI₂ ve NO Şekil 1.1'de görüldüğü gibi sekonder ulak olan siklik AMP (cAMP) ve siklik GMP'nin (cGMP) hücre içi konsantrasyonlarındaki artış ile gevşemeye aracılık etmektedirler (Shen ve ark., 2003).

1.2. EDHF

EDHF de EDRF gibi vasküler düz kasta gevşemeye aracılık etmektedir (Ohashi, 2012). EDHF'nin vazorelaksan etkinliğinin moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da K⁺ kanallarının açılması ile oluşan hiperpolarizasyonla gevşeme yanıtına aracılık ettiği düşünülmektedir (Şekil 1.1)

(Ohashi, 2012). EDHF, PGI_2 ve NO blokajı yapıldıktan sonra görülen endotel aracılı gevşeme yanıtı olarak tanımlanmaktadır (Ohashi, 2012).

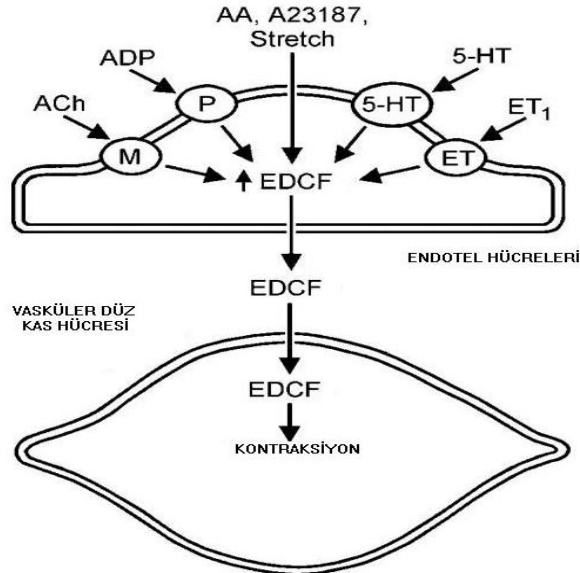


Şekil 1.1 EDRF ve EDHF'nin vasküler düz kas hücresinde gevşeme yanıtı oluşturma mekanizması. AA: araşidonik asit, NOS: NO sentaz, L-Arg: L-arginin, R: membran reseptörü, SR: sarkoplazmik retikulum, X: bilinmeyen prekürsör. Şekil Vanhoutte (1998)'den adapte edilerek alınmıştır.

1.3. EDCF

Endotel-kaynaklı kasılma siklooksijenazların (COX) ürünleri aracılığıyla olmaktadır (Matsumoto ve ark., 2006). COX'lar araşidonik asidi endoperoksitlere çevirmektedir. Endoperoksitler de uygun enzimlerle prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin D₂ (PGD₂), prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), PGI_2 ve tromboksan A₂ (TXA₂) gibi çeşitli prostaglandinlere dönüştürülmektedir. Bu prostanoidler vasküler düz kaslardaki G proteinine kenetli bir reseptör olan tromboksan-prostanoid (TP) reseptörlerini aktive ederek EDCF yanıtını oluşturmaktadır. TP reseptör aktivasyonu

vasküler düz kasta kasılmaya neden olmaktadır. Bu kasılma yanıtı; reseptör-aracılı ve voltaj-bağımlı Ca^{+2} kanallarının açılmasıyla vasküler düz kas hücrelerine Ca^{+2} girişinin artması sonucu oluşmaktadır (Vanhoutte ve ark., 2005). *In vitro* koşullarda EDCF yanıtları (i) COX inhibitörleriyle yapılan inkübasyon ile endotel hücrelerinde prostanoid üretimi inhibe edilerek ve (ii) TP reseptör antagonistleriyle yapılan inkübasyon ile vasküler düz kasta bu reseptörlerin prostanoidler ile uyarılması engellenerek ortadan kaldırılmaktadır (Denniss ve ark., 2010). Bu sonuçlar COX ürünleri ve TP reseptörlerinin EDCF-aracılı yanıtın sorumlu olduklarını kanıtlamaktadır (Dennis ve Rush, 2010). EDCF yanıtı, endotelial M_3 -muskarinik reseptörleri uyaran Ach, pürinerjik reseptörleri aktive eden adenozindifosfat (ADP) gibi reseptör üzerinden etki gösteren vazoaktif agonistlerle tetiklenebilmektedir (Vanhoutte ve ark., 2005). Bu vazoaktif agonistler gibi hücre içine Ca^{+2} girişini artıran bir ajan olan Ca^{+2} iyonoforu A23187 de EDCF yanıtının oluşumunu tetiklemektedir. Deneysel olarak *in vitro* koşullarda EDCF yanıtını değerlendirmek için bu ajanlar kullanılmaktadır (Şekil 1.2).



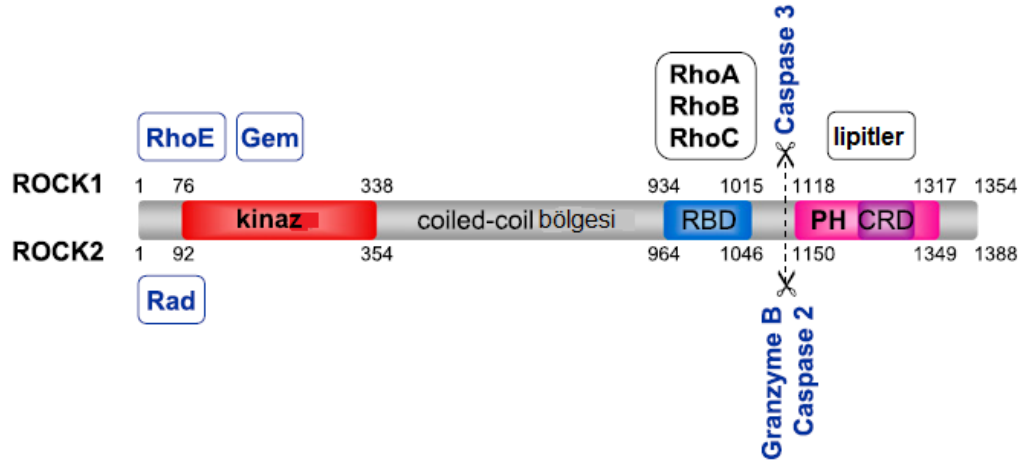
Şekil 1.2 EDCF üretim ve etki mekanizması. Bazı nöromediyatörlerin endotel hücrelerde kendi reseptörlerine bağlanması ile Ca^{+2} iyonoforu olan A23187'ye, araşidonik asit (AA)'e ve gerime maruziyet sonucunda EDCF üretiminin artması vasküler düz kasta kasılmaya neden olmaktadır. Ach: Asetilkolin, ADP: Adenozin difosfat, AA: araşidonik asit, ET1: endotelin-1, M: Muskarinik reseptör, P: Pürinerjik reseptör, 5-HT: 5-hidroksi triptamin. Şekil Vanhoutte ve ark. (2005)'dan adapte edilerek alınmıştır.

TP reseptörleri G_q-proteinine kenetli reseptör ailesinin üyelerindendir. TP reseptör aktivasyonu ile gerçekleşen endotel-kaynaklı kasılma yanıtları, Rho-kinaz-aracılı miyofilament duyarlılığının artışıyla ilişkilendirilmektedir (Denniss ve ark., 2010).

1.4. Rho-kinaz yolağı

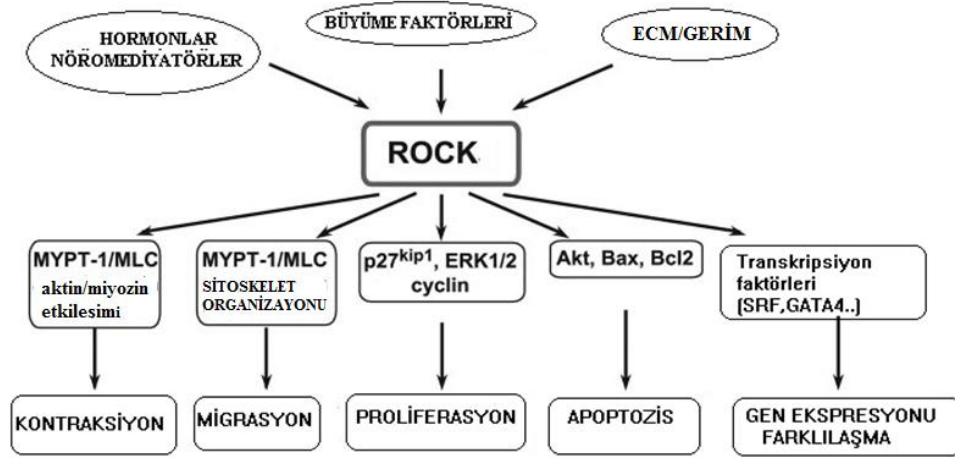
Membran reseptörlerinin hücreiçi sinyal yollarına küçük GTP-bağı proteinler aracılık etmektedir. Bu GTP-bağı proteinler *Rho*, *Ras*, *Rab*, *Sar1/Arf* ve *Ran* ailelerinden oluşmaktadır (Shimokawa ve Takeshita, 2005). Memelilerde Rho ailesinin RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE ve RhoG izoformu tanımlanmıştır (Loirand ve ark., 2006). RhoA, Rho protein ailesinin en çok tanınan üyesidir. Aktin organizasyonunda, kontraksiyonda, motilitede, proliferasyonda ve apoptozisde rol almaktadır (Şekil 1.4). RhoA-aracılı hücresel yanıtın oluşması için; inaktif GDP ve aktif GTP etkileşiminde rho-kinaz aşağı akım (*downstream*) efektörü olarak anahtar rol oynamaktadır (Loirand ve ark., 2006). RhoA, guanin nükleotidinin GDP'den GTP'e dönüşmesiyle aktif hale gelmektedir. GTP-az aktive eden proteinler intrinsik GTP-az aktivitesini uyarmakta, RhoA'ı ise inaktive etmektedir. Rho-kinazlar (ROCK) RhoA'nın ilk ve en önemli efektörleridir (Loirand, 2015). Rho-kinazlar AGC ailesinden olan bir serin/treonin kinazdır. ROCK'ın ROCK1 ve ROCK2 olmak üzere iki izoformu tanımlanmıştır. ROCK α olarak da bilinen ROCK2 ilk tanımlanan izoformdur. ROCK1 (ROK β , p160ROCK) izoformu ise daha sonradan keşfedilmiştir. İnsan ROCK1 ve ROCK2 geni sırasıyla 18. kromozom (18q11.1) ve 2. kromozoma (2p24) lokalize olmuştur (Loirand, 2015). Bu iki izoform farklı dokularda farklı miktarda bulunmaktadır. ROCK1 çoğunlukla karaciğerde, akciğerde, böbrekte, dalakta, testiste eksprese olmaktadır. ROCK2 kalpte, kasta ve beyinde bulunmaktadır. ROCK1 ve ROCK2' nin hücrealtı düzeyde (*subcellular*)

lokasyonları da farklıdır. ROCK2 sitoplazmada bulunmaktadır. ROCK2 vimentin ve aktin stres fiberleriyle ilişkili olup, plazma membranına transloke olabilmektedir (Leung ve ark., 1995; Sin ve ark., 1998; Chen ve ark., 2002). ROCK1 endotel hücrelerde catenin/ E-cadherin kompleksi ve mikrotübül organizasyon merkezi ile ilişkilidir (Chevrier ve ark., 2002; Nishimura ve Takeichi, 2008). ROCK'un yapısında 3 majör bölge bulunmaktadır. Bunlar N-terminalde kinaz bölgesi, ortada Rho-bağlanma bölgesinin bulunduğu *coiled-coil* bölgesi ve C-terminalde *putative pleckstrin* homolog bölgesidir (Şekil 1.3) (Loirand, 2015). *Pleckstrin* homolog bölgesi lipidlerle (araşidonik asit, fosfatidilinozitol-fosfat) ile etkileşerek ROCK aktivasyonuna neden olmaktadır (Feng ve ark., 1999; Yoneda ve ark., 2005; Lowery ve ark., 2007; Wen ve ark., 2008). ROCK C terminalden *caspase-3* ve *granzyme B* tarafından enzimatik olarak parçalanmaktadır (Sebbagh ve ark., 2001, 2005; Sapet ve ark., 2006). ROCK1 *caspase-3* ile ROCK2 ise *granzyme B* ile etkileşmektedir (Shimokawa ve ark., 2016). ROCK1 ve ROCK2 yapısal olarak farklı olmalarına karşın fonksiyonel olarak aralarında net olarak farklılık tanımlanmamıştır (Hahmann ve Schroeter, 2010). ROCK izoformlarının *in vivo* fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacıyla ROCK1⁻ ve ROCK2⁻ eksik farelerde çalışılmıştır. ROCK1⁻ eksik olan fareler göz kapakları açık olarak doğmaktadır (Shimizu ve ark., 2005). ROCK2⁻ eksik olan farelerde prenatal fonksiyon bozukluğu ve fetal ölüm görülmektedir (Thumkeo ve ark., 2003; Noma ve ark., 2008). Kardiyovasküler sistemde genellikle bulunan ROCK izoformu olan ROCK2'nin vasküler düz kasa spesifik olarak *knockout* edildiği farelerde hipoksiyle indüklenen pulmoner hipertansiyon görülmektedir (Shimizu ve ark., 2013). *Wild* tip farelerde ise akciğer dokusunda kronik hipoksiyle ROCK2 ekspresyonunun ve ROCK aktivitesinin arttığı görülmekte ve bu durum pulmoner hipertansiyon ve sağ ventrikül hipertrofisine neden olmaktadır (Shimizu ve ark., 2013).



Şekil 1.3 ROCK'un sistemik regülatör yapısı ve ana uyarıcıları. ROCK proteini amino terminalinde kinaz bölgesini, orta kısmında RBD'yi içeren *coiled-coil* bölgesini, CRD'yi içeren *plekstrin* homolog bölgesini bulundurmaktadır. CRD, sistein-zengin bölge (*cysteine-rich domain*); RBD, Rho bağlanma bölgesi (*Rho-binding domain*). Şekil Loirand, (2015)'den adapte edilerek alınmıştır.

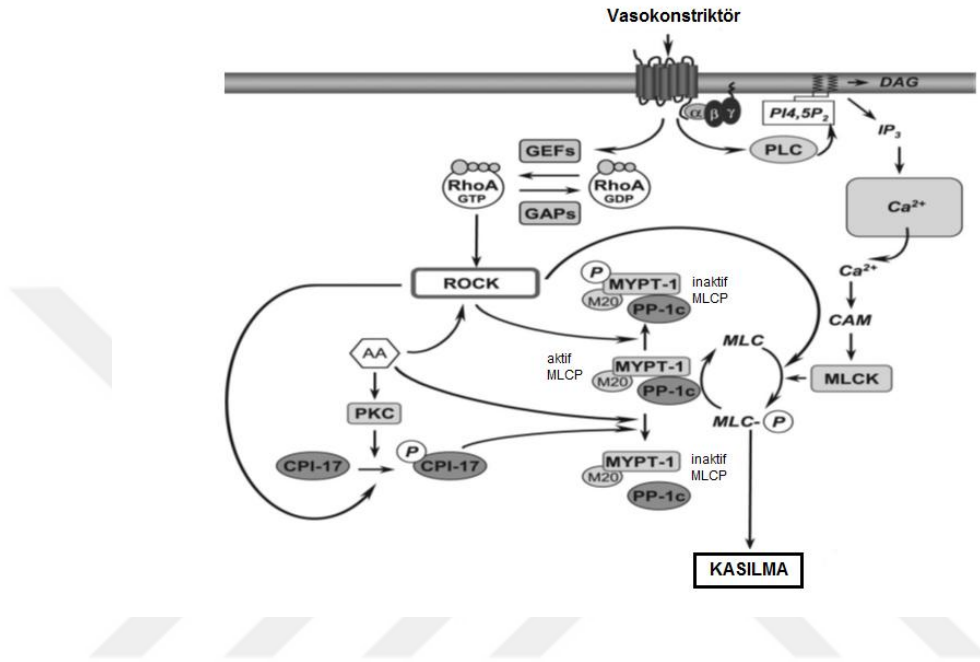
RhoA/ Rho ile ilişkili protein kinaz (*Rho associated protein kinase*, ROCK) (Rho-kinaz) yolağının aktivitesi hipertansiyon, koroner vazospazm, arteriosklerozis, iskemi/reperfüzyon hasarı, pulmoner hipertansiyon, inme, arteriosklerozis, kalp yetmezliği gibi hastalıkların yanı sıra diabette de artmaktadır (Zhou ve Li, 2012; Shimokawa ve ark., 2016). Bu durum Rho-kinaz'ı yeni önemli terapötik hedef haline getirmektedir (Zhou ve Li, 2012).



Şekil 1.4 ROCK hormonlar veya nöromediyatörler, büyüme faktörleri, ECM (ekstraselüler matriks) veya gerim stimülasyonundan sonra önemli hücre fonksiyonlarını düzenlemektedir. MYPT-1: miyozin fosfotaz hedef alt ünite, MLC: miyozin hafif zincir, ERK: ekstraselüler sinyal regüle eden kinaz. Şekil Loirand ve ark. (2006)’den adapte edilerek alınmıştır.

Rho-kinaz hedefleri olan myosin fosfataz hedef alt ünite (*myosin phosphatase target subunit*, MYPT-1), myosin hafif zinciri (*myosin light chain*, MLC) ve kalponin düz kas hücre kasılmasında anahtar rol oynamaktadır. MYPT-1; düz kas kasılmasında Rho-kinaz-aracılı Ca^{+2} duyarlılığındaki artışta majör efektördür (Denniss ve ark., 2010). MLC, C-kinaz ile artan protein kinaz-1 inhibitörü (*C-kinase potentiated Protein phosphatase-1 Inhibitor*, CPI-17) ve kalponin fosforilasyonu da Rho-kinaz-aracılı düz kas kasılmasına katkıda bulunmaktadır. Vasküler düz kasta MLC, Ca^{+2} -kalmodulin-bağımlı kinazın aktive ettiği miyozin hafif zincir kinaz (*myosin light chain kinase*, MLCK) ile fosforile edilip, Ca^{+2} -bağımsız myosin hafif zincir fosfataz (*myosin light chain phosphatase*, MLCP) tarafından defosforile edilir. ROCK-aracılı MYPT1’in Thr697 ve Thr855 fosforilasyonu MLCP’nin katalitik aktivitesini inhibe etmekte ve MLC fosforilasyonunu artırmaktadır (Loirand, 2015). MLCK aktivasyonu ile fosforile olan MLC aracılığıyla sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu artmakta ve vasküler düz kas kasılması gerçekleşmektedir. (Şekil 1.5) (Loirand ve ark., 2006). Her iki ROCK izoformun da MLCP aktivitesi ve MLC fosforilasyonunu

regüle etmesine rağmen sadece ROCK2 MYPT-1'e direkt bağlanmaktadır (Wang ve ark., 2009).



Şekil 1.5 Vasküler düz kas hücrelerinde kasılma sinyal mekanizması. Kasılma 20-kDa MLC fosforilasyonunun artmasıyla indüklenmektedir. G proteinine kenetli reseptörün vazokonstriktör ajanla uyarılması artan hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonuyla MLCK uyarımını sağlayarak MLCP'i inhibe etmektedir. MLCP 3 alt birimden oluşmaktadır. Sözü edilen birimler katalitik altbirim olan PP-1c, MYPT-1 ve 20-kDa altbirim M20'dir. Vazokonstriktör ajanla indüklenen MLCP inhibisyonu RhoA ve Rho-kinaz aktivasyonunu artırmaktadır. PKC, protein kinaz C; GEF, guanin nükleotid exchange faktör; GAP, GTPaz-aktive eden protein; PLC, fosfolipaz C; DAG, diasilgliserol; PI4,5P2, fosfotidilinozitol 4,5-bifosfat; IP3, inozitol 1,4,5-trifosfat; CAM, kalmodulin. Şekil Loirand ve ark. (2006)'dan adapte edilerek alınmıştır.

Rho-kinaz endotel hücrelerinden NO üretimini inhibe etmektedir. RhoA/ROCK aktivasyonu endotel NO sentaz (eNOS) ekspresyonunu, eNOS mRNA stabilitesini inhibe ederek azaltmaktadır (Loirand, 2015). İnsan umbilikal ven endotelial hücre (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) hattında Rho-kinaz inhibitörü Y27632 (10 μ mol/L) inkübasyonu ile yapılan tedavide eNOS ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Eto ve ark., 2001). Rho-kinaz inhibitörlerinden sadece fasudil serebral vazospazm endikasyonunda klinik kullanım için onay almıştır

(Surma ve ark., 2011). Fasudile ek olarak, Y-27632 de etkinliği kanıtlanmış ve birçok çalışmada kullanılan bir Rho-kinaz inhibitörüdür (Surma ve ark., 2011).

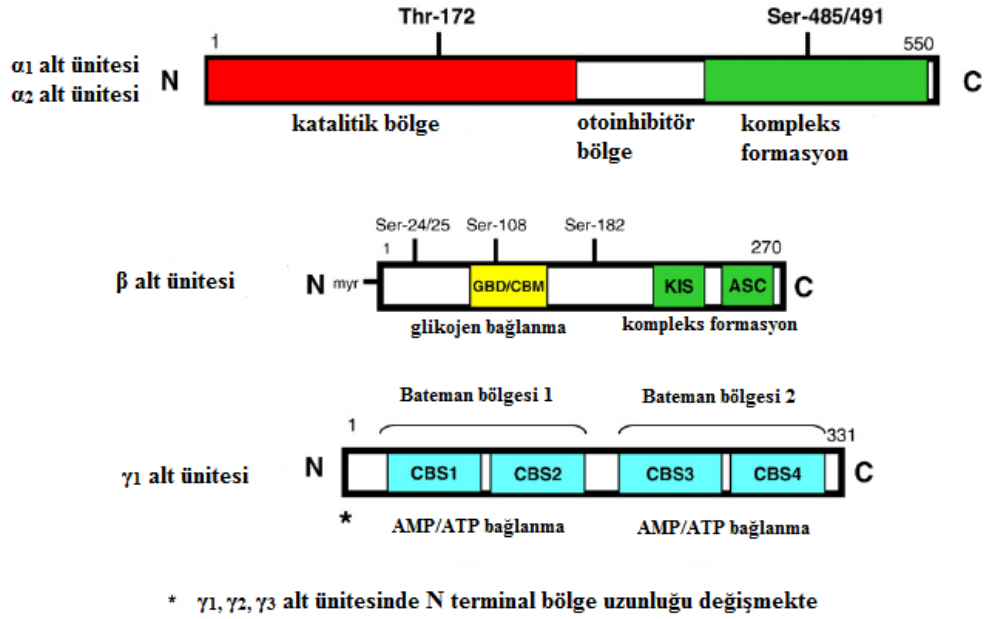
EDCF yanıtına paralel olarak Rho-kinaz yolak aktivitesinin de arttığı gösterildiği çalışmalar bulunmaktadır. Bu durumun gösterildiği çalışmalara örnek olarak, spontan hipertansif sıçanlarda rho-kinaz inhibitörlerinin, karotid arterde artan EDCF yanıtını *in vitro* koşullarda inhibe etmesi (Dennis ve ark., 2010) ve STZ-diabetik sıçanlarda 16 hafta süresince uygulanan fasudil tedavisinin (5 mg/kg/gün, oral) vasküler kasılma yanıtını azaltması (Li ve ark., 2014) verilebilir.

1.5 AMPK yolağı

EDCF ile ilişkili olabileceği hipotez edilen bir başka yolak ise AMPK (5' adenosin monofosfat ile aktive olan protein kinaz)'dır. AMPK terimi ilk defa 1988 yılında Sim ve Hardie tarafından ortaya atılmıştır (Sim ve Hardie, 1988). Bir serin/treonin kinaz olan AMPK tüm hücrel olayları düzenlemekte ve hücrenin enerji sensörü olarak değerlendirilmektedir (Ewart ve Kennedy, 2011).

AMPK α , β ve γ olarak tanımlanan 3 alt üniteden oluşmaktadır. α ve β alt ünitesinin 2 izoformu γ alt ünitesinin ise 3 izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar farklı dokularda farklı ekspresyon düzeylerinde farklı yerleşim göstermektedirler. Her izoform farklı bir gen tarafından kodlanmaktadır. α , katalitik alt ünite; β ve γ ise, regülatör alt ünitelerdir. α alt ünitesi N terminalde katalitik kinaz bölgesini, C terminalde ise regülatör bölge olan AMP yokluğunda aktivasyonun engellendiği otoinhibitör bir bölge ve β , γ alt ünitesine bağlanan bölgeden oluşmaktadır (Şekil 1.6). α_1 alt ünitesi adipoz dokuda, pankreas adacık hücrelerinde, endotelde ve vasküler düz kasta, α_2 alt ünitesi ise iskelet ve kalp kasında baskındır. β alt ünitesi, α

ve γ alt ünitelerinin bağlanmasını sağlayan bir iskelet görevi görmektedir. γ alt ünitesi ise AMP ve ATP' nin bağlanma bölgelerini taşımaktadır (Ewart ve Kennedy, 2011).

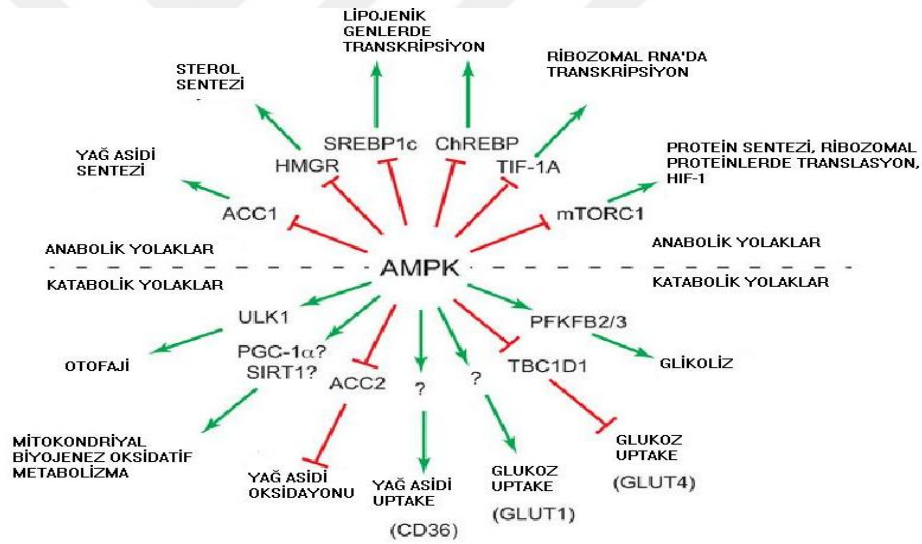


Şekil 1.6 AMPK' nın α , β ve γ alt ünitelerinin yapısı. Şekil Ewart ve Kennedy, (2011)'den adapte edilerek alınmıştır.

AMPK post-transyonel modifikasyon ile alosterik olarak regüle edilmektedir. AMPK aktivasyon mekanizması; AMP ve/veya ATP (adenozin trifosfat)' nin γ alt ünitesine bağlanmasıyla α katalitik alt ünitesinde konformasyonel değişiklik olması sonucunda α alt ünitesinin Thr172 ile fosforilasyonu ile açıklanmaktadır. ATP, AMP ve ADP'nin γ alt ünitesine bağlanmasını kompetitif olarak inhibe etmektedir. AMPK, AMP/ATP veya ADP/ATP oranına göre aktive olmaktadır (Jeon, 2016).

AMPK aktivitesi ATP'ye ihtiyacın arttığı egzersiz, açlık, inflamasyon ve hipoksi gibi durumlarda artmaktadır. AMPK lipid, karbonhidrat ve protein metabolizmasını etkilemektedir. AMPK aktivasyonu yağ asidi oksidasyonunu,

karaciğerde kolesterol üretimini, yağ asidi sentezinin azaltılmasını ve adipositlerde lipolizisin artmasını sağlayarak lipid metabolizmasını düzenlemektedir. AMPK'nın karbonhidrat metabolizması üzerindeki etkisi ise AMPK aktivasyonu ile birlikte iskelet kasında ve kalpte glukoz alımının (*uptake*) artması, karaciğerde glukoneogenezisin uyarılması ve pankreastaki β hücrelerinden insülin sekresyonunun düzenlenmesi şeklindedir. AMPK aktivasyonu bu etkilerin yanı sıra kalpte ve vasküler endotelde NO üretimini artırmaktadır. Uzun süreli AMPK aktivasyonu MEF-2 (*Myocyte Enhancer Factor-2*), mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) ve eEF2 (*Eukaryotic Elongation Factor 2*) gibi transkripsiyon faktörlerinin modülasyonu ile gen ekspresyonu ve protein sentezinde değişikliklere neden olabilmektedir (Şekil 1.7) (Hardie ve Alessi, 2013).

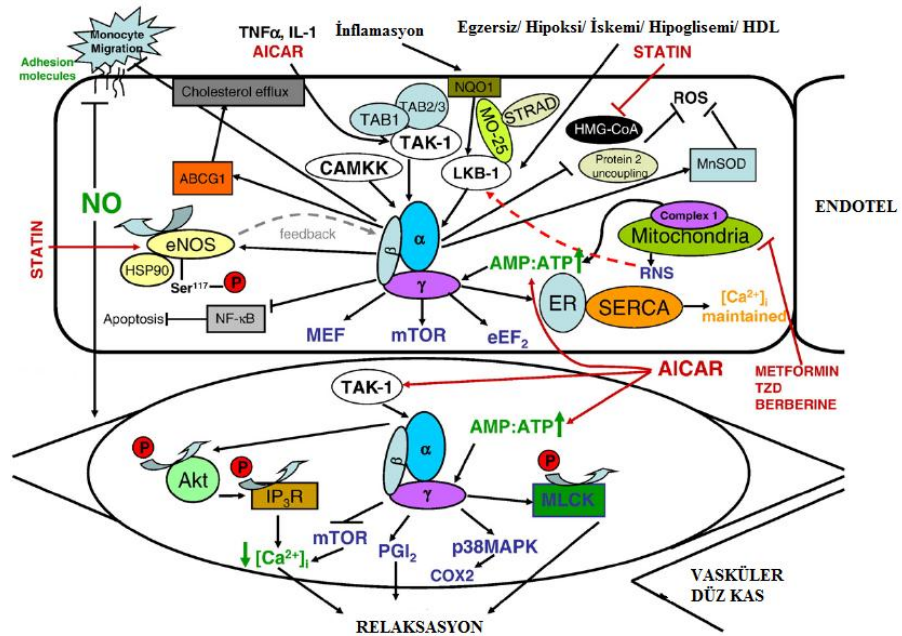


Şekil 1.7 AMPK'nın düzenlediği metabolik yollar ve hedef proteinler (AMPK anabolik olayları azaltmakta, katabolik olayları ise artırmaktadır. Şekil Hardie ve Alessi, (2013)' den alınarak adapte edilmiştir.

Antidiabetik ajan olarak kullanılan metformin, tiazolidindionlar, GLP-1 (*Glukagon like peptid-1*, Glukagon benzeri peptid-1) agonistleri, DPP-4 (dipeptidil peptidaz-4) inhibitörleri, statinler, adiponektin ve leptin hormonu AMPK aktivasyonu artırmaktadır (Ford ve Rush, 2011; Batchuluun ve ark., 2014). Deneysel

olarak AMPK aktivasyonu için 5- aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleosit (AICAR), inhibe etmek amacıyla ise dorsomorfin (Compound C) kullanılmaktadır (Ford ve Rush, 2011).

AMPK arterial düz kasta eNOS aktivitesini artırarak NO-aracılı endotel-bağımlı gevşemeyi artırmaktadır. AMPK endotele bağımlı olmayan gevşemeyi ise vasküler düz kas hücrelerinde MLCK'nın hücre içi Ca^{+2} 'a olan duyarlılığını azaltarak sağlamaktadır (Şekil 1.8). Böylece vasküloprotektif etki göstermektedir (Ford ve Rush, 2011; Goirand ve ark., 2007). Metformin, tiazolidindionlar ve statinler gibi terapötik ajanların vazoprotektif etkilerinin de AMPK aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Ewart ve Kennedy, 2011). Spontan hipertansif sıçanlarda AMPK aktivasyonu endotel-bağımlı NO-aracılı gevşemeye neden olmaktadır (Ford ve Rush, 2011; Ford ve ark., 2012). AMPK aynı zamanda fare aort preparatında endotelden bağımsız olarak vasküler düz kasta gevşemeye neden olmaktadır (Goirand ve ark., 2007).



Şekil 1.8 AMPK aktivasyonunun vasküler etkisi ve AMPK'ı aktive eden ajanlar. Şekil Ewart ve Kennedy, (2011)' den alınarak adapte edilmiştir.

1.6 Rho-kinaz ve AMPK etkileşimi

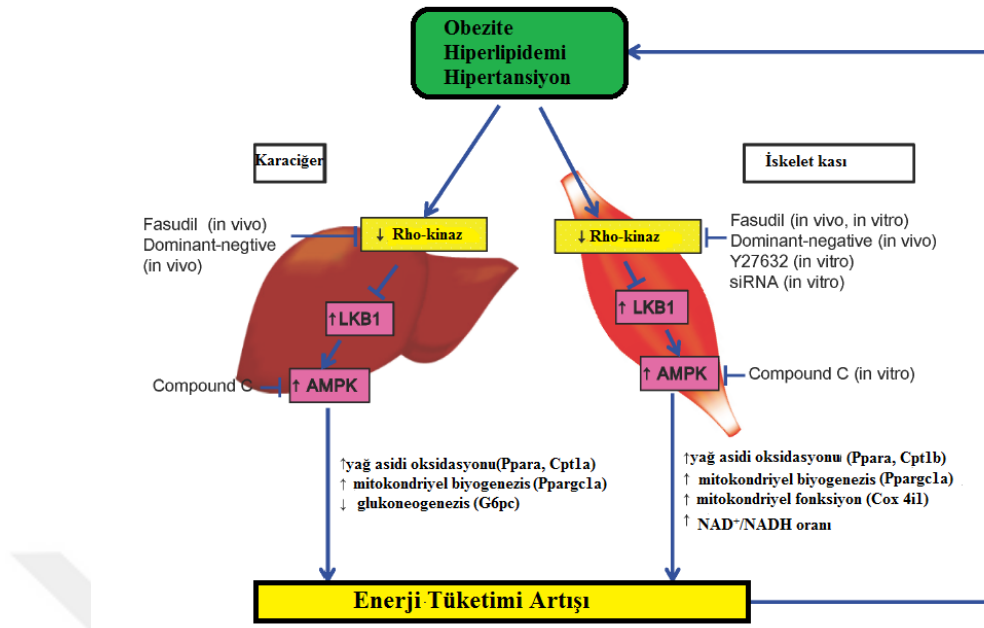
Hipergliseminin ve/veya hipertansiyonun eşlik ettiği patolojilerde Rho-kinaz ve AMPK yollarının birbirlerine ters etki göstermeleri bu yollar arasında ilişki olabileceğinin speküle edilmesine neden olmuştur.

Rho-kinaz aktivasyonunun artması endotel hücrelerde NO üretimini baskılamakta ve dolaylı olarak vasküler düz kasta kontraksiyona neden olmaktadır. Rho-kinaz aktivasyonunun bu etkisinde eNOS ekspresyonunu ve mRNA stabilitesini azaltmasının etkisi vardır. Sözü edilen yolda, Rho-kinaz'ın doğrudan MYPT-1'e olan etkisinin de rolü bulunmaktadır. MYPT-1'in inaktif halde kalmasını sağlayarak MLC fosforilasyonunu, sitozolik Ca^{+2} düzeylerinin yükselmesini ve sonuç olarak kontraksiyonu tetiklemektedir (Loirand, 2015). AMPK'ın vasküler etkisi bunun tam tersi yöndedir. AMPK aktivasyonu Rho-kinazın tam tersi etki göstererek, arteriyel düz kasta eNOS aktivitesini artırmaktadır. NO üretimini artırarak endotel-bağımlı gevşemeye aracılık etmektedir. Endotele bağımlı olmayan gevşemeyi ise vasküler düz kas hücresindeki MLCK'ı doğrudan aktive edip hücre içi Ca^{+2} duyarlılığını ve vasküler tonusu azaltarak sağlamaktadır (Ford ve Rush, 2011; Goirand ve ark., 2007). Özetlemek gerekirse, Rho-kinaz aktivasyonu vasküler kontraksiyonun artmasına neden olarak hipertansiyon ve diyabet gibi patolojilerde tabloyu daha da ciddileştirmektedir. AMPK aktivasyonunun artması ise vasküloprotektif etki yaparak bu patolojilere bağlı olarak gelişen vasküler komplikasyonların düzelmesine katkıda bulunmaktadır. Bu noktadan yola çıkarak özellikle vasküler tonusun arttığı patolojilerde Rho-kinaz aktivitesinin inhibisyonunun, AMPK aktivitesinin ise aktivasyonunun yararlı olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla Rho-kinaz inhibitörleri ve AMPK aktivasyonunu artıran ajanlar yeni terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir (Surma ve ark., 2011; Ford ve Rush, 2011).

Rho-kinaz ve AMPK arasında ilişki olduğunu düşündüren bir başka durum ise; Rho-kinaz inhibisyonu ile aşağıda belirtilen ve aynı zamanda AMPK'nın aşağıakım (*downstream*) hedefleri olan moleküllerin up-regüle olmasıdır (Şekil 1.9) (Noda ve ark., 2014):

- yağ asidi yıkımıyla enerji elde edilmesinde rol oynayan, aktif yağ asitlerinin mitokondri dışı zarından sitozole doğru taşınmasında görevli olan Cpt1a (*carnitine palmitoyltransferase 1a*) ve Cpt1b,
- mitokondride bulunan büyük bir transmembran protein olup, elektron taşıma zincirinin terminal elektron alıcısı olan Cyts (sitokrom C) ve Cox4i1 (sitokrom C oksidaz alt ünite 4i1),
- kas dokusu ve adipoz dokuda bulunan glukoz transportörü olan Slc2a4.

Rho-kinaz inhibitörü olan hidroksifasudil'in AMPK'nın aşağıakım (*downstream*) hedefi olan Sirtuin-1 aktivitesini (Şekil 1.9) ve NAD^+/NADH oranını artırması da bu iki kinaz yolağının arasındaki ilişkiyi gösteren bir başka bulgudur (Noda ve ark., 2014).



Şekil 1.9 Rho-kinaz inhibisyonu LKB1 yolağı aracılığıyla AMPK α_2 'i aktive ederek enerji tüketimini artırmakta, Rho-kinaz aktivitesindeki değişikliğin AMPK aktivitesine etkisi. Şekil Noda ve ark. (2014)' den alınarak adapte edilmiştir.

AMPK aktivasyonuna aracılık eden metforminin deneysel modellerde ve insanlarda fasudile benzer şekilde vücut ağırlığını ve serum lipit düzeylerini düşürmesi de etkileşimin bir diğer göstergesi olarak düşünülmektedir (Noda ve ark., 2014).

AMPK ile Rho-kinaz yolağı arasındaki ilişkinin aydınlatılması için yapılan ve aşağıda belirtilen çalışmalarda, sözü edilen yollar arasında bir etkileşim olabileceği öne sürülmektedir:

- (i) Anjiotensin II ile hipertansiyonun indüklendiği farelerde resveratrol tedavisinin AMPK aktivasyonu ile Rho-kinaz aktivitesini azaltarak kan basıncını düzenlediği gösterilmiştir (Cao ve ark., 2014).
- (ii) Yüksek yağ diyeti ile beslenen farelerde gelişen metabolik bozukluklar Rho-kinaz inhibitörüyle AMPK-aracılı olarak düzeltilmiş ve Rho-kinaz

inhibitörüyle yapılan tedavi sonucunda gözlenen söz konusu olumlu etkiler AMPK geni silinmiş farelerde ortadan kalkmıştır (Noda ve ark., 2014).

Bu çalışmalar ışığında, bahsedilen yollar arasında anahtar rol oynayan AMPK yolağı olduğu sonucu çıkarılabilmektedir. Bu nedenle tezimizde AMPK inhibisyonu yapılan *in vitro* koşullarda Rho-kinaz inhibitörünün etkisindeki değişim incelenmiştir.



2. GEREÇ ve YÖNTEMLER

2.1 Kullanılan Gereçler

2.1.1 Malzemeler

İzole dikey organ banyosu (Commat, Ankara, TÜRKİYE)

Veri Kayıt ve Analiz Sistemi (MP30 Data acquisition System, Biopac-System Inc, California, ABD)

Sirkülatör (Commat, Ankara, TÜRKİYE)

%95 Oksijen, %5 karbondioksit içeren gaz karışım tüpü

Santrifüj (Hettich, Tuttlingen, ALMANYA)

Kaba Terazı (Scaltec, SBA 61 Heiligenstandt, ALMANYA)

Hassas Terazı (Scaltec, SBA 31 Heiligenstandt, ALMANYA)

Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler (Eppendorf, Hamburg, ALMANYA)

Vortex (Velp Scientifica, İTALYA)

Pipet uçları (Standart)

pHmetre (Mettler-Toledo MP220, İSVİÇRE)

-80°C Derin Dondurucu (Jouan VXS 380)

-20°C Derin Dondurucu (Vestel, TÜRKİYE)

+4°C Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE)

Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Torrey Pines Scientific, ABD)

Şeker ölçüm cihazı (Accu-Chek Go, Roche, Almanya)

Şeker ölçüm stripleri (Accu-Chek Go, Roche, Almanya)

Likit nitrojen tankı

Buz makinası (Hosizaki Ice Maker, JAPONYA)

Çeşitli cam ve plastik maddeler (Standart)

Cerrahi makas ve pensler

Disphomix doku homojenizatörü (Disphomix, ALMANYA)

Disphomix doku homojenizasyon tüpleri (Disphomix, ALMANYA)

Spektrofotometre (SpectraMax 190, Molecular Devices, ABD)

Elektroforez aleti (Biorad, California, ABD)

Güç Kaynağı (Biorad, California, ABD)

TransBlot Turbo Transfer Sistemi (Biorad, California, ABD)

Chemidoc MP Görüntüleme Sistemi (Biorad, California, ABD)

2.1.2 Kimyasal maddeler

Sıçan yemi (Purina, Gebze, TÜRKİYE)

A23187 (Sigma Chemical Co., ABD)

Fenilefrin (Sigma Chemical Co., ABD)

Asetilkolin (Sigma Chemical Co., ABD)

L-NAME (Sigma Chemical Co., ABD)

Terutroban (Sigma Chemical Co., ABD)

İndometazin (Sigma Chemical Co., ABD)

Y27632.2HCl (SelleckChem, ABD)

Dorsomorphin.2HCl (compound C) (SelleckChem, ABD)

AICAR (SelleckChem, ABD)

DMSO (Sigma Chemical Co., ABD)

Heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat, İstanbul, TÜRKİYE)

Krebs çözeltisi

pAMPK, pACC, tAMPK ve tACC proteinlerine ait primer antikorlar (Cell Signaling Technology, ABD)

ROCK 2 proteinine ait primer antikor (Sigma Chemical Co., ABD)
β-aktin proteinine ait primer antikor ve sekonder antikorlar (Santa Cruz Biotechnology, ABD)
EDTA (Merck, ABD)
PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*, Amresco, ABD)
Tris (Sigma Chemical Co., ABD)
Sukroz (J.T. Baker, ABD)
BSA (Sığır serum albumini, Capricorn Scientific, ALMANYA)
Western ECL Substrat (Biorad, ABD)
Yağsız Süt tozu (Pınar, TÜRKİYE)
SDS
Akrilamid
TEMED
APS (Amonyum Persülfat,
NP40 (Applichem, ABD)

2.2 Kullanılan Yöntemler

2.2.1 Deney hayvanları

Çalışmamızda Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Ünitesi'nden alınan 30 haftalık erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar için Ankara Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan 17.06.2015 tarih ve 2015-10-124 nolu karar ile onay alınmıştır. Sıçanların bakımı Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nde (standart kafeslerde 22±1°C ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda) yapılmıştır. Sıçanlar standart yem ve su ile *ad libitum* beslenmiştir.

2.2.2 Deney gruplarının oluşturulması

Çalışmamızda *in vitro* hiperglisemik ortamın etkisini değerlendirmek amacıyla organ banyosu deneylerinde normoglisemik ve hiperglisemik iki grup oluşturulmuştur. Fakat *in vitro* hiperglisemik ortamda elde edilen sonuçların beklenildiği gibi olmaması nedeniyle kısa dönem STZ (Streptozotosin) uygulaması yapılarak sıçanlar kontrol ve kısa dönem (4 haftalık) diabetik olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

STZ uygulaması deney hayvanlarının kuyruk veninden 40 mg/kg dozda intravenöz olarak yapılmıştır. STZ'nin belirtilen konsantrasyonu 0.1M sitrat tamponu (pH 4.5) ile hazırlanmıştır. Kontrol gruba sadece 0.1 M sitrat tamponu (pH 4.5) intravenöz olarak uygulanmıştır. STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra kan glukoza değeri $\geq 300\text{mg/dL}$ olan deney hayvanları diabetik olarak kabul edilmiştir. Deney hayvanlarının diabet olduklarının belirlenmesinden 4 hafta sonra organ banyosu deneyleri yapılmıştır.

2.2.3 Kan şekeri ve beden ağırlığı lm

Beden ağırlığı STZ uygulamasından önce ve STZ enjeksiyonundan 4 hafta sonra olacak şekilde ölçülmüştür. Kan şekeri ise STZ enjeksiyonundan 4 hafta sonra organ banyosu deneyleri yapılmadan hemen önce ölçülmüştür. Kontrol ve diabet grupları için STZ uygulamasından önceki ve uygulamadan 4 hafta sonraki beden

ağırlığı değişimi değerlendirilmiştir. Kontrol ve diabet gruplarında kan şekeri değerleri karşılaştırılmıştır.

2.2.4 Organ banyosu deneyleri

34 haftalık Spraque-Dawley erkek sıçanların ketamin (60 mg/kg)/ ksilazin (10 mg/kg) anestezisi altında torasik aortları çıkarılmıştır. Çıkarılan torasik aort hızlıca soğuk ve oksijenlenen Krebs çözeltisine (NaCl: 118 mM, KCl: 4.7 mM, CaCl₂: 2.5 mM, MgSO₄: 1.2 mM, NaHCO₃: 25 mM, KH₂PO₄: 1.2 mM, glukoz: 11 mM) alınmış ve her deney hayvanının torasik aortundan 3-4 mm'lik 4 adet aort preparatı hazırlanmıştır. Endotelsiz preparatlar, iğne yardımıyla mekanik hasar verilip endotelleri tahrip edilerek hazırlanmıştır. Damar preparatları Biopac (MP30) veri kayıt sisteminin bulunduğu organ banyosuna asıldıktan sonra başlangıç gerimi olarak 2000 mg'a ayarlanmış ve 60 dakika boyunca her 15 dakikada bir yıkanarak preparatların dengeye ulaşması sağlanmıştır. 60 dakikanın sonunda preparatlar 60 mM KCl ile uyarılmış ve kasılma boyutları değerlendirilmiştir (Ford ve Rush, 2011). 60 mM KCl ile kastırılıp yıkanarak bazal gerimine gelmesi sağlanan preparatlar endotel kontrolü için 10⁻⁶ M fenilefrinle (Phe) kastırılmış ve Ach konsantrasyon-yanıt eğrisi (10⁻⁹-10⁻⁵M) kümülatif olarak çıkartılmıştır. Gevşeme yanıtı $\geq$ %70 olan damarlar endotelli olarak kabul edilmiştir (Tang ve Vanhoutte, 2009).

2.2.4.1 EDCF yanıtlarının değerlendirilmesi

Kasılma yanıtlarının endotel-aracılı olduğunun kanıtlanması için endotelli ve endotelsiz damar preparatlarında L-NAME (10⁻⁴ M, 30 dakika, dk) varlığında A23187-aracılı (10⁻⁸-10⁻⁵ M) kasılma yanıtları çalışılmıştır. A23187-aracılı kasılma

yanıtlarının karakterizasyonu için L-NAME'e ek olarak COX inhibitörü indometazin ve TP reseptör antagonisti S18886 inkübasyonları varlığında A23187-aracılı kasılma yanıtları şu protokoller takip edilerek değerlendirilmiştir (Qu ve ark., 2010; Cai ve ark., 2015):

- (i) L-NAME (10^{-4} M, 30 dk) ve indometazin ($5 \cdot 10^{-6}$ M, 30 dk) varlığında A23187 konsantrasyon-yanıt eğrisi (10^{-8} - 10^{-5} M),
- (ii) L-NAME (10^{-4} M, 30 dk) ve S18886 (10^{-7} M, 30 dk) varlığında A23187 konsantrasyon-yanıt eğrisi (10^{-8} - 10^{-5} M).

Her bir preparata ait EDCF yanıtı, aynı damar preparatının 10^{-5} M A23187 ile gözlenen kasılma miktarının 60 mM KCl'e verdiği kasılma yanıtına oranlanması ile '% kasılma' olarak ifade edilmiştir.

2.2.4.2 *In vitro* hiperglisemik ortam oluşturulması

Çalışmamızda akut hiperglisemik ortamda EDCF yanıtlarındaki olası değişikliklerin değerlendirilmesi amaçlandığı için öncelikli olarak EDCF yanıtında değişikliği indükleyen glukoz konsantrasyonunun ve inkübasyon süresinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla *in vitro* hiperglisemi koşullarında endotel-aracılı yanıtların bozulduğu makaleler taranmıştır. İncelenen çalışmalarda:

- tavşan aortunda 44mM konsantrasyonda 6 saat hiperglisemi inkübasyonu ile Ach-aracılı gevşeme yanıtının bozulduğu (Tsfamariam ve ark., 1990),
- spontan hipertansif sıçan torasik aortunda 44 mM konsantrasyonda 4 saat hiperglisemi inkübasyonu ile Ach-aracılı gevşeme yanıtının bozulduğu (Qian ve ark., 2010),
- ZDF (*Zucker diabetic fatty*) sıçanların iskelet kas rezistan arterlerinde 25 mM konsantrasyonda 1 saat hiperglisemi inkübasyonu ile anjiotensin II-aracılı kasılma yanıtlarının arttığı görülmüştür (Bagi ve ark., 2010).

Yukarıda verilen literatür bilgisi ışığında çalışmamızda *in vitro* hiperglisemik ortam için öncelikle daha düşük konsantrasyon olan 25 mM seçilmiştir. İnkübasyon süresi

için 3 ve 6 saate karar verilmiştir. Normoglisemik ortam olarak 11 mM glukoz içeren Krebs çözeltisi kullanılmıştır. Normoglisemik ve hiperglisemik ortamdaki preparatların EDCF yanıtının aynı zaman diliminde değerlendirilebilmesi için tüm banyolar 15 dakikada bir yıkanarak inkübasyon sürelerinin sonunda kümülatif olarak A23187-aracılı yanıtlar değerlendirilmiştir.

2.2.4.3 AMPK aktivitesinin değerlendirilmesi

Damar düz kasında AMPK konsantrasyon-bağımlı olarak gevşemeye aracılık etmektedir. Çalışmamızda 4 haftalık diabetin AMPK-aracılı gevşeme yanıtlarında değişikliğe neden olup olmadığının değerlendirilebilmesi için, kontrol ve diabetik gruplarda endotelli torasik aort preparatları Phe (10^{-6} M) ile önkastırılıp AMPK aktivatörü olan AICAR (10^{-9} – 10^{-3} M) ile gevşeme yanıtlarına bakılmıştır (Ford ve Rush, 2011).

Yukarıda belirtilen protokole ek olarak, AMPK aktivasyonunun farmakolojik bir ajanla indüklenmesi sonucunda EDCF yanıtları açısından kontrol ve diabetik gruplar arasındaki olası farklılık değerlendirilmiştir. Bu deney protokolünde ise; endotelli torasik aort preparatlarında AICAR (500 μ M, 30 dk) inkübasyonun A23187-aracılı EDCF yanıtı üzerindeki etkisi incelenmiştir (Ford ve Rush, 2011).

2.2.4.4 Rho-kinaz aktivitesinin değerlendirilmesi

Kısa dönem (4 hafta) STZ-diabetik grupta Rho-kinaz etkinliğindeki olası değişikliği değerlendirmek amacıyla; kontrol ve diabet gruplarda endotelli torasik

aort preparatları Phe (10^{-6} M) ile önkastırılıp Rho-kinaz inhibitörü Y27632 (10^{-8} – $3 \cdot 10^{-5}$ M) ile gevşeme yanıtları incelenmiştir (Dennis ve ark., 2010).

2.2.4.5 Rho-kinaz inhibisyonunun EDCF yanıtları üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi

Rho-kinaz inhibisyonun EDCF üzerindeki etkisini değerlendirilirken öncelikle Y27632 için literatürdeki en yüksek konsantrasyon olan 10^{-5} M seçilmiştir (Denniss ve ark., 2010). 10^{-5} M Y27632 ile yapılan inkübasyonda EDCF yanıtları tamamen bloke olmuştur (*sonuçlar gösterilmemiştir*). Kontrol ve diabet gruplarındaki EDCF yanıtlarındaki farklılığın değerlendirilebilmesi için EDCF yanıtının tamamen bloke olmaması gerekmektedir. Bu amaçla Y27632 inkübasyonunun daha düşük konsantrasyonlarda uygulanmasına karar verilmiş, ve örnek sayısının sınırlı tutulduğu bir deney grubunda ($n=1-4$), Y27632'nin üç farklı konsantrasyonunun (10^{-7} , $3 \cdot 10^{-7}$ ve 10^{-6} M) A23187-aracılı kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkinliği kontrol ve diabetik gruplarda çalışılmıştır (*açıklama için "3.2.4 4 haftalık diabetin Rho-kinaz etkinliğine etkisi" başlığına bakılabilir*). Phe ile ön kastırılan damarlarda Y27632 ile görülen gevşeme yanıtlarına ait pD_2 değerlerinin (*açıklama için "3.2.4 4 haftalık diabetin Rho-kinaz etkinliğine etkisi" başlığına bakılabilir*) istatistiksel olarak farklı olması nedeniyle Y27632'nin inkübasyon konsantrasyonu diabetik grup için 10^{-8} M olarak belirlenmiştir. Seçilen bu konsantrasyon, kontrollere (10^{-7} M) göre daha düşük bir konsantrasyondur.

Sonuç olarak, kontrol ve diabetik deney gruplarından izole edilen endotelli aort preparatlarında L-NAME (10^{-4} M, 30 dk) ve Rho-kinaz inhibitörü Y27632 (diabetik grup için: 10^{-8} M, 30 dk; kontrol grup için: 10^{-7} M, 30 dk) inkübasyonları varlığında A23187 konsantrasyon-yanıt eğrisi (10^{-8} - 10^{-5} M) çalışılmıştır (Martinsen ve ark., 2012).

2.2.4.6 AMPK inhibisyonunun EDCF yanıtları üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi

Kontrol ve diabetik gruplardan izole edilen endotelli aort preparatlarında L-NAME (10^{-4} M, 30 dk) ve AMPK inhibitörü Compound C (CC, $2 \cdot 10^{-5}$ M, 45 dk) inkübasyonları varlığında A23187 konsantrasyon-yanıt eğrisi (10^{-8} - 10^{-5} M) çalışılmıştır (Ford ve Rush, 2011).

2.2.4.7 Rho-kinaz ve AMPK inhibisyonlarının EDCF yanıtları üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi

EDCF yanıtları üzerine Rho-kinaz ve AMPK aktivasyonlarının aynı anda değerlendirilmesi için, kontrol ve diabetik deney gruplarından izole edilen endotelli aort preparatlarında L-NAME (10^{-4} M, 30 dk), Y27632 (diabetik grup için: 10^{-8} M, 30 dk; kontrol grup için: 10^{-7} M, 30 dk) ve AMPK inhibitörü CC ($2 \cdot 10^{-5}$ M, 45 dk) inkübasyonları varlığında A23187 konsantrasyon-yanıt eğrisi (10^{-8} - 10^{-5} M) çalışılmıştır.

2.2.5 Western-blot deneyleri

2.2.5.1 Doku homojenizasyonu

Organ banyosunda deneylerinden sonra likit nitrojen içinde dondurularak - 80°C derin dondurucuda saklanan torasik aort preparatları homojenizasyon için oda sıcaklığında buz bulunan bir kaba çıkarılmıştır.

Homojenizasyon solüsyonu (<i>buffer</i>)	
EDTA	100 mM
PMSF	100 mM
Tris	1 M
NP40	%1
Sukroz	%50

Disphomix tüplerine alınan her bir doku üzerine 500 µl soğuk homojenizasyon solüsyonu eklenerek, aort preparatları Disphomix cihazında homojenize edilmiştir. Disphomix tüplerinde bulunan homojenatlar +4°C’de 10000 RPM’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstten ayrılan kısımlar (süpernatantlar) alınmış, alttaki çökeltiler (pelletler) atılmıştır.

2.2.5.2 Protein miktar tayini

Bradford yöntemi ile protein miktar tayini yapılmıştır. Sığır serum albümini kullanılarak 8 farklı konsantrasyonda (1.56-200 µg/ml) standart hazırlanmıştır. Bradford solüsyonu ile 1/20 oranında seyreltilen doku homojenatlarının absorbans değerleri, 595 nanometre dalga boyunda kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Standartlara ait absorbans ve konsantrasyon değerleri arasındaki doğrusallık, lineer regresyon analizi sonucunda elde edilen r^2 değeri ($r^2=0.998$) ile gösterilmiştir.

2.2.5.3 SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Elektroforez sisteminde kullanılacak olan SDS-PAGE jeller aşağıdaki tablo değerlerine göre hazırlanmıştır.

Ayırma jeli (<i>Running</i> jel)	
% 8 konsantrasyonda akrilamid içeren jel hazırlanışı (2 jel için)	
%30 akrilamid, %0.8 bis-akrilamid	2.333 ml
Tris (1.5M pH 8.8)	2.532 ml
dH ₂ O	4.93 ml
SDS (%10)	0.1 ml
APS (%10)	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

Yukarıdaki şekilde hazırlanan %8'lik ayırma jeli hava kabarcığı kalmayacak şekilde iki cam arasına döküldükten sonra, jelin üstü n-butanol ile kapatılmış, böylece jelin hava ile teması kesilmiştir. Jelin polimerizasyonu için 45 dakika

beklenmiştir. Jel polimerize olduktan sonra n-butanol uzaklaştırılmış ve jelin üst kısmı distile su ile yıkanmıştır.

Konsantrasyon jeli (<i>stacking</i> jel)	
%4 konsantrasyonda akrilamid içeren jel hazırlanışı (2 jel için)	
%30 akrilamid, %0.8 bis-akrilamid	0.657 ml
TRIS (0.5M pH 6.8)	0.5 ml
dH ₂ O	2.76 ml
SDS(%10)	0.039 ml
APS(%10)	0.039 ml
TEMED	0.004 ml

Yukardaki şekilde hazırlanan %4'lük konsantrasyon jeli (*stacking* jel) polimerize olmuş ayırma jelinin üzerinde kalan boşluğa dökülmüş ve örneklerin yüklenmesi için kullanılacak kuyuların oluşumunu sağlamak üzere konsantrasyon jelinin içine tarak yerleştirilmiştir. 1 saat süre ile konsantrasyon jelinin polimerize olması beklenmiştir. Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartılarak, jellerin içinde bulunduğu cam elektroforez ünitesine yerleştirilmiş ve ünitenin içi elektroforez tamponu (0.025M Tris baz, 0.192M glisin, %0.1 SDS) ile doldurulmuştur. Protein homojenatları, *sample buffer* (Tris-HCL 0.125M, SDS 0.14M, gliserol %20, bromofenol blue 0.03mM, 2 merkaptetanol 0.2mM) ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra 3 dakika süre ile kaynatılarak proteinlerin denatüre olması sağlanmıştır. Bu işlemten sonra, gereken miktarda protein içeren doku homojenatları, kuyulara pipet yardımıyla yüklenmiştir. Yükleme işleminin tamamlanmasının ardından ünitenin yerleştirildiği tank, bütünüyle tampon ile doldurularak elektroforez işlemi 40 mA'de 100 dakika süre ile yapılmıştır.

2.2.5.4 Proteinlerin membrana transferi

Öncelikle PVDF membran metanolle aktifleştirilmiştir. Elektroforez tamamlandıktan sonra, akrilamid jeller camlardan ayrılmıştır. Proteinlerin PVDF membrana transferi için; sırayla sünger, blot kağıdı, jel, PVDF membran, blot kağıdı, sünger şeklinde “sandviç” hazırlanarak, transblotting aleti içine yerleştirilmiştir. Bu işlem sırasında kullanılan sünger ve blot kağıtları transfer tamponu (0.3M Tris Baz, 2.4M glisin, %20 metanol) ile ıslatılmıştır. Transfer işlemi 2.5V’da 18 dakika hızlı transfer yapılarak tamamlanmıştır.

2.2.5.5 Poliakrilamid jel boyanması

<i>Commassie Blue</i> ile boyama	
<u>Boyama çözeltisi (<i>commassie blue</i>)</u>	<u>Arıtma çözeltisi</u>
%10 asetik asit	%10 asetik asit
%0.1 <i>commassie blue</i> R	%5 metanol
%50 metanol	Distile su

Tranfer işleminden sonra jelde protein kalıp kalmadığını kontrol etmek amacıyla jeller 20 dakika *commasie blue* içinde bekletilmiş, ardından jelin üstündeki boya başka bir kaba alınarak jeller birkaç kez su ve etanolle yıkanmıştır. Son olarak arıtma çözeltisiyle yıkanan jellerde, transfer kalitesi değerlendirilmiştir.

2.2.5.6 Membranlardaki sinyallerin görüntülenmesi ve analizi

Transfer işlemi bittikten sonra membranlara oda sıcaklığında 1 saat bloklama tamponu ile muamele edilerek nonspesifik proteinlerin bloklanması sağlanmıştır. Bloklama işleminin tamamlanmasının ardından, membranlar TBS-T solüsyonu (0.02M Tris baz, 0.14M NaCl, Tween-20 %0.2) ile 3X5 dakika olacak şekilde yıkanmıştır. Membranların primer antikor ile inkübasyonu, %2 BSA içeren TBS-T çözeltisi içinde hazırlanan antikor dilüsyonu ile 4°C’de gece boyu hafif şekilde çalkalanarak yapılmıştır. Primer antikor inkübasyonunun tamamlanmasının ardından membranlar, primer antikor ile uyumlu ve peroksidaz enzimi ile konjuge sekonder antikor dilüsyonu (%2 BSA içeren TBS-T çözeltisi içinde hazırlanmış) ile 25°C’de 1 saat süresince hafif şekilde çalkalanmıştır. Daha sonra 3X10 dakika olacak şekilde TBS-T ile yıkanan membranlara, yıkama işlemi sonrasında kemilüminesans (ECL) görüntüleme çözeltisi ile muamele edilmiş ve görüntüleme sistemi ile fotoğrafları çekilmiştir. Kaydedilen dijital görüntüler, kullanılan görüntüleme sistemine ait analiz programı (ImageLab, Ver. 5.2.) ile değerlendirilmiş ve band yoğunlukları sayısal ifadelere dönüştürülmüştür.

2.2.6 İstatistiksel analiz

Tüm sonuçlar *ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası (mean $\pm$ standart error of mean (SEM))* olarak ifade edilmiştir. İstatiksel analiz Student-t-testi kullanılarak yapılmıştır. Sadece Şekil 3.7.’da verilen sonuçlar için tek-yönlü Anova kullanılmış, post-hoc test olarak Newman-Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. $p<0,05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar, GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) kullanılarak analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Kan şekeri ve beden ağırlığı ölçümü

STZ uygulamasından önce deney grupları beden ağırlıklarına göre eşleştirilmiştir (K: 381.8 ± 8.7 g; D: 392.0 ± 6.5 g, $p > 0.05$). 4 haftalık diabet süresinin sonunda ise kontrol grubundaki beden ağırlığı artışına karşın, diabetik grupta beden ağırlığında azalma gözlenmiştir (K: 426.0 ± 10.2 g; D: 328.3 ± 10.0 g, $p < 0.0001$). Beklendiği gibi, STZ uygulaması sonucunda diabetik grubun kan glukoz düzeylerinde kontrol gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gözlenmiştir (K: 111.5 ± 2.6 mg/dL; D: 435.3 ± 21.1 mg/dL, $p < 0.0001$).

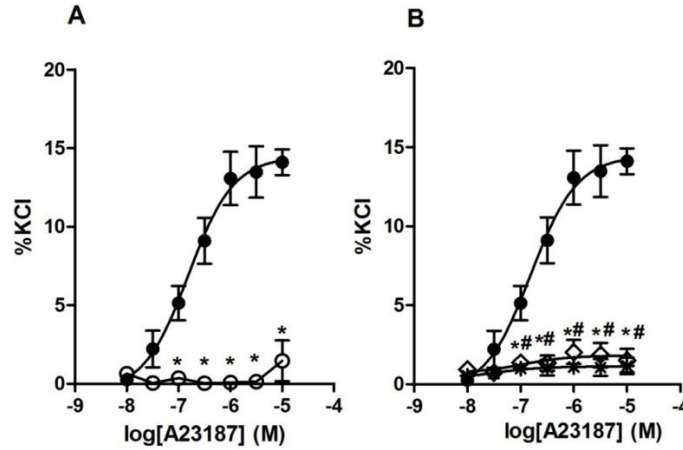
3.2 Organ banyosu deneyleri

3.2.1 EDCF-aracılı kasılma yanıtlarının karakterizasyonu

İzole organ banyosu sistemlerinde EDCF-aracılı kasılma yanıtları, L-NAME ile NOS aktivasyonunun bloke edildiği koşullarda Ca^{+2} iyonoforu olan A23187 konsantrasyon-yanıt eğrisinin çalışıldığı protokoller kullanılarak değerlendirilmektedir (Ford ve Rush, 2011). Çalışmamızda, belirtilen protokol ile elde edilen kasılma yanıtlarının endotel aracılı olup olmadığının belirlenmesi

amacıyla, endotelli ve endotelsiz aort preparatlarında L-NAME varlığında A23187-aracılı kasılma yanıtları çalışılmıştır. Sonuçlarımız, A23187-aracılı kasılma yanıtlarının endotelli preparatlarda görülmesine karşın endotelsiz preparatlarda ortadan kalktığını göstermiş, sözü edilen kasılma yanıtlarının endotel-kaynaklı olduğunu kanıtlamıştır (Şekil 3.1A).

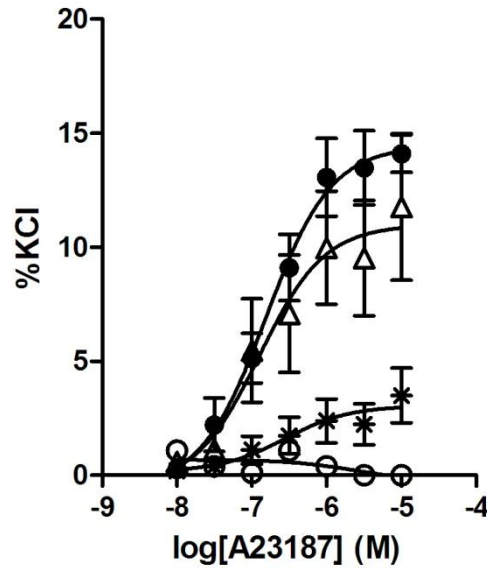
EDCF yanıtı, COX ürünleri olan prostanooidlerin TP reseptörünü uyarması ile oluşmaktadır (Denniss ve ark., 2010). Çalışmamızda gördüğümüz endotel-kaynaklı kasılma yanıtının COX ürünleri ve TP reseptör-aracılı olup olmadığını değerlendirmek için COX inhibitörü ve TP reseptör antagonisti varlığında EDCF yanıtları değerlendirilmiştir. L-NAME varlığında A23187-aracılı EDCF yanıtlarının L-NAME inkübasyonuna ek olarak indometazin (selektif olmayan COX inhibitörü) inkübasyonu ile ortadan kalktığı görülmüştür. Aynı şekilde L-NAME+S18886 (TP reseptör antagonisti) inkübasyonu yapılan endotelli aort preparatlarında da A23187-aracılı EDCF yanıtları kaybolmuştur (Şekil 3.1B).



Şekil 3.1. A23187 ile indüklenen EDCF-aracılı kasılma yanıtının karakterizasyonu. **(A)** Endotel hasarının L-NAME (10⁻⁴ M, 30dk) varlığında A23187-aracılı kasılma yanıtına etkisi ●: endotelli preparat (n=23, deney hayvanı sayısı= 16), ○: endotelsiz preparat (n=5, hayvan sayısı= 5). *,p<0.05 vs endotelli preparat. **(B)** İndometazin (5*10⁻⁶ M, 30 dk) ve S18816'ın (10⁻⁷ M, 30 dk) A23187-aracılı EDCF yanıtına etkisi. ●: kontrol preparat (n=16, hayvan sayısı=16), ○: S18816 inkübasyonu yapılmış preparat (n=8, hayvan sayısı=4), ◇: indometazin inkübasyonu yapılmış preparat (n=8, hayvan sayısı=4).*, p<0.05 vs indometazin. #, P<0.05 vs S18816.

3.2.2 *In vitro* hiperglisemik koşulun EDCF-aracılı kasılma yanıtına etkisi

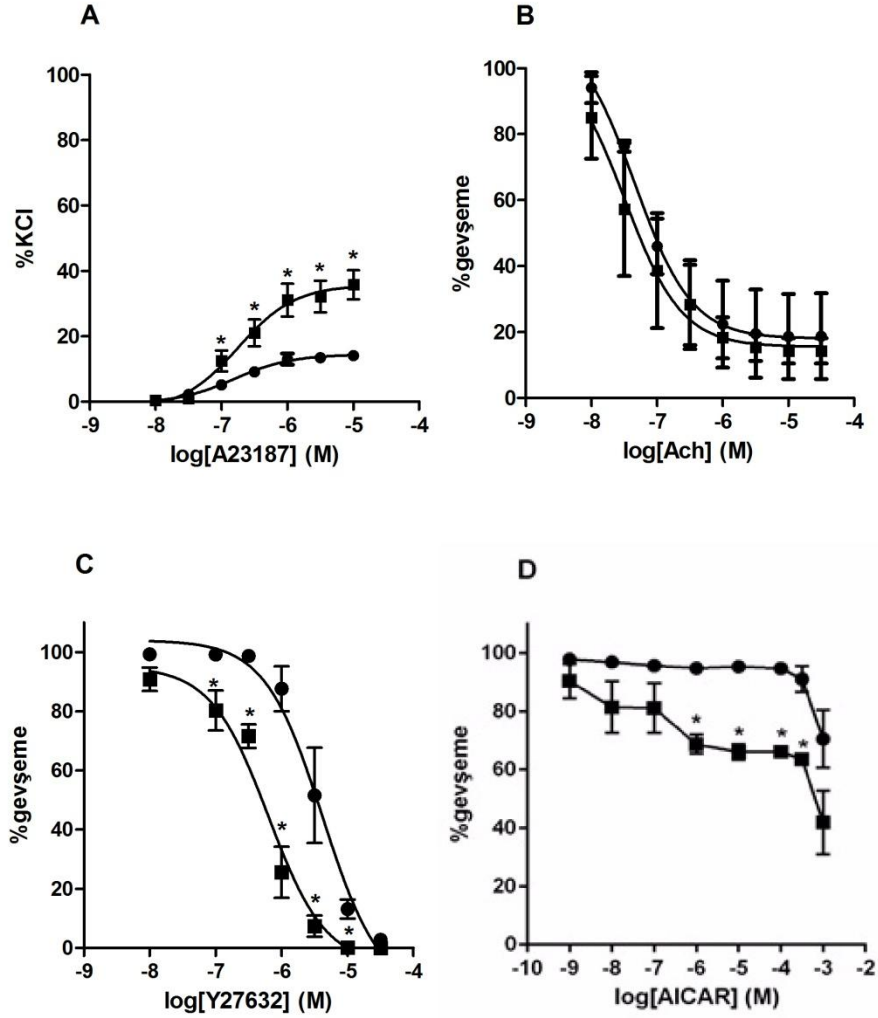
Organ banyosunda aort preparatları 60 dakika denge periyodundan sonra 60 mM KCl ile uyarılıp bazal gerimine gelmesi sağlanmıştır. Ardından preparatlarda endotel kontrolü yapıldıktan sonra hiperglisemi inkübasyonuna başlanmıştır. Normoglisemik (11 mM glukoz) ve hiperglisemik (25 mM glukoz) koşullarda 3 ve 6 saat süre ile organ banyosunda inkübasyon yapılmıştır. “2.2.4 *Organ banyosu deneyleri*” bölümünde açıklanan literatür bilgisine dayanarak *in vitro* hiperglisemik koşullarda EDCF yanıtında artış olabileceği hipotez edilmiş, fakat uzayan inkübasyon süresiyle birlikte hem normoglisemik hem de hiperglisemik ortamda EDCF-aracılı kasılma yanıtlarında azalma görülmüştür (Şekil 3.2). Bu durumda hiperglisemik ortamda artan EDCF yanıtlarını değerlendirmek anlamlı olmayacağı için *in vitro* hiperglisemik ortam yerine kısa dönem STZ-diabetik sıçanlarda çalışılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.2. Farklı koşullarda denenen *in vitro* hiperglisemi inkübasyonunun A23187-aracılı EDCF yanıtları üzerindeki etkileri. ●: kontrol (n=23, hayvan sayısı=16), * 3 saatlik normoglisemik ortam (n=6, hayvan sayısı=5), Δ: 3 saatlik hiperglisemik ortam (n=9, hayvan sayısı=5), ○: 6 saatlik normoglisemik ortam (n=1, hayvan sayısı=1).

3.2.3 Kısa dönem (4 haftalık) STZ ile indüklenen diyabetin endotel-aracılı yanıtlara etkisi

Kontrol ve 4 haftalık diyabetik gruptan izole edilen endotelli aort preparatlarında L-NAME varlığında A23187-aracılı endotel aracılı kasılma yanıtları çalışılmıştır. Kontrol ve diyabetik grupların endotel-aracılı gevşeme yanıtları arasında anlamlı fark olmamasına karşın EDCF yanıtları diyabetik grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (Şekil 3.3A). Kontrol ve 4 haftalık diyabetik gruptan izole edilen endotelli aort preparatları önce Phe ile ön kastırılmış, ardından Ach ile konsantrasyon-yanıt eğrisi (10^{-9} - 10^{-5} M) çıkarılmıştır. Endotel aracılı gevşeme yanıtlarında kontrol ve diyabetik gruplar arasında çalışan konsantrasyonların hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 3.3B).

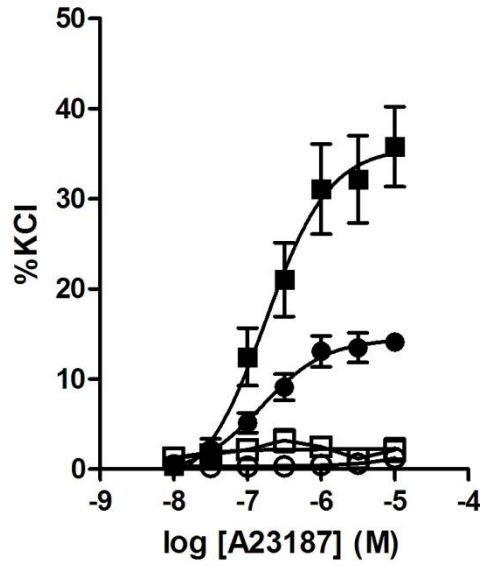


Şekil 3.3. 4 haftalık diabetin A23187-aracılı EDCF yanıtına ve Phe ile ön kastırılan damarlarda farklı ajanlarla gevşeme yanıtlarına etkisi **(A)** 4 haftalık diabetin L-NAME (10^{-4} M, 30 dk) varlığında A23187-aracılı EDCF yanıtına etkisi. ●: Kontrol (n=23, hayvan sayısı=16), ■: 4 haftalık diabetik (n=11, hayvan sayısı=10). **(B)** 4 haftalık diabetin Phe (10^{-6} M) ile ön kastırılmış aort preparatlarında Ach konsantrasyon-yanıt eğrisi (10^{-8} – 3×10^{-5} M) üzerindeki etkisi. ●: Kontrol (n=4, hayvan sayısı=4), ■: 4 haftalık diabetik (n=4, hayvan sayısı=4). **(C)** 4 haftalık diabetin Phe (10^{-6} M) ile ön kastırılan damarda Y27632 konsantrasyon-yanıt eğrisi (10^{-8} – 3×10^{-5} M) üzerindeki etkisi. ●: Kontrol (n=4, hayvan sayısı=4), ■: 4 haftalık diabetik (n=4, hayvan sayısı=4). **(D)** 4 haftalık diabetin Phe (10^{-6} M) ile ön kastırılan damarda AICAR konsantrasyon-yanıt eğrisi (10^{-9} – 10^{-3} M) üzerindeki etkisi. ●: Kontrol (n=4, hayvan sayısı=4), ■: 4 haftalık diabetik (n=3, hayvan sayısı=3). *, $p < 0.05$ vs K.

3.2.4 4 haftalık diabetin Rho-kinaz etkinliğine etkisi

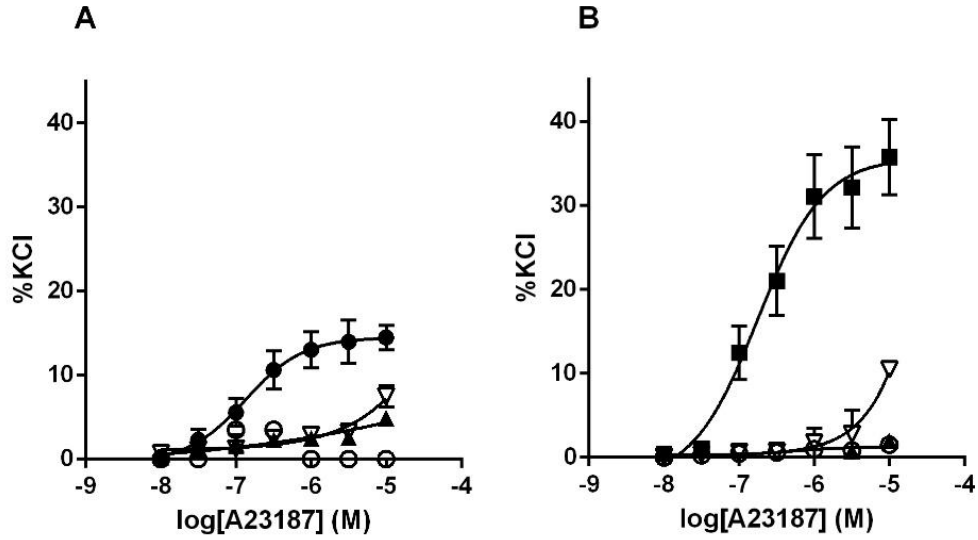
Kontrol ve 4 haftalık diabetik gruplardan izole edilen ve Phe ile ön kastırılan endotelli aort preparatlarında Y27632 (Rho-kinaz inhibitörü) ile konsantrasyon-yanıt eğrisi (10^{-8} - 3×10^{-5} M) çalışılmıştır. 4 haftalık diabetik grup, kontrol grubu karşılaştırıldığında, diabetiklere ait Y27632 konsantrasyon-yanıt eğrisinin istatistiksel olarak anlamlı olarak sola kaydığı saptanmıştır (Şekil 3.3C; pD_2 , K: 5.51 ± 0.15 ; D: 6.13 ± 0.13 , $p < 0.05$ K vs D).

Rho-kinaz inhibisyonun EDCF üzerindeki etkisini değerlendirilirken öncelikle Y27632 için literatürdeki en yüksek konsantrasyon olan 10^{-5} M seçilmiş (Denniss ve ark., 2010) ancak bu konsantrasyonda yapılan inkübasyonda EDCF yanıtları tamamen bloke olmuştur (Şekil 3.4). Kontrol ve diabet gruplarındaki EDCF yanıtlarındaki farklılığın değerlendirilebilmesi için EDCF yanıtının tamamen bloke olmaması gerektiği için Y27632 inkübasyonunun daha düşük konsantrasyonlarda uygulanmasına karar verilmiştir. L-NAME varlığında (10^{-4} M, 30 dk) A23187-aracılı kasılma yanıtları üzerine Y27632'nin üç farklı konsantrasyonunun (10^{-7} , 3×10^{-7} ve 10^{-6} M) inhibitör etkinliği kontrol ve diabetik gruplarda çalışılmıştır (Şekil 3.5A ve 3.5B). Sonuçlarımız, kontrolde A23187-aracılı kasılma yanıtlarını tümüyle bloke eden en düşük Y27632 konsantrasyonunun 10^{-6} M, diabetiklerde ise 3×10^{-7} M olduğunu göstermiştir. Ek olarak, 10^{-7} M konsantrasyonda Y27632 inkübasyonunun A23187-aracılı kasılma yanıtında kontrolde yaklaşık %50'lik bir inhibisyon oluştururken, diabette yaklaşık %75'lik bir inhibisyona yol açtığı belirlenmiştir (Şekil 3.5A ve 3.5B). Bu sonuçlar, endotelde bulunan Rho-kinaz etkinliğinden bağımsız olarak, sadece vasküler düz kasta bulunan Rho-kinaz duyarlılığının diabetiklerde arttığını göstermektedir.



Şekil 3.4. Kontrol ve 4 haftalık diabetik hayvanlarda Y27632 (10^{-5} M, 30dk) inkübasyonunun L-NAME (10^{-4} M, 30dk) varlığında A23187 aracılı EDCF yanıtına etkisi ●: kontrol (n=23, hayvan sayısı=16), ■: 4 haftalık diabetik (n=11, hayvan sayısı=10), □: Y27632 (10^{-5} M, 30dk) inkübasyonu yapılan diabetik (n=10, hayvan sayısı=10), ○: Y27632 (10^{-5} M, 30dk) inkübasyonu yapılan kontrol (n=8, hayvan sayısı=8),

Y27632-aracılı gevşeme yanıtlarına ait pD_2 değerlerinin ve L-NAME varlığında çalışılan A23187-aracılı kasılma yanıtlarını benzer oranda antagonize eden Y27632 konsantrasyonlarının kontrol ve diabetik gruplarda farklı olması nedeniyle, AMPK inhibitörü CC ile birlikte yapılacak inkübasyon protokollerinde kullanılacak Y27632 konsantrasyonu, diabetik grup için 10^{-8} M, kontrol grubu için 10^{-7} M olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlarda uygulanan Y27632 inkübasyonları, her iki grupta da A23187-aracılı yanıtta yaklaşık %50 inhibisyon yapmaktadır (Şekil 3.7A ve 3.7B).



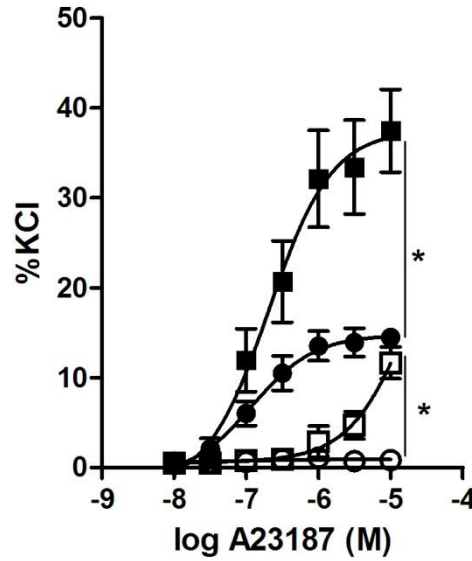
Şekil 3.5. Farklı konsantrasyondaki Y27632 inkübasyonlarının A23187-aracılı EDCF yanıtları üzerindeki etkileri. **(A)** Kontrol ve **(B)** 4 haftalık diabetik gruplarda L-NAME varlığında (10^{-4} M, 30 dk) farklı konsantrasyonlarda Y27632 inkübasyonunun (30 dk) A23187-aracılı EDCF yanıtına etkisi. ●: Kontrol (n=23, hayvan sayısı=16), ■: 4 haftalık diabetik (n=12, hayvan sayısı=11), ▽ : 10^{-7} M Y27632 inkübasyonu yapılan kontrol/diabetik (K: n=4, D: n=2), ▲: 3×10^{-7} M Y27632 inkübasyonu yapılan kontrol/diabetik (K: n=3, D: n=1), ○: 10^{-6} M Y27632 inkübasyonu yapılan kontrol/diabetik (K: n=1, D: n=1).

3.2.5 4 haftalık diabetin AMPK etkinliğine etkisi

Phe (10^{-6} M) ile ön kastırılan endotelli aort preparatlarında AMPK aktivatörü AICAR konsantrasyon-yanıt eğrisi çalışılmış ve AICAR-aracılı gevşeme yanıtlarının 4 haftalık diabetik koşullardaki olası değişimi değerlendirilmiştir. Diabetiklerde 10^{-6} - 3×10^{-4} M konsantrasyon aralığında AICAR'a yanıt olarak gözlenen gevşeme yanıtı, kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır (Şekil 3.3D).

AMPK aktivasyonunun EDCF-aracılı kasılma yanıtları üzerindeki etkisini ve bu yanıtın diabetik koşullardaki olası değişimini değerlendirmek amacıyla, aort preparatları AMPK aktivatörü AICAR ile (500 μ M, 30 dk) inkübe edilmiş ve

A23187-aracılı yanıtlar incelenmiştir. Kontrol preparatlarda AICAR inkübasyonu sonucunda EDCF yanıtlarının tamamen ortadan kaybolduğu gözlenmiştir. Diabetik grupta ise AICAR inkübasyonunun EDCF yanıtlarını anlamlı olarak azaltmasına karşın tamamen ortadan kaldırmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.6).

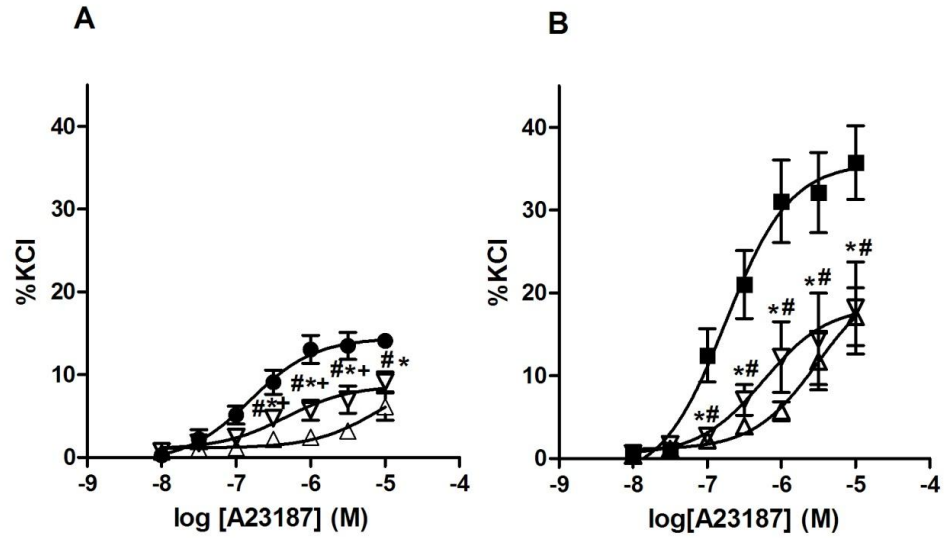


Şekil 3.6. Kontrol ve 4 haftalık diabetik hayvanlarda AICAR (500 µM, 30dk) inkübasyonunun L-NAME (10⁻⁴ M, 30dk) varlığında A23187 aracılı EDCF yanıtına etkisi ●: Kontrol (n=23, hayvan sayısı=16), ■: 4 haftalık diabetik (n=11, hayvan sayısı=10), □: AICAR inkübasyonu yapılan diabetik (n=4, hayvan sayısı=4), ○: AICAR inkübasyonu yapılan kontrol (n=4, hayvan sayısı=4). *, p<0.05 K vs K+AICAR/D vs D+AICAR.

3.2.6 Rho-kinaz inhibitörünün EDCF yanıtlarına etkisi

Rho-kinaz inhibitörü Y27632 ile gevşeme yanıtlarına ilişkin pD₂ değerlerinin kontrol ve diabetik grupta anlamlı olarak farklı olması nedeniyle Y27632'nin EDCF yanıtlarına etkisinin değerlendirileceği bu deney prosedüründe kontrol ve diabetik gruplarında Y27632 için farklı konsantrasyonlar belirlenmiştir. Kontrol grupta L-

NAME'e ek olarak Y27632 (10^{-7} M) inkübasyonu yapıldığında EDCF yanıtlarının azaldığı görülmüştür (Şekil 3.7A). Diabetik grupta ise L-NAME'e ek olarak Y27632 (10^{-8} M) inkübasyonu yapıldığında EDCF yanıtlarının Y27632 inkübasyonu yapılmayan preparatlardaki EDCF yanıtlarına göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (Şekil 3.7B).



Şekil 3.7. Y27632 ve CC inkübasyonlarının A23187-aracılı EDCF yanıtlarına etkisi. **(A)** Kontrol grupta L-NAME varlığında (10^{-4} M, 30 dk) Y27632 (10^{-7} M, 30 dk) ve Y27632+CC (20 μ M, 40 dk) inkübasyonlarının A23187-aracılı EDCF yanıtına etkisi. ●: Kontrol (n=23, hayvan sayısı=16), Δ: Y27632 inkübasyonu yapılan kontrol (n=5, hayvan sayısı= 3), ▽ : Y27632+CC inkübasyonu yapılan kontrol (n=4, hayvan sayısı=3). **(B)** 4 haftalık diabetik grupta L-NAME varlığında (10^{-4} M,30 dk) Y27632 (10^{-8} M,30 dk) ve Y27632+CC (20 μ M, 40 dk) inkübasyonlarının A23187-aracılı EDCF yanıtına etkisi. ■:4 haftalık diabetik (n=12, hayvan sayısı=11), Δ: Y27632 inkübasyonu yapılan 4 haftalık diabetik (n=7, hayvan sayısı= 5), ▽ : Y27632+CC inkübasyonu yapılan 4 haftalık diabetik (n=8, hayvan sayısı=4). *, p<0.05 vs K/D, #, p<0.05 vs Y27632.

3.2.7 Rho-kinaz inhibitörü Y27632 ve AMPK inhibitörü CC'nin kontrol ve diabetik EDCF yanıtları üzerindeki etkisi

Rho-kinaz ve AMPK yollarının birlikte inhibe edilmesinin, inhibitörlerin tek başına uygulandığı koşullar ile karşılaştırıldığında EDCF yanıtları üzerinde additif bir etkinlik gösterip göstermediği kontrol ve 4 haftalık diabetik aort preparatlarında L-NAME inkübasyonuna ek olarak Y27632 (Rho-kinaz inhibitörü) ve CC (AMPK inhibitörü) inkübasyonları yapılarak değerlendirilmiştir. Kontrol grupta L-NAME varlığında Y27632+CC (10^{-7} / 2×10^{-5} M) inkübasyonu yapılan preparatlarda EDCF yanıtı, sadece Y27632 (10^{-7} M) inkübasyonu yapılarak elde edilen EDCF yanıtı ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır (Şekil 3.7A). Diabetik grupta ise L-NAME varlığında Y27632+CC (10^{-8} / 2×10^{-5} M) inkübasyonu yapılan damarlardaki EDCF yanıtlarıyla sadece Y27632 (10^{-8} M) inkübasyonu yapılan damarlardaki yanıtlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 3.7B). Her iki grupta da L-NAME varlığında Y27632+CC inkübasyonu ile EDCF yanıtları sadece L-NAME inkübasyonu yapılan preparatlara göre anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 3.7A ve 3.7B).

3.3 Western blot deneyleri

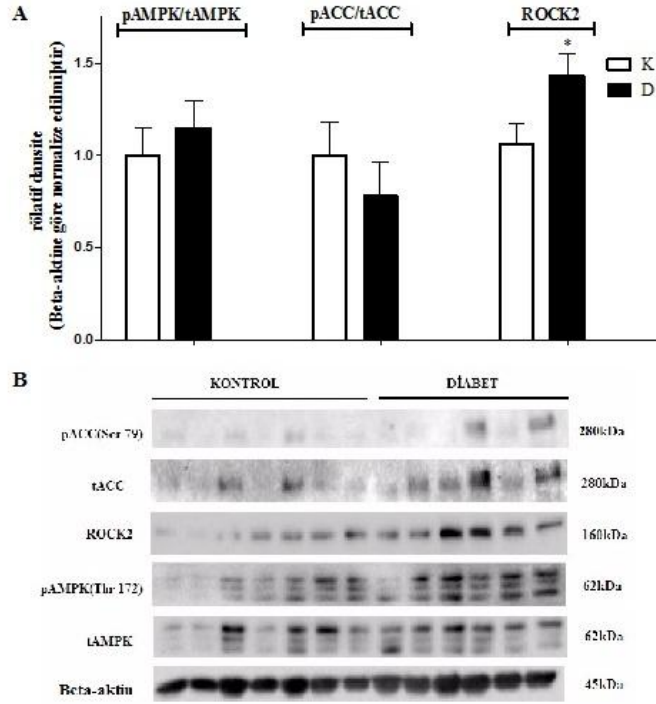
Toraksik aort preparatlarında yapılan western blot deneylerinde kontrol ve kısa dönem diabetik gruplarda;

- AMPK yolağının aktivitesini değerlendirmek amacıyla pAMPK (*phospho-AMPK α* , Thr 172) , tAMPK, pACC (*phospho- Acetyl-CoA Carboxylase*, Ser79) ve tACC proteinlerinin,
- Rho-kinaz yolağının aktivitesini değerlendirmek amacıyla ROCK2 proteinin düzeyleri incelenmiştir.

Organ banyosunda inkübasyon yapılan tüm damar preparatlarında L-NAME varlığında A23187-aracılı EDCF yanıtları çalışıldıktan sonra damarlar organ banyosundan çıkarılarak -80°C’de saklanmıştır.

3.3.1 4 haftalık diabetin AMPK/ACC fosforilasyon düzeyleri ile ROCK2 protein düzeyleri üzerindeki olası etkisi

Kontrol ve 4 haftalık diabetik grupta pACC, tACC, pAMPK, tAMPK, ROCK2 proteinlerine spesifik primer antikorlar kullanılarak sözü edilen proteinlerin düzeyleri değerlendirilmiştir. Kontrol ve 4 haftalık diabetik gruplarda pACC/tACC, pAMPK/tAMPK ve ROCK2 band yoğunlukları beta-aktine oranlanarak normalize edilmiştir (Şekil 3.8A ve 3.8B). pAMPK/tAMPK/beta-aktin ve pACC/tACC/beta-aktin oranlarında gruplar arasında istatistiksel bir farklılık belirlenmemiş, ROCK2/beta-aktin oranı ise 4 haftalık diabette kontrole göre istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (Şekil 3.8A).



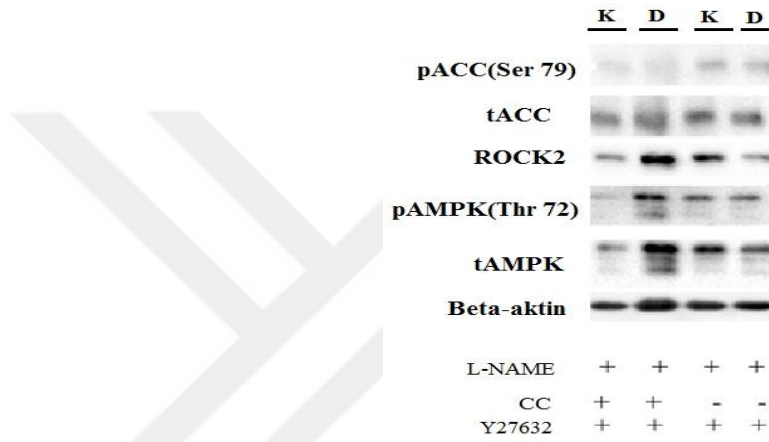
Şekil 3.8 4 haftalık diabetesin AMPK ve ACC fosforilasyonları ile ROCK2 protein düzeyleri üzerindeki etkisi. **(A)** Çalışılan üç protein düzeyine ait band yoğunluklarının analizi ve **(B)** çalışılan proteinlere ait bandların görsel gösterimi. Her bir kuyucuğa yüklenen örnek, 4 farklı sıçana ait torasik aort preparatlarından hazırlanmıştır. Kontrol grubu için 7 farklı örnek, diabetes grubu için 6 farklı örnek kullanılarak analiz yapılmıştır. Analiz sonuçları, aynı örneklerin kullanıldığı iki bağımsız deney sonucunun ortalamalarını göstermektedir. Çalışılan proteinlere ait band görüntüleri, kDa değerlerine göre sıralanmıştır. K: Kontrol, D: 4 haftalık diabetes. *, $p < 0,05$ vs. K.

3.3.1 *In vitro* tedavilerin AMPK/ACC fosforilasyonuna etkisi

L-NAME, CC, Y27632 ve AICAR inkübasyonlarının tek başına ya da birlikte *in vitro* koşullarda uygulandığı aort preparatlarında pAMPK, tAMPK, pACC, tACC ve ROCK2 protein düzeyleri kontrol ve diabetes gruplarında incelenmiştir (Şekil 3.10)

In vitro L-NAME inkübasyonu yanında CC inkübasyonu yapılan damar preparatlarında pAMPK/tAMPK/aktin ve pACC/tACC/aktin oranları sadece L-

NAME+Y27632 inkübasyonu yapılan damar preparatlarına göre daha azalmaktadır. (pAMPK/tAMPK/aktin: K/L-NAME+Y27632: 1.21 ± 0.004 , K/L-NAME+Y27632+CC: 1.56 ± 1.23 . ; D/L-NAME+Y27632: 1.51 ± 0.15 , D/L-NAME+Y27632+CC: 0.67 ± 0.06 . pACC/tACC/aktin: K/L-NAME+Y27632: 0.55, K/L-NAME+Y27632+CC: 0.54. D/L-NAME+Y27632: 0.73, D/L-NAME+Y27632+CC: 0.26). (Şekil 3.9)



Şekil 3.9 4 haftalık diabet ve kontrol grubuna ait torasik aort preparatlarında in vitro L-NAME (10^{-4} M, 30 dk) ve Y27632 (kontrol için: 10^{-7} M, 30 dk; diabet için: 10^{-8} M, 30 dk) inkübasyonları varlığında CC (20 μ M, 40 dk) inkübasyonunun fosforile AMPK ve ACC ile ROCK2 protein düzeyleri üzerindeki etkisi. K: kontrol, D: diabet

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda, öncelikle sıçan aort preparatında EDCF-aracılı kasılma yanıtlarının karakterizasyonu yapılmıştır. EDCF yanıtlarının karakterizasyonunun ardından *in vitro* hiperglisemik koşullarda EDCF yanıtları incelenmiştir. *In vitro* hiperglisemik koşullarda EDCF yanıtları uzayan inkübasyon süresiyle birlikte hem normoglisemik hem de hiperglisemik ortamda beklenenin tersine azalmıştır (Şekil 3.2). Bu nedenle hiperglisemik ortamda artan EDCF yanıtlarını değerlendirmek anlamlı olmayacağı için *in vitro* hiperglisemik ortam yerine kısa dönem STZ-diabetik sıçanlarda EDCF yanıtlarının çalışılmasına karar verilmiştir. 4 haftalık STZ ile indüklenen diabet varlığında EDCF-aracılı yanıtlardaki olası değişiklikler belirlenmiş ve bu değişikliklerin Rho-kinaz ve AMPK sinyal yolları ile olası ilişkisi incelenmiştir.

Çalışmamız ile ulaştığımız sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Sıçan torasik aort preparatında EDCF yanıtları (i) endotel-bağımlı, (ii) COX ürünleri ile bağlantılı ve (iii) TP reseptörü-aracılı gerçekleşmektedir (Şekil 3.1A ve 3.1B).
2. Kısa süreli (4 haftalık) diabette, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, endotel-aracılı gevşeme yanıtlarında bir değişiklik gözlenmemesine karşın (Şekil 3.3B), Ca^{+2} iyonoforu A23187-aracılı gerçekleşen EDCF maksimum yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.3A). A23187-aracılı EDCF yanıtlarının pD_2 değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (K: 6.74 ± 0.09 , $n=15$; D: 6.92 ± 0.14 , $n=10$, $p>0.05$).
3. Kısa süreli diabette sıçan aortunda Rho-kinaz sinyal yolağının duyarlılığında anlamlı bir artış saptanmıştır (Şekil 3.3C). Bu bulgumuzu destekler biçimde, 4

haftalık diabette ROCK2 protein düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.8).

4. Diabetik sıçan aortunda tek doz Phe ile elde edilen maksimum yanıtlarda bir farklılık gözlenmemiştir (K: 1026.15 ± 51.46 mg n=62, deney hayvanı sayısı=17; D: 922.49 ± 43.09 mg n=51, deney hayvanı sayısı=15, $p > 0.05$). Agonist-aracılı maksimum yanıtlarda değişiklik olmaksızın, Rho-kinaz inhibitörü ile değerlendirilen gevşeme yanıtlarının sola kayması, reseptör sayısındaki artıştan çok Rho-kinaz sinyal yolağının duyarlılığındaki artışı düşündürmektedir.

5. Kısa süreli diabette sıçan aortunda AMPK ve AMPK'nın aşağıakım hedefi ACC'nin fosforilasyon düzeylerinde anlamlı bir artış görülmemekle birlikte (Şekil 3.8), AMPK aktivatörü AICAR-aracılı gevşeme yanıtlarının diabetiklerde arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.3D). Ek olarak, A23187-aracılı kasılma yanıtlarının AICAR inkübasyonu ile ne ölçüde antagonize edildiği değerlendirilmiştir (Şekil 3.6).

6. L-NAME varlığında Y27632 inkübasyonu kontrol ve diabetiklerde A23187-aracılı kasılma yanıtlarını konsantrasyon-bağımlı olarak inhibe etmiştir (Şekil 3.4A ve B). Kontrol ve diabetik gruplar için ayrı ayrı seçilen konsantrasyonlarda Y27632 inkübasyonu ile EDCF yanıtlarında gözlenen inhibisyon, kontrollerde AMPK inhibitörü CC inkübasyonu ile anlamlı bir şekilde geri çevrilmiştir (Şekil 3.7A). Buna karşın, diabetiklerde CC inkübasyonunun, kontrollerde gözlenen etkisinin kısmen azaldığı gösterilmiştir (Şekil 3.7B). CC inkübasyonunun AMPK sinyal yolağı üzerindeki inhibitör etkisi, her iki grupta da pAMPK ve pACC düzeylerindeki azalma ile gösterilmiştir (Şekil 3.9).

Çalışmamızda klasik farmakolojik yöntemler kullanılarak, sıçan torasik aort preparatında EDCF-aracılı yanıtların karakterizasyonu, kısa dönem STZ-diabette EDCF yanıtlarındaki olası değişiklikler ve bu olası değişikliklerin Rho-kinaz ve AMPK sinyal yolakları açısından değerlendirilmesi yapılmıştır. İlk olarak, EDCF yanıtının *in vitro* koşullardaki karakterizasyonunun yapılması için uygun protokol belirlenmiştir. Literatür incelendiğinde, Ach ile endotelial muskarinik M₃ reseptör uyarımına ek olarak ATP (Koga ve ark., 1989; Mombouli ve Vanhouste, 1993; Yang ve ark., 2004) ve VEGF (Liu ve ark., 2001) gibi vazoaktif bileşikler ile kalsiyum

iyonoforu A23187 (Yang ve ark., 2004; Tang ve ark., 2007) gibi reseptör uyarımından bağımsız uyaranlara yanıt olarak endotel-bağımlı kontraksiyonların farklı türlerdeki çeşitli damar yataklarında elde edildiği belirtilmektedir (Furchgott ve Vanhoutte, 1989; Lüscher ve Vanhoutte, 1986; Vanhoutte ve ark., 2005). Ek olarak, EDCF yanıtının NOS inhibisyonu varlığında önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Lüscher ve Vanhoutte, 1986; Auch-Schwelk ve ark., 1992; Iwama ve ark., 1992; Yang ve ark., 2002). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda EDCF-aracılı yanıtlar için endotelli damar preparatlarında NOS inhibisyonu varlığında endotelde Ca^{+2} konsantrasyonunu arttıran bir ajan olan A23187 konsantrasyon-yanıt eğrisi çalışılmıştır. Kontrol grubunda elde ettiğimiz A23187-aracılı kasılma yanıtının, endoteli hasarlanmış preparatlarda ortadan kalkması, elde ettiğimiz kasılma yanıtlarının endotel- kaynaklı olduğunu göstermektedir.

Spontan hipertansif sıçan aortunda ve köpek basiler arterinde asetilkolin ile, köpek veninde de araşidonik asit ile alınan endotel-bağımlı kasılmalar, selektif olmayan COX inhibitörü indometazin ile inhibe edilmektedir (Miller ve Vanhoutte, 1985; Lüscher ve Vanhoutte, 1986; Katusic ve ark., 1988). Bu sonuçlar, endotel-bağımlı kontraksiyonların oluşumunda araşidonik asit ve prostanoidlerin önemini göstermektedir (Vanhoutte ve ark., 2005). COX'lar araşidonik asidin endoperoksitlere metabolize olmasını sağlamaktadırlar. Oluşan endoperoksitler ise PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 ve TXA_2 gibi ürünlerin oluşumuna aracılık eden enzimler tarafından parçalanmaktadır (Funk, 2001). EDCF yanıtına aracılık eden prostaglandinin hangisi olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte, belirtilen prostaglandinlerden biri ya da birkaçının endotelden düz kasa difüze olarak düz kasta bulunan TP reseptörlerini uyardığı ve kasılma yanıtının oluştuğu varsayılmaktadır (Huang ve ark., 2004; Vanhoutte ve ark., 2005). COX-bağımlı ve endotel-bağımlı kontraksiyon yanıtlarından bir çoğunun TP reseptör antagonistleri tarafından ortadan kaldırılması (Teschmarmann ve ark., 1990; Auch-Schwelk ve ark., 1990; Kato ve ark., 1990; Mayhan, 1992; Yang ve ark., 2002, 2003; Zhou ve ark., 2005), bu hipotezi güçlendirmektedir. TP reseptör aktivasyonu üzerinden gerçekleşen kasılma yanıtları, reseptör-aracılı ve voltaj-aracılı Ca^{+2} kanallarının açılması sonucunda hücre içine

Ca^{+2} girişindeki artış ve miyofilamentlerin Rho-kinaz-aracılı duyarlılığındaki artış ile gerçekleşmektedir (Okon ve ark., 2002; Huang ve ark., 2004; O'Rourke ve ark., 2006). Çalışmamızda, literatür bilgisini doğrular şekilde, NOS bloğu varlığında indometazin ve TP reseptör antagonisti S18886 inkübasyonlarının A23187-aracılı kasılma yanıtlarını ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Sonuçlarımız, L-NAME ile NOS bloğu yapılmış endotelli aort preparatlarında 10^{-8} - 10^{-5} M konsantrasyon aralığında alınan A23187-aracılı kasılma yanıtlarının EDCF yanıtları olduğunu göstermektedir (Vanhoutte ve Tang, 2008; Feletou ve ark., 2009).

Kısa süreli STZ-diabetin endotel fonksiyonu üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi, Ach-aracılı gevşeme yanıtları ve EDCF-aracılı kasılma yanıtları aracılığıyla yapılmıştır. STZ uygulamasından sonra, kontrol ile karşılaştırıldığında diabetik grubun kan şekeri değerlerinde gözlenen artış ve beden ağırlıklarında gözlenen azalma, deneysel olarak STZ-diabet tablosunun geliştiğini göstermektedir. 4-haftalık sürenin sonunda diabetik gruba ilişkin Ach-gevşeme yanıtlarının kontrolden farklı olmaması, kısa süreli diabette endotel-aracılı gevşeme yanıtlarının bozulmadığına ilişkin bir bulgudur. Ne var ki, Vanhoutte ve ark. (2016), kontrol, yaşlı ya da patolojik deney hayvanlarından izole edilen damar preparatlarında NO-aracılı yanıtları karşılaştırırken, yalnızca NO üretimi için güçlü bir uyaranla (örneğin Ach, bradikinin ya da sürtünme stresi) alınan yanıtların endotel bütünlüğü için tek başına bir gösterge olmayabileceğini, endotel hasarının daha düşük etkinliğe sahip ikinci bir endotel-bağımlı gevşetici ajanla (α_2 -adrenerjik agonistler, insülin, serotonin) daha açık bir şekilde ortaya konabileceğini belirtmişlerdir. Bir başka anlatımla, belirtilen deney gruplarında Ach yanıtları arasında fark olmaması, ille de endotel hasarının oluşmadığı anlamına gelmemektedir. Kaynak olarak belirtilen yayının (Vanhoutte ve ark., 2016) alışmamızın son döneminde yayınlanmış olması nedeniyle, alışmamızda, Ach'e ek olarak ikinci bir ajanla endotel-aracılı gevşeme yanıtları kontrol edilememiştir. Diabetiklerde L-NAME varlığında A23187-aracılı maksimum kasılma yanıtlarında gözlenen artış, diabetik aortta endotel-aracılı kasılma fonksiyonunun kontrole göre daha aktif olduğunun bir kanıtıdır. 4-haftalık diabette gözlenen endotel-aracılı hiperkontraktilite tablosunun endotelin kasılma

fonksiyonundaki/duyarlılığındaki artıştan kaynaklandığı düşünülebilir. Diabetiklerde, A23187-aracılı konsantrasyon-yanıt eğrisinin pD_2 değerinin kontrolden farklı olmamasına ek olarak maksimum yanıtlarda gözlenen artış, diabetik koşullarda vasküler düz kasta işgal edilen ya da artan TP reseptör sayısı (upregülasyon) ile açıklanabilir.

Yukarıda da belirtildiği gibi, TP reseptör uyarımı sonucunda kasılma yanıtının oluşmasındaki mekanizmalardan biri, miyofilamentlerin Rho-kinaz duyarlılığındaki artıştır. Artmış Rho-kinaz aktivitesinin oksidatif strese ve kardiyovasküler hastalıkların gelişimine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Shimokawa, 2016). Birçok çalışmada Rho-kinaz'ların endotelial fonksiyon üzerindeki olası etkileri, Rho-kinaz inhibitörleri kullanılarak açıklanmıştır. Endotelial Rho-kinaz aktivitesinin eNOS mRNA stabilitesini azaltarak eNOS ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Laufs ve Liao, 1998; Zhou ve Liao, 2009). Ek olarak, Rho-kinaz'ların PI3K/Akt (fosfatidilinozitol 3-kinaz/ protein kinaz B, PKB) yolağını inhibe ederek ve arjinaz aktivitesini uyararak eNOS'un katalitik aktivitesini azalttığı kanıtlanmıştır (Ming ve ark., 2002, 2004; Wolfrum ve ark., 2004). Ayrıca statinlerin pleotropik etkileri gibi Rho-kinaz inhibitörlerinin de kardiyovasküler sistem üzerindeki bazı yararlı etkileri, sözü edilen ajanların NO üretimi ve kullanımı (*bioavailability*) üzerindeki olumlu etkileri ile ilişkilendirilmektedir (Rikitake ve Liao, 2005). Endotelial hücreler üzerinde Rho-kinaz'ın belirtilen etkilerini destekler şekilde, *in vivo* farmakolojik Rho-kinaz inhibisyonu, hipertansiyon ve diyabet gibi endotelial fonksiyon bozukluğu ile ilişkili patolojik durumların deneysel modellerinde endotel-bağımlı gevşeme ile eNOS ekspresyonu ve aktivitesini iyileştirerek endotelial fonksiyonu düzeltmiştir (Higashi ve ark., 2003; Bivalacqua ve ark., 2004; Shah ve Singh, 2006a ve b; Horowitz ve ark., 2007; Arita ve ark., 2009; Nuno ve Lamping, 2010; Tsounapi ve ark., 2012). Diabetiklerde gözlenen fonksiyon bozuklukları ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biri vasküler problemlerdir (Creager ve ark., 2003). NO üretimindeki azalma ve bunu izleyen indüklenmiş oksidatif stres ve inflamasyonun bir sonucu olan “hiperglisemi ile indüklenen endotelial fonksiyon bozukluğu”, diabetiklerde ateroskleroza yatkınlığı başlatan ilk faktördür. Rho-kinaz

inhibitörlerinin yararlı etkilerine ek olarak, diabetik sıçanların endotelial ROCK2 ekspresyonlarında gözlenen 2.5 katlık artış, diabetle indüklenen endotelial fonksiyon bozukluğunda ROCK'ların rolünü desteklemektedir (Cicek ve ark., 2013). Farelerde geliştirilmiş STZ-diabet modelinde, glukoz düzeylerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamakla birlikte, *Rock1* ya da *Rock2* heterozigot gen silinmesi kan basıncında diabetle indüklenen artışı ortadan kaldırmıştır (Yao ve ark., 2013). *Rock1*^{+/-} ya da *Rock2*^{+/-} aort preparatlarında Phe'e alınan maksimum kontraktıl yanıt değişmemiş, ancak duyarlılık anlamlı olarak azalmıştır. *Rock1*^{+/-} ya da *Rock2*^{+/-} farelerin aortlarında endotel-bağımlı gevşeme ve NO üretimi kontrollere göre anlamlı şekilde artmış ve diabetle indüklenen endotelial fonksiyon bozukluğu kısmen ortadan kalkmıştır. Çalışmamızda, kısa süreli diabette Rho-kinaz aktivitesindeki olası değişiklikler *in vitro* koşullarda Rho-kinaz inhibitörü Y27632 kullanılarak ve torasik aort preparatlarında ROCK2 protein düzeyleri incelenerek değerlendirilmiştir. Bu amaçla, tek doz Phe ile ön kastırılmış endotelli aort preparatlarında Y27632'nin Phe-aracılı kasılma yanıtını ne ölçüde geri çevirebildiği konsantrasyon-bağımlı olarak çalışılmıştır. Phe, vasküler düz kasta G_q-kenetli α -adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu sonucunda kasılma yanıtı oluşturmakta ve sinyal yolağında Rho-kinaz aktivitesi de rol almaktadır. Sonuçlarımız, Y27632 konsantrasyon-yanıt eğrisinin diabetiklerde kontroller ile karşılaştırıldığında sola kaydığını göstermektedir. Diabete bağlı Rho-kinaz duyarlılığında artış olarak değerlendirilebilecek bu sonuç, Rho-kinaz'ın hem endotelde hem de düz kasta aracılık ettiği etkilerle birarada yorumlanmalıdır. Daha önce de belirtildiği gibi, Rho-kinaz endotelde NO üretimini baskılar şekilde etkinlik göstermekte ve sağlıklı koşullarda vasküler tonus her iki sinyal yolağının aktivitesiyle dengede kalmaktadır. Sözü edilen dengenin NO aleyhine bozulması, dolaylı olarak Rho-kinaz aktivitesinin artışı olarak ortaya çıkabilir. Protokolümüzde konsantrasyon-yanıt eğrisi olarak çalışılmamış olsa da, kontrol ve diabetik gruplar arasında 10⁻⁶ M Phe ile elde edilen kasılma yanıtlarında farklılık bulunmamıştır. Maksimum kasılma yanıtına yansımayan ancak kasılma yanıtının daha düşük Y27632 konsantrasyonlarında geri çevrilmesini sağlayan endotel-kaynaklı hasarın endoteldeki eNOS aktivitesinin azalması olabileceği öne sürülmektedir (Vanhoutte ve ark., 2016). Bu noktada, diabet varlığında Ach ile elde edilen gevşeme yanıtlarında bir değişiklik olmamasına karşın, Y27632 ile gösterilen

Rho-kinaz duyarlılığındaki artışın nedeni olarak eNOS aktivitesindeki azalmanın speküle edilmesi bir çelişki olarak düşünülebilir. Yukarıda da açıklandığı gibi, çalışmamızda endotel bütünlüğünün sadece Ach-aracılı gevşeme yanıtları ile değerlendirilmesinin yeterli olmayabileceği, Vanhoutte ve ark. (2016),’nın son çalışmalarında belirttikleri deneysel bir yorum sayesinde farkedilmiştir. Bu durumda, çalışmamızda Ach-aracılı gevşeme yanıtları ile yakalayamadığımız azalmış NOS aktivitesi ile ilişkili endotel hasarın, Rho-kinaz duyarlılığındaki artış ile dolaylı bir şekilde değerlendirilmesi mümkün olmuştur. Torasik aort preparatlarında ROCK2 protein düzeylerinin diabetik koşullarda kontrollere göre anlamlı olarak artmış olması, fonksiyonel olarak gösterdiğimiz Rho-kinaz duyarlılığındaki artışın bir nedeni olarak değerlendirilebilir.

AMPK sinyal yolağının aktivasyonu sonucunda, endotelde eNOS’un Ser1177’den (Chen, 1999; Chen, 2003; Chen, 2009; Davis ve ark., 2006; Harris, 2001; Morrow, 2003; Thors, 2004) ve Ser633’ün (Chen, 2010) fosforilasyonu gerçekleşmekte ve NO kullanımı artmaktadır. Ek olarak, sağlıklı domuz, fare ve sıçanlardan izole edilen arterlerde hipoksi (Rubin, 2005), AICAR (Goirand ve ark., 2007) ve metformin (Majithiya ve Balaraman, 2006) gibi AMPK aktivatörlerine yanıt olarak endotele bağlı olmayan gevşemelerin elde edilmesi, vazorelaksasyonun vasküler düz kasta bulunan AMPK aktivasyonuna da bağlı olduğunu göstermektedir. Biyokimyasal çalışmalar, AMPK’nın doğrudan MLCK’nın hücre içi Ca^{+2} duyarlılığını azaltarak belirtilen kinazı etkilediğini (Horman, 2008) ve vasküler tonüsü azalttığını kanıtlamaktadır. Bir arada değerlendirildiğinde, AMPK’nın vazomotor fonksiyonları endotel-bağımlı ve endotelden bağımsız mekanizmalarla düzenlediği görülmektedir (Ford ve Rush, 2011). Çalışmamızda AMPK sinyal yolağı, iki farklı protokol kullanılarak incelenmiştir. Bunlardan ilki, Phe ile ön kısırlanmış endotelli aort preparatlarında AMPK aktivatörü olan AICAR konsantrasyon-yanıt eğrilerinin elde edilmesidir. İkinci protokolümüzde ise, L-NAME ve AICAR inkübasyonları uygulanmış aort preparatlarında A23187-aracılı kasılma yanıtları çalışılmıştır. Kullanılan iki protokol arasında dikkat edilmesi gereken bir farklılık vardır: ilk protokolde endotel-bağımlı ve endotelden bağımsız

AMPK gevşeme yanıtları doğrudan değerlendirilirken, ikinci protokolde yalnızca vasküler düz kasa ilişkin AMPK gevşeme yanıtları dolaylı olarak değerlendirilmektedir. L-NAME inkübasyonunun EDCF yanıtlarının çalışıldığı protokolde yer alması nedeniyle, ikinci protokolde AICAR ile indüklenen AMPK yanıtları, NOS'a bağımlı olmayan, bir başka anlatımla vasküler düz kasa ilişkin yanıtlardır. İlk protokole ilişkin sonuçlar, AICAR-aracılı gevşeme yanıtlarının diabetiklerde kontrollere göre anlamlı olarak arttığını göstermektedir (Şekil 3.3D). İkinci protokole ilişkin sonuçlar değerlendirilirken, deney gruplarının A23187-aracılı kasılma yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözönüne alınmalıdır. Bu nedenle, kontrol ve diabetik gruplarda benzer kasılma yanıtları oluşturan A23187 konsantrasyonunda (3×10^{-7} M) AICAR inkübasyonu ile indüklenen antagonizma değerlendirilmiştir. Görüleceği gibi, her iki grupta da AICAR inkübasyonu, 3×10^{-7} M A23187 ile gözlenen EDCF-aracılı kasılma yanıtlarını tümüyle baskılamıştır. Sonuç olarak, diabetiklerde kontrole göre endotel-bağımlı AMPK-aracılı gevşeme yanıtlarında artış gözlenmiş, buna karşın endotelden bağımsız AMPK-aracılı gevşeme yanıtlarında bir farklılık saptanmamıştır. 4 haftalık diabetiklerde kontrollere göre AMPK aktivitesindeki olası değişikliği daha ayrıntılı değerlendirebilmek için AMPK ve ACC proteinlerinin düzeyleri incelenmiştir. Yağ asidi metabolizmasını düzenleyen biotin-bağımlı bir enzim olan ACC, AMPK'nın aşağı akım hedefidir. AMPK, ACC'i Ser 79, 1200 ve 1215 konumlarından fosforilleyerek inaktif hale getirmektedir. Deneysel olarak AMPK aktivitesinin değerlendirilmesi, fosforile AMPK (AMPK-Thr172) ve fosforile ACC (ACC-Ser79) düzeylerinin birarada incelenmesi ile yapılmaktadır (Ha ve ark., 1994; Ford ve Rush, 2011; Kawaguchi ve ark., 2016). Çalışmamızda fosforile AMPK ve ACC protein düzeyleri incelendiğinde kontrol ve diabetik grup arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil 3.8). Sonuçlarımız, kısa süreli diabette AMPK aktivitesinin değişmediğini göstermektedir.

Diabetiklerde kontrollere göre artmış Rho-kinaz duyarlılığının gösterildiği sonuçlarımıza ek olarak, L-NAME varlığında A23187-aracılı kasılma yanıtlarının Y27632 ile ne ölçüde bloke olduğu kontrol ve diabetik gruplarda incelenmiştir. Bu

amaçla, üç farklı konsantrasyonda Y27632 inkübasyonu yapılarak A23187-aracılı kasılma yanıtlarındaki inhibisyon değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız, aynı konsantrasyonda uygulanan Y27632 inkübasyonunun diabetiklerde kontroller ile karşılaştırıldığında daha belirgin bir inhibisyon yaptığını, bir başka anlatım ile diabetiklerde daha düşük Y27632 konsantrasyonu ile kontrollere benzer ölçüde inhibisyon yakalandığını göstermektedir (Şekil 3.7). Bu sonuç, Phe ile ön-kastırılmış endotelli aort preparatlarında Y27632-aracılı gevşemelerin diabetiklerde kontrollere göre sola kayması ile örtüşmektedir. A23187-aracılı kasılma yanıtlarının L-NAME varlığında çalışılması, vasküler düz kastaki Rho-kinaz etkinliğini yansıtmaktadır. Bir arada değerlendirildiğinde, kısa süreli diabette Rho-kinaz duyarlılığının hem endotel hem de vasküler düz kasta arttığı öne sürülebilir.

EDCF yanıtlarında Rho-kinaz ve AMPK sinyal yollarının olası etkilerinin birlikte değerlendirilebilmesi amacıyla, kontrol ve diabetik gruplarda Y27632 inkübasyonu ile EDCF yanıtlarında gözlenen inhibisyonun, AMPK inhibisyonu ile ne oranda değiştiği araştırılmıştır. EDCF yanıtlarında deney grupları için ayrı ayrı belirlenen konsantrasyonlarda Y27632 ile sağlanan yaklaşık %50 düzeyindeki inhibisyon, kontrollerde AMPK inhibitörü CC inkübasyonu ile anlamlı bir şekilde geri çevrilmiştir. Buna karşın, diabetiklerde CC inkübasyonu, kontrollerde gözlenen “olumlu” etkisi kısmen göstermiştir. Bir başka anlatımla, çalışmamızda AMPK inhibitörü ile dolaylı olarak gösterilen NOS’a bağımlı olmayan AMPK aktivasyonu, diabetiklerde kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştır. Bu bulgu ile, AICAR inkübasyonu ile A23187-aracılı kasılma yanıtlarında gözlenen inhibisyon %’lerinin her iki grupta da benzer olması birbiriyle çelişkili görünmektedir. AMPK aktivatörü ile A23187-aracılı kasılma yanıtlarında gözlenen inhibisyon, fizyolojik bir antagonizma örneğidir. Ca^{+2} iyonoforu A23187 ile endotelde indüklenen Ca^{+2} artışına yanıt olarak COX ürünlerinin sentezi, TP reseptör işgali ve ROCK aktivasyonu sonucunda kasılma yanıtları oluşmaktadır. AMPK aktivasyonuna yanıt olarak, düz kasta artmış olan Ca^{+2} düzeyleri azalmakta ve bu mekanizma ile AICAR inkübasyonuna yanıt olarak A23187-aracılı kasılma yanıtlarında inhibisyon gözlenmektedir (Schneider ve ark., 2015). Düz kasta gerçekleşen ve AICAR ile

indüklenen AMPK aktivasyonuna bakılarak AMPK aktivitesinin diabetiklerde korunduğu söylenebilir. Ancak, yine düz kasta AMPK inhibitörü ile elde edilen bulgular, bazal AMPK aktivitesinin diabetiklerde kontroller ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük olduğu göstermektedir. Her iki bulgu göz önüne alındığında, vasküler düz kasta bazal AMPK aktivitesinin diabetiklerde azaldığı ancak güçlü bir aktivatör ile uyarıma yanıt olarak kontrol ve diabetikler arasındaki farkın ortadan kaybolduğu söylenebilir. Benzer sonuçlar spontan hipertansif sıçan modelinde AMPK aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada da gözlenmiştir (Ford ve Rush, 2011). Araştırmacılar, spontan hipertansif sıçan aortunda bazal AMPK aktivitesinin kontrollerle karşılaştırıldığında düşük olduğunu göstermişler, AICAR-aracılı gevşeme yanıtlarının ise spontan hipertansif sıçanlarda kontrollere göre daha fazla olduğu ve AICAR inkübasyonu ile Ach-aracılı EDCF yanıtlarındaki inhibisyonun da her iki grupta aynı düzeyde olduğu belirtmişlerdir (Ford ve Rush, 2011). Ayrıca, AICAR inkübasyonu ile Ach-aracılı kasılma yanıtlarında gözlenen inhibisyonun AMPK inhibitörü CC ile geri çevrilme oranı, spontan hipertansif aortlarda kontrollere göre daha az bulunmuştur (Ford ve Rush, 2011). Çalışmamızda kontrol ve diabetik gruplarda AICAR ve CC-aracılı yanıtlara ilişkin çelişkili görünen sonuçlar, kısa süreli diabette aktivatör ile uyarılan (AICAR-aracılı) ve inhibitör ile baskılanan (CC-aracılı) AMPK aktiviteleri arasında fark olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda, kısa süreli diabette fosforile AMPK ve ACC protein düzeylerinin kontrollere göre anlamlı olarak değişmediği görülmüştür. Bu noktadan yola çıkarak, bazal AMPK aktivitesinin, herhangi bir uyarımın olmadığı koşullarda, AMPK inhibitörü ile baskılanması sonucunda elde edilecek yanıtın kontrollere göre daha düşük olabileceği, buna karşın, bazal AMPK aktivitesinde inhibitör ile gözlenen bu değişikliğin aktivatör ile uyarım sonucunda ortadan kalkabileceği öne sürülebilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sıçan aortunda EDCF-aracılı kasılma yanıtları COX ürünleri ve TP reseptör aktivasyonu ile ilişkilidir. Kısa süreli diabette EDCF-aracılı kasılma yanıtlarında ve Rho-kinaz duyarlılığında artış gözlenmektedir. Sözü edilen Rho-kinaz duyarlılığındaki artış hem endotel hem de vasküler düz kasta gerçekleşmektedir. Diabetik aort preparatlarında AMPK aktivatörü AICAR-aracılı gevşeme yanıtları artmıştır. Ek olarak, endotele bağımlı olmayan AICAR-aracılı gevşeme yanıtları diabetiklerde korunmuştur. Sonuçlarımız, kısa süreli diabette hiperglisemi ile indüklenen endotel hasarı oluştuğunu göstermektedir. Ek olarak, AMPK sinyal yolağının aktivasyonunun, vazorelaksasyonun korunması ve iyileştirilmesi açısından oldukça yararlı bir terapötik yaklaşım olabileceği görülmektedir. Kasılma prosesinden sorumlu bir sinyal yolağı olan Rho-kinaz duyarlılığındaki artışa karşın, vasküler dokuda AMPK aktivasyonunun sağlanmasının ve sürdürülmesinin, diabet gibi vasküler komplikasyonların önemli bir mortalite nedeni olduğu patolojilerde yeni bir tedavi seçeneği olarak hedeflenmesi önemlidir.

ÖZET

In vitro Hiperglisemik Ortamda Gözlenen Endotel Kaynaklı Kastırıcı Faktör (EDCF) Yanıtlarına Rho-kinaz ve AMPK Sinyal Yolaklarının Katkısı

Diabetin neden olduğu mortalite ve morbidite, genellikle mikrovasküler (retinopati, nöropati, nefropati) ve makrovasküler (kardiyovasküler ve serebrovasküler) komplikasyonlardan kaynaklanmaktadır. Hiperglisemi endotel fonksiyonlarını bozarak vasküler tonusu olumsuz olarak etkilemektedir. Vasküler tonus fizyolojik koşullarda EDRF, EDHF ve EDCF tarafından kontrol edilmektedir.

Patolojik durumlarda endotel-kaynaklı gevşemenin azalması, EDRF üretimindeki azalmaya bağlı olabileceği gibi EDCF düzeyinin artmasına da bağlı olabilmektedir. EDCF hipertansiyon, diabet gibi hastalıklarda artmaktadır. Bu çalışmada *in vitro* hiperglisemik koşullarda EDCF yanıtlarındaki olası değişiklikler değerlendirilmiştir. Ancak seçtiğimiz patolojinin deney protokolü nedeniyle, EDCF yanıtlarının sağlıklı bir şekilde alınmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmaya kısa dönem diabetik sıçanlardaki EDCF yanıt değişiklikleri incelenerek devam edilmiştir. Diabetik sıçanlarda artan EDCF yanıtlarına, birbirine ters etki yapan Rho-kinaz ve AMPK yolaklarının katkısı incelenmiştir. Rho-kinazlar küçük GTP-bağlı proteinlerden biri olan Rho'nun efektörüdür. Rho-kinazlar MLC'i defosforile eden MYPT-1'e etki edip MLC'nin fosforile halde kalmasını sağlayarak sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu artırır ve vasküler düz kasın kasılmasına neden olurlar. Rho-kinazların aktivitesi EDCF yanıtlarının arttığı hipertansiyon, kalp yetmezliği ve diabet gibi hastalıklarda artmaktadır. AMPK ise hücrenin enerji sensörü olarak düşünülmektedir. Vasküler düz kasta endotel-bağımlı ve bağımsız gevşemeyi sağlayarak vasküloprotektif etki göstermektedir. AMPK'nın aktivitesi Rho-kinaz yolağının aktivitesinin tersine EDCF fonksiyonunun arttığı hipertansiyon ve diabet gibi hastalıklarda azalmaktadır.

Bu çalışmada 30 haftalık kontrol ve kısa dönem (4 hafta) STZ-diabetik Sprague-Dawley erkek sıçanların torasik aort preparatları kullanılmıştır. Kısa dönem STZ-diabette EDCF yanıtlarının arttığı gözlenmiştir. Kısa dönem diabetik koşullarda Rho-kinaz duyarlılığının, ROCK2 protein düzeyinin ve AICAR-aracılı gevşeme yanıtlarının arttığı saptanmıştır. Sonuçlarımız, diabetik aortta artmış EDCF-aracılı kasılma yanıtlarına karşın AMPK-aracılı gevşemelerin arttığını göstermektedir. Ek olarak, AMPK sinyal yolağının relaksasyonun korunması ve iyileştirilmesi açısından oldukça yararlı bir terapötik yaklaşım olabileceği görülmektedir.

Anahtar Sözcükler: AMPK, Diabet, EDCF, Endotel, Rho-kinaz

SUMMARY

Contribution of Rho-kinase and AMPK Signaling Pathways to Endothelium Derived Contracting Factors (EDCF) Responses Observed in *In vitro* Hyperglycemic Stage

Most of the mortalities and morbidities caused by diabetes may be the results of microvascular (retinopathy, neuropathy, nephropathy) and macrovascular (cardiovascular, cerebrovascular) complications. Hyperglycemia badly affects vascular tonus by impairing the functions of endothelium. Vascular tonus is controlled by EDRF, EDHF and EDCF under normal physiological circumstances.

In pathological conditions, impairment of endothelium-derived relaxation can be caused by both decrease in EDRF release and increase in EDCF release. The increase in EDCF is observed with diseases such as hypertension and diabetes. In our study, the possible changes that occur in EDCF responses in *in vitro* hyperglycemic conditions are investigated. Contrary to expectations, EDCF responses found to be diminished due to extension of hyperglycemic incubation time. For this reason, EDCF responses were evaluated in short term STZ-diabetes models. The contribution of two pathways, Rho-kinase and AMPK, which have opposite effects, to the increased EDCF responses in diabetic rat aorta was investigated. Rho-kinases are the effectors of Rho which is one of the small GTP-binding proteins. They increase cytosolic Ca^{+2} concentration and cause vascular smooth muscle to contract, keeping MLC phosphorylated by affecting MYPT-1 which dephosphorylates the MLC. The activities of Rho-kinases increase in diseases such as hypertension, heart failure and diabetes in which EDCF function increases. AMPK is the energy sensor of the cell. It provides a vasculoprotective effect by causing endothelium-dependent and endothelium-independent relaxation in smooth muscle. In contrast to Rho-kinase pathway activity, AMPK pathway activity decreases with the disease such as hypertension and diabetes in which the EDCF function increases.

In the current study, the thoracic aorta preparations of 30-week-old male Sprague-Dawley rats which were grouped as controls and short-term (4-weeks) STZ-induced diabetes. In short-term diabetes, the EDCF-mediated responses were shown to be increased. Also, the increased sensitivity of Rho-kinase pathway, protein level of ROCK2 and improved AICAR-mediated vasorelaxation responses in short-term diabetes were observed. These findings demonstrate AMPK-mediated relaxation is enhanced in diabetic aorta despite the increased EDCF-mediated contraction. Our results, thus, suggest that the activation of AMPK may be a potential therapeutic strategy to improve hyperglycemia-induced endothelial dysfunction.

Key words: AMPK, Diabetes, EDCF, Endothelium, Rho-kinase.

KAYNAKLAR

- ARITA R, HATA Y, NAKAO S, KITA T, MIURA M; KAWAHARA S, ZANDI S, ALMULKI L, TAYYARI F, SHIMOKAWA H, ve ark., (2009). Rho kinase inhibition by fasudil ameliorates diabetes-induced microvascular damage. *Diabetes*, **58**: 215-226.
- AUCH-SCHWELK W, KATUSIC ZS, VANHOUTTE PM, (1990). Thromboxane A₂ receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension*, **15**: 699–703.
- AUCH-SCHWELK W, KATUSIC ZS, VANHOUTTE PM, (1992). Nitric oxide inactivates endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension*, **19**: 442–445.
- BAGI Z, FEHER A, CASUTTO J, AKULA K, LABINSKYY N, KALEY G, KOLLER A, (2010). Increased availability of angiotensin AT1 receptors leads to sustained arterial constriction to angiotensin II in diabetes role for Rho-kinase activation. *British Journal of Pharmacology*, **163**: 1059–1068.
- BIVALACQUA TJ, CHAMPION HC, USTA MF, CELLEK S, CHITALEY K, WEBB RC, LEWIS RL, MILLS TM, HELLSTROM WJ, KADOWITZ PJ, (2004). RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction, *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**: 9121-9126.
- BROWNLEE M, (2005). The Pathobiology of Diabetic Complications: a Unifying Mechanism, *Diabetes*, **54**: 1615-1625.
- CAI Y, MANIO MM, LEUNG GPH, XU A, TANG EHC, VANHOUTTE PM, (2015). Thyroid hormone affects both endothelial and vascular smooth muscle cells in rat arteries, *European Journal of Pharmacology*, **747**: 18-28.
- CAO X, LUO T, LUO X, TANG Z, (2014). Resveratrol prevents AngII-induced hypertension via AMPK activation and RhoA/ROCK suppression in mice, *Hypertension Research*, **37**: 803-810.
- CHANG MY, HO FM, WANG JS, KANG HC, CHANG Y, YE ZX, (2010). AICAR induces cyclooxygenase-2 expression through AMP-activated protein kinase-transforming growth factor-beta-activated kinase 1-p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway, *Biochem Pharmacol*, **80(8)**: 1210-1220.
- CHEN H, MONTAGNANI M, FUNAHASHI T, SHIMOMURA I, QUON MJ, 2003. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells, *J Biol Chem*, **278**: 45021-45026.
- CHEN Z, PENG IC, CUI X, LI YS, CHIEN S, SHYY JYJ, (2010). Shear stress, SIRT1, and vascular

- homeostasis, *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**: 1026-0273.
- CHEN XQ, TAN I, NG CH, HALL C, LIM L, LEUNG T, (2002). Characterization of RhoA-binding kinase ROKalpha implication of the pleckstrin homology domain in ROKalpha function using region-specific antibodies, *J Biol Chem*, **277**: 12680-12688.
- CHEN Z, PENG IC, SUN W, SU MI, HSU PH, FU Y, ZHU Y, DEFEA K, PAN S, TSAI MD, SHYY JY, (2009). AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633, *Circ Res*, **104**: 496-505.
- CHEN ZP, MITCHELHILL KI, MICHELL BJ, STAPLETON D, RODRIGUEZ-CRESPO I, WITTERS LA, POWER DA, ORTIZ DE MONTELLANO PR, KEMP BE, (1999). AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase, *FEBS Lett*, **443**: 285-289.
- CHEVRIER V, PIEL M, COLLOMB N, SAOUDI Y, FRANK R, PAINTRAND M, NARUMIYA S, BORNENS M, JOB D, (2002). The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning, *J Cell Biol*, **157**: 807-817.
- CICEK FA, KANDILCI HB, TURAN B, 2013. Role of ROCK upregulation in endothelial and smooth muscle vascular functions in diabetic rat aorta, *Cardiovascular Diabetology*, **12**: 51.
- CREAGER MA, LUSCHER TF, COSENTINO F, BECKMAN JA, (2003). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I, *Circulation*, **108**: 1527-1532.
- CSANYI G, LEPRAN I, FLESCH T, TELEGDY G, SZABO G, MEZEI Z, (2007). Lack of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) up-regulation in endothelial dysfunction in aorta in diabetic rats, *Pharmacological Reports*, **59**: 447-455.
- DAVIS BJ, XIE Z, VIOLLET B, ZOU MH, (2006). Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase, *Diabetes*, **55**: 496-505.
- DE VRIESE AS, VERBEUREN TJ, VAN DE VOORDE J, LAMEIRE NH, VANHOUTTE PM, (2000). Endothelial dysfunction in diabetes, *British Journal of Pharmacology*, **130**: 963-974.
- DENNISS SG, JEFFERY AJ, RUSH JWE, (2010). RhoA-Rho kinase signaling mediates endothelium and endoperoxide dependent contractile activities characteristic of hypertensive vascular dysfunction, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **298**: H1391-H1405.
- ETO M, BARANDIER C, RATHGEB L, KOZAI T, JOCH H, YANG Z, LUSCHER TF, (2001). Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase, *Circ Res.*, **89**: 583-590.
- EWART M, KENNEDY S, (2004). AMPK and vasculoprotection, *Pharmacology & Therapeutics*, **131**: 242-253.
- FENG J, ITO M, KUREISHI Y, ICHIKAWA K, AMANO M, ISAKA N, OKAWA K, IWAMATSU A, KAIBUCHI K, HARTSHORNE DJ, et al. (1999). Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle, *J Biol Chem*, **274**: 3744-3752.

- FELETOU M, VANHOUTTE PM, (2004). EDHF: new therapeutic targets?, *Pharmacol Res*, **49**: 565–580.
- FELETOU M, VANHOUTTE PM, (2006). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture), *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **291**: H985–H1002.
- FELETOU M, VERBEUREN TJ, VANHOUTTE PM, (2009). Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors, *Br J Pharmacol*, **156(4)**: 563-574.
- FORD RJ, RUSH JW, (2011). Endothelium-dependent vasorelaxation to the AMPK activator AICAR is enhanced in aorta from hypertensive rats and is NO and EDCF dependent, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **300**: H64-H65.
- FORD RJ, TESCHKE SR, REID EB, DURHAM KK, KROETSCH JT, RUSH JWE, (2012). AMP-activated protein kinase activator AICAR acutely lowers blood pressure and relaxes isolated resistance arteries of hypertensive rats, *J. Hypertens*, **30**: 725-733.
- FUNK CD, (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science*, **294**: 1871-1875.
- FURCHGOTT RF, VANHOUTTE PM, (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors, *Faseb J*, **3**: 2007-2017.
- FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV, (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, **288(5789)**: 373-6.
- GIACCO F, BROWNLEE M, (2010). Oxidative Stress and Diabetic Complications, *Circulation Research*, **107**: 1058-1070.
- GOEL A, ZHANG Y, ANDERSON L, RAHIMIAN R, (2007). Gender difference in rat aorta vasodilation after acute exposure to high glucose: Involvement of protein kinase C β and superoxide but not of Rho kinase, *Cardiovascular Research*, **76**: 351-360.
- GOIRAND F, SOLAR M, ATHEA Y, VIOLLET B, MATEO P, FORTIN D, LECLERC J, HOERTER J, VENTURA-CLAPIER R, GARNIER A, (2007). Activation of AMP kinase α 1 subunit induces aortic vasorelaxation in mice, *J. Physiol*, **581**: 1163-1171.
- HA J, DANIEL S, BROYLES SS, KIM KH, (1994). Critical phosphorylation sites for acetyl-coa carboxylase activity, *The Journal of Biological Chemistry*, **269**: 22162-22168.
- HAHMANN C, SCHROETER T, (2010). Rho-kinase inhibitors as therapeutics: from pan inhibition to isoform selectivity, *Cell. Mol. Life Sci.*, **67**: 171-177.
- HARDIE DG, ALESSI DR, (2013). LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after, *BMC Biol*, **2013 Apr 15**: 11-36.
- HARRIS MB, JU H, VENEMA VJ, LIANG H, ZOU R, MICHELL BJ, CHEN ZP, KEMP BE, VENEMA RC, (2001). Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation, *J Biol Chem*, **276**: 16587-16591.
- HIGASHI M, SHIMOKAWA H, HATTORI T, HIROKI J, MUKAI Y, MORIKAWA K, ICHIKI T, TAKAHASHI S, TAKESHITA A, (2003). Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system, *Circ Res*, **93**: 767-775.

- HORMAN S, MORLE N, VERTOMMEN D, HUSSAIN N, NEUMANN D, BEAULOYE C, (2008). AMP-activated protein kinase phosphorylates and desensitizes smooth muscle myosin light chain kinase, *J. Biol. Chem*, **283**(27): 18505-18512.
- HOROWITZ S, BINION DG, NELSON VM, KANAA Y, JAVADI P, LAZAROVA Z, ANDREKOPOULOS C, KALYANARAMAN B, OTTERSON MF, RAFIEE P, (2007). Increased arginase activity and endothelial dysfunction in human inflammatory bowel disease, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **292**: G1323-G1336.
- HUANG JS, RAMAMURTHY SK, LIN X, LE BRETON GC, (2004). Cell signalling through thromboxane A₂ receptors, *Cell Signal*, **16**: 521-533.
- IWAMA Y, KATO T, MURAMATSU M, ASANO H, SHIMIZU K, TOKI Y, MIYAZAKI Y, OKUMURA K, HASHIMOTO H, ITO T, (1992). Correlation with blood pressure of the acetylcholine-induced endothelium-derived contracting factor in the rat aorta, *Hypertension*, **19**: 326-332.
- JEON SM, (2016). Regulation an function of AMPK in physiology and diseases, *Experimental & Molecular Medicine*, **48**: e245.
- KANG KT, (2014). Endothelium-derived relaxing factors of small resistance arteries in hypertension, *Toxicological Research*, **30**: 141-148.
- KATO T, IWAMA Y, OKUMURA K, HASHIMOTO H, ITO T, SATAKE T, (1990). Prostaglandin H₂ may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat, *Hypertension*, **15**: 475-481.
- KATUSIC ZS, SHEPHERD JT, VANHOUTTE PM, (1988). Endothelium-dependent contractions to calcium ionophore A23187, arachidonic acid and acetylcholine in canine basilar arteries, *Stroke*, **19**: 476-479.
- KAWAGUCHI T, UENO T, NOGATA Y, HAYAKAWA M, KOGA H, TORIMURA T, (2016). Wheat-bran autolytic peptides containing a branched-chain amino acid attenuate non-alcoholic steatohepatitis via the suppression of oxidative stress and the upregulation of AMPK/ACC in high-fat diet-fed mice, *International Journal of Molecular Medicine*, **39**: 407-414.
- KOGA T, TAKATA Y, KOBAYASHI K, TAKISHITA S, YAMASHITA Y, FUJISHIMA M, (1989). Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat, *Hypertension*, **14**: 542-54.
- LAUFS U, LIAO JK, (1998). Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase, *J Biol Chem*, **273**(37): 24266-71.
- LEE WJ, LEE IK, KIM HS, KIM YM, KOH EH, WON JC, HAN SM, KIM MS, JO I, OH GT, PARK IS, YOUN JH, PARK SW, LEE KU, PARK JY, (2005). Alpha-lipoic acid prevents endothelial dysfunction in obese rats via activation of AMP-activated protein kinase, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**: 2488-2494.
- LEUNG T, MANSER E, TAN L, LIM L, (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes, *J Biol Chem*, **270**: 29051-29054.

- LI T, YANG G, ZHU Y, WU Y, CHEN X, LAN D, TIAN K, LIU L, (2014). Diabetes and hyperlipidemia induce dysfunction of VSMCs: contribution of the metabolic inflammation/miRNA pathway, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **308**: E257-E269.
- LIU MH, JIN HK, FLOTEN HS, YANG Q, YIM AP, FURNARY A, ve ark., (2001). Vascular endothelial growth factor-mediated endothelium-dependent relaxation is blunted in spontaneously hypertensive rats, *J Pharmacol Exp Ther*, **296**: 473-477.
- LOIRAND G, (2015). Rho Kinases in Health and Disease: From Basic Science to Translational Research, *Pharmacol Rev*, **67**: 1074-1095.
- LOIRAND G, GUÈRIN P, PACAUD P, (2006). Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology, *Circ Res.*, **98**: 322-334.
- LOWERY DM, CLAUSER KR, HJERRILD M, LIM D, ALEXANDER J, KISHI K, ONG SE, GAMMELTOFT S, CARR SA, YAFFE MB, (2007). Proteomic screen defines the Polobox domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate, *EMBO*, **26**: 2262–2273.
- LUSCHER TF, VANHOUTTE PM, (1986). Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat, *Hypertension*, **8**: 344-348.
- MAJITHIYA JB, BALARAMAN R, (2006). Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats, *Life Sci*, **78**: 2615-2624.
- MARTINSEN A, YERNA X, RATH G, GOMEZ EL, DESSY C, MOREL N, (2012). Different Effect of Rho Kinase Inhibition on Calcium signaling in Rat Isolated Large and Small Arteries, *Journal of Vascular Research*, **49**: 522-533.
- MATSUMOTO T, KOBAYASHI T, KAMATA K, (2006). A therapeutic target for microvascular complications in diabetes: endothelium-derived hyperpolarizing factor, *Curr Cardiol Rev*, **2**: 185–191.
- MAYHAN WG, (1992). Role of prostaglandin H₂-thromboxane A₂ in responses of cerebral arterioles during chronic hypertension, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **262**: H539-H543.
- MILLER VM, VANHOUTTE PM, (1985). Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid is mediated by products of cyclooxygenase, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **248**: H432-H437.
- MING XF, BARANDIER C, VISWAMBHARAN H, KWAK BR, MACH F, MAZZOLAI L, HAYOZ D, RUFFIEUX J, RUSCONI S, MONTANI JP, ve ark., (2004). Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction, *Circulation*, **110**: 3708–3714.
- MING XF, VISWAMBHARAN H, BARANDIER C, RUFFIEUX J, KAIBUCHI K, RUSCONI S, YANG Z, (2002). Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells, *Mol Cell Biol*, **22**: 8467-8477.
- MOMBOULI JV, VANHOUTTE PM, (1993). Purinergic endothelium-dependent and -independent contractions in rat aorta, *Hypertension*, **2**: 577-583.

- MORROW VA, FOUFELLE F, CONNELL JM, PETRIE JR, GOULD GW, SALT IP, (2003). Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells, *J Biol Chem*, **278**: 31629-31639.
- NISHIMURA T, TAKEICHI M, (2008). Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling, *Development* **135**: 1493-1502.
- NODA K, NAKAJIMA S, GODO S, SAITO H, IKEDA S, SHIMIZU T, ENKHJARGAL B, FUKUMOTO Y, TSUKITA S, YAMADA T, KATAGIRI H, SHIMOKAWA H, (2014). Rho-Kinase Inhibition Ameliorates Metabolic Disorders through Activation of AMPK Pathway in Mice, *Plos One*, **9(11)**: e110446.
- NOMA K, RIKITAKE Y, OYAMA N, YAN G, ALCAIDE P, LIU PY, WANG H, AHL D, SAWADA N, OKAMOTO R, et al., (2008). ROCK1 mediates leukocyte recruitment and neointima formation following vascular injury, *J Clin Invest*, **118**:1632–1644.
- NUNO DW, LAMPING KG, (2010). The role of rho kinase in sex-dependent vascular dysfunction in type 1 diabetes, *Exp Diabetes Res*, **2010**: 176361.
- OHASHI J, SAWADA A, NAKAJIMA S, NODA K, TAKAKI A, SHIMOKAWA H, (2012). Mechanism for enhanced endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in microvessels in mice, *Circulation Journal*, **76**: 1768-1779.
- OKON EB, GOLBABAIE A, VAN BREEMEN C, (2002). In the presence of L-NAME SERCA blockade induces endothelium-dependent contraction of mouse aorta through activation of smooth muscle prostaglandin H2/thromboxane A2 receptors, *Br J Pharmacol*, **137**: 545-553.
- O'ROURKE ST, VANHOUTTE PM, MILLER VM, (2006). Biology of blood vessels, *Vascular Medicine*, 71–100.
- PIEPER GM, (1998). Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine on endothelial dysfunction, *Hypertension*, **31**: 1047–1060.
- QIAN LB, WANG HP, CHEN Y, CHEN FX, MA YY, BRUCE LC, XIA Q, (2010). Luteolin reduces high glucose-mediated impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aorta by reducing oxidative stress, *Pharmacological Research*, **61**: 281-287.
- QU C, LEUNG SWS, VANHOUTTE PM, MAN RYK, (2010). Chronic Inhibition of Nitric-Oxide Synthase Potentiates Endothelium-Dependent Contractions in the Rat Aorta by Augmenting the Expression of Cyclooxygenase-2, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **334**: 373-380.
- RIKITAKE Y, LIAO JK, (2005). Rho GTPases, statins, and nitric oxide, *Circ Res*, **97**: 1232–1235.
- RUBIN LJ, MAGNOLIOLA L, FENG X, JONES AW, HALE CC, (2005). Metabolic activation of AMP kinase in vascular smooth muscle, *J Appl Physiol*, **98**: 296-306.
- SAPET C, SIMONCINI S, LORIOD B, PUTHIER D, SAMPOL J, NGUYEN C, DIGNAT-GEORGE F, ANFOSSO F, (2006). Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2, *Blood*, **108**:1868–1876.

- SCHNEIDER H, SCHUBERT KM, BLODOW S, KREUTZ CP, ERDOGMUS S, WIEDENMANN M, QIU J, FEY T, RUTH P, LUBOMIROV LT, PFITZER G, SCHNITZLER MM, HARDIE DG, GUDERMANN T, POHL U, (2015). AMPK Dilates Resistance Arteries via Activation of SERCA and BKCa Channels in Smooth Muscle, *Hypertension*, **66**: 108-116.
- SEBBAGH M, HAMELIN J, BERTOGLIO J, SOLARY E, BRÉARD J, (2005). Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspaseindependent manner, *J Exp Med*, **201**:465–471.
- SEBBAGH M, RENVOIZÉ C, HAMELIN J, RICHEL N, BERTOGLIO J, BRÉARD J, (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing, *Nat Cell Bio*, **3**:346–352.
- SHAH DI, SINGH M, (2006a). Effect of fasudil on macrovascular disorder-induced endothelial dysfunction, *J Physiol Pharmacol*, **84**: 835-845.
- SHAH DI, SINGH M, (2006b). Involvement of Rho-kinase in experimental vascular endothelial dysfunction, *Mol Cell Biochem*, **283**: 191-199.
- SHEN B, YE CL, YE KH, LIU JJ, SUN P, JIANG JH, (2003). Mechanism underlying enhanced endothelium-dependent vasodilatation in thoracic aorta of early stage streptozotocin-induced diabetic mice, *Acta Pharmacol Sin*, **24**(5): 422-428.
- SHI Y, SO K-F, MAN RYK, VANHOUTTE PM, (2007). Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions in femoral arteries of rats with streptozotocin-induced diabetes, *British Journal of Pharmacology*, **152**: 1033-1041.
- SHIMIZU T, FUKUMOTO Y, TANAKA S, SATOH K, IKEDA S, SHIMOKAWA H, (2013). Crucial role of ROCK2 in vascular smooth muscle cells for hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **33**:2780–2791.
- SHIMIZU Y, THUMKEO D, KEEL J, ISHIZAKI T, OSHIMA H, OSHIMA M, NODA Y, MATSUMURA F, TAKETO MM, NARUMIYA S, (2005). ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles, *J Cell Biol*, **168**: 941–953.
- SHIMOKAWA H, SUNAMURA S, SATOH K, (2016). RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System, *Circ Res.*, **118**: 352-366.
- SHINMOKAWA H, TAKESHITA A, (2005). Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **25**: 1767-1775.
- SIM HT, HARDIE DG, (1988). The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase, *FEBS Lett*, **233**(2): 294-8.
- SIN WC, CHEN XQ, LEUNG T, LIM L, (1998). RhoA-binding kinase α translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network, *Mol Cell Biol*, **18**: 6325-6339.
- STEINBERG HO, PARADISI G, CRONIN J, CROWDE K, HEMPFLING A, HOOK G, (2000). Type II diabetes abrogates sex differences in endothelial function in premenopausal women,

- Circulation*, **101**: 2040–6.
- STEVEN M, HAFFNER MD, (2006). Risk Constellations in Patients with the Metabolic Syndrome: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Patterns, *The American Journal of Medicine*, **119(5A)**: 3S-5S.
- SURMA M, WEI L, SHI J, (2011). Rho kinase as a therapeutic target in cardiovascular disease, *Future Cardiol.*, **7(5)**: 657–671.
- TANG EH, LEUNG FP, HUANG Y, FÉLÉTOU M, SO KF, MAN RY, VANHOUTTE PM, (2007). Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor, *Br J Pharmacol*, **151**: 15–23.
- TANG EHC, VANHOUTTE PM, (2009). Prostanoids and reactive oxygen species: Team players in endothelium-dependent contractions, *Pharmacology & Therapeutics*, **122**: 140-149.
- TESFAMARIAM B, BROWN ML, DEYKIN D, COHEN RA, (1990). Elevated Glucose Promotes Generation of Endothelium-derived Vasoconstrictor Prostanoids in Rabbit Aorta, *J. Clin. Invest.*, **85**: 929-932.
- THORS B, HALLDORSSON H, THORGEIRSSON G, (2004). Thrombin and histamine stimulate endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation at Ser1177 via an AMPK mediated pathway independent of PI3K-Akt, *FEBS Lett*, **573**: 175-180.
- THUMKEO D, KEEL J, ISHIZAKI T, HIROSE M, NONOMURA K, OSHIMA H, OSHIMA M, TAKETO MM, NARUMIYA S, (2003). Targeted disruption of the mouse rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death, *Mol Cell Biol*, **23**:5043–5055.
- TSOUNAPI P, SAITO M, KITATANI K, DIMITRIADIS F, OHMASA F, SHIMIZU S, KINOSHITA Y, TAKENAKA A, SATOH K, (2012). Fasudil improves the endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats, *Eur J Pharmacol*, **691**: 182-189.
- VANHOUTTE PM, (1998). Vascular biology: old-timer makes a comeback, *Nature*, **396**: 213-216.
- VANHOUTTE PM, FELETOU M, TADDEI S, (2005). Endothelium-dependent contractions in hypertension, *British Journal of Pharmacology*, **144**: 449-458.
- VANHOUTTE PM, TANG EHC, (2008). Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad!, *J Physiol.*, **586(Pt 22)**: 5295-5304.
- VANHOUTTE PM, ZHAO Y, XU A, LEUNG SWS, (2016). Thirty Years of Saying NO Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator, *Circ Res.*, **119**: 375-396.
- WANG S, XU J, SONG P, VIOLLET B, ZOU MH, (2009). In vivo activation of AMP-activated protein kinase attenuates diabetes-enhanced degradation of GTP cyclohydrolase I, *Diabetes*, **58**: 1893–1901.
- WEN W, LIU W, YAN J, ZHANG M, (2008). Structure basis and unconventional lipid membrane binding properties of the PH-C1 tandem of rho kinases, *J Biol Chem*, **283**:26263–26273.
- WILD S, ROGLIC G, GREEN A, et al., (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for year 2000 and projections for 2030, *Diabetes Care*, **27**: 1047-1053.

- WOLFRUM S, DENDORFER A, RIKITAKE Y, STALKER TJ, GONG Y, SCALIA R, DOMINIAK P, LIAO JK, (2004). Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**:1842-1847.
- YANG D, FÉLÉTOU M, BOULANGER CM, WU HF, LEVENS N, ZHANG JN, VANHOUTTE PM, (2002). Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats, *Br J Pharmacol*, **136**: 104-110.
- YANG D, FÉLÉTOU M, LEVENS N, ZHANG JN, VANHOUTTE PM, (2003). A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR, *Hypertension*, **41**: 143-148.
- YANG D, GLUAÏS P, ZHANG JN, VANHOUTTE PM, FÉLÉTOU M, (2004). Endothelium-dependent contractions to acetylcholine, ATP and the calcium ionophore A23187 in aortas from spontaneously hypertensive and normotensive rats, *Fundam Clin Pharmacol*, **18**: 321-326.
- YAO L, CHANDRA S, TOQUE HA, BHATTA A, ROJAS M, CALDWELL RB, CALDWELL RW, (2013). Prevention of diabetes-induced arginase activation and vascular dysfunction by Rho kinase (ROCK) knockout, *Cardiovasc Res*, **97**: 509–519.
- YONEDA A, MULTHAUPT HA, COUCHMAN JR, (2005). The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity, *J Cell Bio*, **170**:443–453.
- ZHOU H, LI YJ, (2012). Rho kinase inhibitors: potential treatments for diabetes and diabetic complications, *Curr Pharm Des*, **18(20)**: 2964-73.
- ZHOU Q, LIAO JK, (2009). Rho Kinase: An Important Mediator of Atherosclerosis and Vascular Disease, *Curr Pharm Des*, **15(27)**: 3108-3115.
- ZHOU Y, VARADHARAJ S, ZHAO X, PARINANDI N, FLAVAHAN NA, ZWEIER JL, (2005). Acetylcholine causes endothelium-dependent contraction of mouse arteries, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **289**: H1027-H1032.

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Cennet

Soyadı: Balcılar

Doğum Yeri ve Tarihi: Erzurum, 13/07/1988

İletişim Adresi: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastane Eczanesi
Altındağ/ANKARA

Telefon: 05052314107

Eğitimi: 2005-2010 Lisans, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Yabancı Dil: İngilizce

Yer Aldığı Projeler:

Proje No: TÜBİTAK 115S995

Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Melih ALTAN

Araştırmacılar: Yrd. Doç. Dr. Işıl ÖZAKCA, Cennet BALCILAR

“*In vitro* Hiperglisemik Ortamda Gözlenen Endotel Kaynaklı Kastırıcı Faktör (EDCF) Yanıtlarına Rho-Kinaz ve AMPK Sinyal Yolaklarının Katkısı” (Ekim 2015- Ekim 2016, 30.000 TL)