



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Biyokimya ve Klinik Biyokimya
Anabilim Dalı

**RAT AORTASI VASKÜLER DÜZ KAS
HÜCRELERİNDEN YAPILAN PRİMER HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE ANG II'NİN NAD(P)H OKSİDAZ
ENZİM KOMPLEKSİ ÜZERİNDEN SÜPEROKSİT
ANYONU ÜRETİMİNE ETKİSİ**

Dr. Ferhat AKÇİT

Uzmanlık Tezi

Antalya, 2005

T1864



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Biyokimya ve Klinik Biyokimya
Anabilim Dalı

**RAT AORTASI VASKÜLER DÜZ KAS
HÜCRELERİNDEN YAPILAN PRİMER HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE ANG II'NİN NAD(P)H OKSİDAZ
ENZİM KOMPLEKSİ ÜZERİNDEN SÜPEROKSİT
ANYONU ÜRETİMİNE ETKİSİ**

Dr. Ferhat AKÇİT

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
(Proje No. 2003.04.0103.011)

Tezinden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir.

Antalya, 2005

**Akdeniz Üniversitesi
Rektörlüğü Kütüphanesi**

TEŐEKKÜR

Yaşamımın her aşamasında desteğini esirgemeyen aileme ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık eğitimim süresince yardımını ve hoşgörüsünü esirgemeyen tüm akademik, idari ve teknik personele teőekkürlerimi sunarım.

Dr. Osman Fethat AKÇIT
Antalya, 2005

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Vasküleri Duvar ve Vasküleri Düz Kas Hücreleri	4
2.2. Anjiyotensin II (Ang II)	5
2.2.1. Anjiyotensin II'nin Vasküleri Etkileri	5
2.2.2. Anjiyotensin II'nin Sentezi ve Moleküler Yapısı	6
2.2.3. Anjiyotensin II Reseptör Tipleri ve Görevleri	9
2.3. Reaktif Oksijen Radikalleri (Reactive Oxygen Radicals, ROS)	10
2.3.1. ROS ve Metabolizması	10
2.3.2. VDKH ve ROS	13
2.4. NADPH Oksidaz Sistemi (NOX)	18
3. MATERYAL ve METOD	22
3.1. Tez Materyali ve Kimyasal Malzemeler	22
3.2. Aletler, Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler	23
3.3. Rat Aortası Düz Kas Hücrelerinin İzole edilmesi	24
3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar	24
3.3.2. Rat Aortası Vasküleri Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu	25
3.4. Aorta Düz Kas Hücreleri Primer Kültürü	26
3.4.1. Gerekli Solüsyonlar	26
3.4.2. Primer Hücre Kültürü Besiyerinin (Medyum) Hazırlanması	27
3.4.3. Primer Vasküleri Düz Kas Hücre Kültürü	27
3.5. Vasküleri Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu	29
3.5.1. Hücrelerden İmmünohistokimya Preparatlarının Hazırlanması	29
3.5.2. Kullanılan Solüsyonlar	30

3.5.3 İmmünohistokimyasal Analiz	31
3.6. Ölçüm Deneylerinde Kullanılan Kimyasallar ve İnhibitörler	32
3.6.1 Kullanılan İnhibitörler	32
3.6.2 Enzim Substratının Hazırlanışı	33
3.6.3 Ölçüm Deneylerinde Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı	33
3.6.4 Süperoksit Anyonu Ölçüm Metodları	34
3.7 Protein Miktarının Tayin Edilmesi	36
3.7.1 Bradford Protein Ölçüm Yönteminin Prensipleri	36
3.7.2 Hücre Lizatının Hazırlanması	36
3.7.3 Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafiğinin Hazırlanması	37
3.7.4 Numunelerin Protein Miktarlarının Tayini	38
3.8 İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu	39
4.2. Ang II ile Uyarılan VDKH'de Süre Deneyleri	40
4.2.1 Süre Deneyleri için Ang II ile Uyarılan VDKH'de, Süperoksit Anyonu Miktarlarının Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi ile İrdelenmesi	41
4.2.2 Süre Deneyleri için Ang II ile Uyarılan VDKH'de Süperoksit Anyonu Miktarlarının Resazurin ile Florometrik Olarak Ölçülmesi	43
4.3. Ang II Konsantrasyon Deneyleri	46
4.3.1. Konsantrasyon Deneyleri için Ang II ile Uyarılan VDKH'de Süperoksit Anyonu Miktarlarının Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi ile Ölçülmesi	46
4.3.2. Konsantrasyon Deneyleri için Ang II ile Uyarılan VDKH'de Süperoksit Anyonu Miktarlarının Resazurin ile Florometrik Olarak Ölçülmesi	48
4.4. Ang II AT ₁ Reseptör Antagonisti Losartan (Los) ve NAD(P)H Oksidaz Enzim Kompleksi İnhibitörü DPI	50

ile Yapılan İnhibisyon Deneyleri	
4.4.1 Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Los ve DPI'nın Etkisinin Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi ile İrdelenmesi	51
4.4.2 Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Los ve DPI Etkisinin Resazurin ile Florometrik Olarak İrdelenmesi	52
4.5 Ang II İnkübasyonu Sonrasında VDKH'de Süperoksit Anyonu Kaynağı Olan Farklı Sistem ve Enzim İnhibitörleri ile İlgili Deneyler	54
4.5.1 Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Rotenon, İndometazin, Oksipurinol ve L-NAME'in Etkilerinin Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi ile İrdelenmesi	54
4.5.2 Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Rotenon, İndometazin, Oksipurinol ve L-NAME ile Birlikte Los'un Etkilerinin Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi ile İrdelenmesi	56
4.5.3 Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Rotenon, İndometazin, Oksipurinol ve L-NAME ile Birlikte DPI'nın Etkilerinin Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi ile İrdelenmesi	58
4.5.4 Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Rotenon, İndometazin, Oksipurinol ve L-NAME'in Etkilerinin Resazurin Yöntemi ile İrdelenmesi	60
4.5.5 Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Rotenon, İndometazin, Oksipurinol ve L-NAME ile Birlikte Los'un Etkilerinin Resazurin Yöntemiyle İrdelenmesi	62
4.5.6 Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Rotenon, İndometazin, Oksipurinol ve L-NAME ile Birlikte DPI'nın Etkilerinin Resazurin Yöntemi ile İrdelenmesi	64

5. TARTIŞMA	67
SONUÇLAR	76
ÖZET	78
KAYNAKLAR	79

KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AEC	Amino Etil Karbizol
Ang I	Anjiyotensin I
Ang II	Anjiyotensin II
Ang III	Anjiyotensin III
Ang IV	Anjiyotensin IV
AT ₁	Anjiyotensin Reseptörü Tip 1
AT ₂	Anjiyotensin Reseptörü Tip 2
BSA	Sığır Serum Albumini
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribonükleotid
DPI	Difenileniyodonyum
EAS	Enzim Ayrışma Solüsyonu
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ESM	Ekstra Selüler Matriks
FBS	Fetal Bovin Serum
HBSS	Hank's Dengeli Tuz Solüsyonu
İNDO	İndometazin
Los	Losartan
MMP	Matriks Metalloproteinaz
NADPH	Redükte Nikotinamid Dinükleotid Fosfat
NEP	Nötral Endopeptidaz
NOS	Nitrik Oksit Sentaz Enzimi
NOX	NAD(P)H Oksidaz Multi-Enzim Kompleksi
OXP	Oksipürinol
RAS	Renin-Anjiyotensin Sistemi
ROS	Reaktif Oksijen Ürünleri
ROI	Rotenon
SD	Standart Sapma

STI	Soya Tripsin İnhibitörü
IBS	Tris Tamponlu Tuz Solüsyonu
VDKH	Vasküler Düz Kas Hücreleri
WR	Working Reagent (Çalışma Reaktifi)
XO	Ksantin Oksidaz Enzimi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.2.1. Ang II sentezi, reseptörleri ve etkileri	8
2.3.1. Süperoksit anyonu kaynakları	15
2.3.2. NOX ve ROS	16
3.6.1. Sitokrom c'ye ait özgün absorban spektrumu	35
3.7.1. Protein standart grafiği	37
4.1.1. Vasküler düz kas hücre kültürlerinin immünohistokimyasal karakterizasyonu	40
4.2.1. Ang II ile inkübe edilen ve kontrol olarak kullanılan hücrelerde, sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile süre deneyleri	42
4.2.2. Ang II ile inkübe edilen hücrelerde, resazurin yöntemiyle yapılan süre deneyleri	44
4.3.1. VDKH'de farklı Ang II konsantrasyonlarında sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile saptanan süperoksit anyonu miktarları	47
4.3.2. Farklı konsantrasyonlarda Ang II inkübasyonunun süperoksit anyonu üretimine etkisinin resazurin ile florometrik olarak irdelenmesi	49
4.4.1. VDKH'de Ang II varlığında Los ve DPI'nın süperoksit anyonu miktarlarına etkisinin sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile irdelenmesi	51
4.4.2. Ang II inkübasyonuna bırakılan VDKH'deki süperoksit anyonu miktarlarına Los ve DPI'nın etkisinin resazurin yöntemi ile irdelenmesi	53
4.5.1. Ang II ile inkübe edilen VDKH'de farklı sistem ve enzim inhibitörlerinin süperoksit anyonu miktarlarına etkisinin sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile irdelenmesi	55
4.5.2. Ang II ile inkübe edilen VDKH'deki süperoksit anyonu miktarlarına rotenon, indometazin, oksipurinol ve L-NAME	57

ile birlikte Los'un etkilerinin sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile irdelenmesi	
4.5.3. Ang II ile inkübe edilen VDKH'deki süperoksit anyonu miktarlarına rotenon, indometazin, oksipurinol ve L-NAME ile birlikte DPI'nın etkilerinin sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile irdelenmesi	59
4.5.4. Ang II ile inkübe edilen VDKH'de farklı sistem ve enzim inhibitörlerinin etkilerinin resazurin yöntemi ile irdelenmesi	61
4.5.5. Ang II ile inkübe edilen VDKH'deki süperoksit anyonu miktarlarına rotenon, indometazin, oksipurinol ve L-NAME ile birlikte Losartanın etkilerinin resazurin yöntemi ile irdelenmesi	63
4.5.6. Ang II ile inkübe edilen VDKH'de resazurin yöntemi ile ölçülen süperoksit anyonu miktarlarına rotenon, indometazin, oksipurinol ve L-NAME ile birlikte DPI'nın etkileri	65

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
4.2.1. VDKH kontrol grubunda, sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile yapılan süre deneylerine ait veriler	41
4.2.2. Ang II uyarımının ardından sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile yapılan süre deneylerine ait veriler	41
4.2.3. Kontrol hücrelerinde sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile yapılan süre deneylerine ait istatistiksel veriler	42
4.2.4. Süre deneylerinde, Ang II uygulanmış hücrelerde sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile elde edilen değerlere ait istatistiksel veriler	43
4.2.5. Resazurin yöntemi ile yapılan süre deneylerinde kontrol grubuna ait veriler	44
4.2.6. Süre deneyleri için Ang II ile uyarılan VDKH'de, resazurin yöntemiyle elde edilen veriler	44
4.2.7. Resazurin ile yapılan süre deneylerinde kontrol hücrelerinden elde edilen sonuçlara ait istatistiksel veriler	45
4.2.8. Süre deneylerinde Ang II ile inkübe edilen hücrelerde yapılan süre deneylerine ait istatistiksel veriler	46
4.3.1. Farklı konsantrasyonlarda Ang II uygulanmış hücrelerde, sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile elde edilen değerler	46
4.3.2. Ang II konsantrasyon deneylerinde sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile yapılan ölçümlere ait istatistiksel veriler	48
4.3.3. Farklı konsantrasyonlarda Ang II uygulanmış hücrelerde, resazurin yöntemiyle saptanan süperoksit anyonu miktarları	48
4.3.4. Farklı konsantrasyonlarda Ang II uygulanmış hücrelerden elde edilen süperoksit anyonu miktarlarına ait istatistiksel veriler	50
4.4.1. Ang II varlığında Los ve DPI'nın etkisinin sitokrom c	51

redüksiyonu yöntemi ile irdelenmesinin ardından elde edilen süperoksit anyonu miktarlarına ait veriler	
4.4.2. Ang II ile inkübe edilen VDKH'de, Los ve DPI ile inhibisyonla elde edilen değerlere ait istatistiksel veriler	52
4.4.3. Ang II uyarımı sonrası Los ve DPI'nın etkisinin resazurin yöntemi ile irdelenmesine ait veriler	52
4.4.4. Ang II ile inkübe edilen VDKH'de, Los ve DPI ile inhibisyonlarla elde edilen verilerin istatistiksel analizi	53
4.5.1. VDKH'de Ang II inkübasyonu sonrası, farklı sistem ve enzim inhibitörlerinin süperoksit anyonu seviyelerine etkisinin sitokrom c redüksiyon yöntemi ile irdelenmesine ait veriler	54
4.5.2. Şekil 4.5.1 'deki değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili p değerlerine ait istatistiksel veriler	56
4.5.3. Ang II ile inkübe edilen VDKH'deki süperoksit anyonu miktarlarına farklı enzim ve sistem inhibitörleri ile birlikte Los'un etkilerinin sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile irdelenmesine ait veriler	56
4.5.4. Şekil 4.5.2.'deki değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığı ile ilgili veriler	57
4.5.5. VDKH'de Ang II ile inkübasyon sonrası süperoksit anyonu miktarlarına rotenon, indometazin, oksipurinol ve L-NAME ile birlikte DPI'nın etkilerine ait değerler	58
4.5.6. Şekil 4.5.3 'deki değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili teste ait veriler	60
4.5.7. Ang II inkübasyonu sonrası, farklı sistem ve enzim inhibitörlerinin süperoksit anyonu seviyelerine etkisinin resazurin yöntemi ile irdelenmesine ait veriler	60
4.5.8. Şekil 4.5.4 'deki değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili veriler	61
4.5.9. Ang II stimülasyonu sonrası süperoksit anyonu miktarlarına rotenon, indometazin, oksipurinol ve L-NAME ile birlikte Los'un etkilerine ait veriler	62

- 4.5.10. Şekil 4.5.5.'deki değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili veriler 63
- 4.5.11. VDKH'de süperoksit anyonu miktarlarına rotenon, indometazin, oksipurinol ve L-NAME ile birlikte DPI'nın etkilerinin resazurin yöntemi ile irdelenmesiyle elde edilen değerler 64
- 4.5.12. Şekil 4.5.6.'daki değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili veriler 65

GİRİŞ VE AMAÇ

Hipertansiyon, ateroskleroz ve mekanik hasar gibi bir takım patofizyolojik süreçler, damar duvarında ortak etkiler paylaşırlar. Bu etkiler, vasküler düz kas hücre proliferasyonu, monosit/makrofaj infiltrasyonu, rejenerasyon endotelin disfonksiyonu ve konnektif dokunun dekompozisyonu gibi ortak patolojik süreçlerdir. Bu etkilerde ortak nokta artmış oksidatif strestir. Bu süreçlerin işleminde hücre içindeki sinyallerin iletimini sağlayan hücre içi sinyal iletim yolu önem kazanır. Bu yol birbirine bağlanmış moleküler zincirleri ve bu zincirler arasındaki olayları kapsar. Sinyal iletim yollarının belirlenmesi, vasküler düz kas hücrelerindeki fizyopatolojik düzenlenme mekanizmalarının anlaşılmasını sağlar (1,2).

Ang II vasküler düz kas hücreleri üzerinde pleotropik etkileri olan multifonksiyonel bir hormondur. Vasküler duvar; aktif, değişken ve entegre bir organdır. Selüleri (endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, ve fibroblastlar) ve nonselüler komponentlerden oluşmaktadır (2). Ang II farklı reseptörlere sahiptir ve özellikle AT_1 reseptörü üzerinden vasküler düz kas hücre kontraksiyonu, intimal hiperplazi, anjiogenezis, hemodinamik etkiler ve hipertrofi/hiperplazi yarattığı bilinmektedir (2,3,4). Ayrıca AT_1 reseptör aktivasyonu ile kan basıncını, sodyum ve su dengesini, nöronal fonksiyonları ve nörohumoral sistemi düzenler ve reaktif oksijen örneklerinin (reactive oxygen species, ROS) üretimi, hücrel hipertrofi, hücrel hiperplazi ve apoptozise de neden olur (5).

Redoks (redüksiyon-oksidasyon) reaksiyonları, oksijenin metabolizması sonucu hücrelerde; süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve nitrik oksit gibi reaktif oksijen ürünleri oluştururlar (6,7,8). Bu ürünler fizyopatolojik koşullarda sinyal transdüksiyonunun hücre içi ve hücreler arası mediyatörleri olarak davranırlar (7,8). ROS bir takım selüler sinyal mekanizmalarında rol alır ve böylece transkripsiyonel/translasyonel regülasyonu,

hücre büyümesini, farklılaşmayı ve apoptozu uyarır. ROS, vasküler yapılarda birincil olarak NAD(P)H oksidaz olarak adlandırılan multienzim kompleksi tarafından, vasküler yapılara ait olan endotelial, adventisyal kısımlar ve vasküler düz kas hücrelerinde üretilirler (9,10,11).

NAD(P)H oksidaz enzim sistemi ilk olarak fagositlerde tanımlanmıştır. Enzim, respiratuvar yanma sırasında oluşan süperoksit anyonu rejenerasyonundan sorumlu bir komplekstir (7). Ek olarak, NAD(P)H oksidaz enzim sistemi bir çok non-fagositik [fibroblastlar, endotelial ve vasküler düz kas hücreleri (VDKH), glomerüler mezengiyal hücreler, podositler ve böbrek proksimal tübül hücreleri] hücrede de bulunmaktadır (7,12). Non-mitokondriyal membrana bağımlı NAD(P)H oksidazın non-fagositer hücrelerde süperoksit anyonu için major kaynak olduğu bilinmektedir. Bu enzim elektronları NADPH'tan moleküler oksijene aktarır ve süperoksit anyonunu oluşturur (8,13-16).

Endotelinden sonra vücutta bilinen en potent vazokonstriktör madde olan Ang II (17) tarafından indüklenen ROS, respiratuvar patlama ile oluşan ROS'a göre farklı kinetik özellikler ve düşük konsantrasyonlar sergiler. Respiratuvar patlamanın aksine daha yavaş bir hızda ve uzun süren süperoksit anyonu üretimi gerçekleşir ve oluşan süperoksit anyonları bazı hücrel büyüme ilişkili sinyallerin transdüksiyonuna katılırlar (7).

Çalışmamızın amacı, rat aortasından elde edilecek olan VDKH'den (18) yapılacak primer hücre kültürüne Ang II uyarımı sonrasında, NADPH oksidaz üzerinden süperoksit anyonunun ne miktarlarda oluştuğunu tespit etmek ve süperoksit anyonu oluşturan diğer enzim ve sistemlerin süperoksit anyonu miktarlarına ne kadar etki ettiğini incelemektir.

Çalışmamızda ferisitikrom c'nin redüksiyonu yöntemi kullanılarak süperoksit anyonu miktarları ölçüldü (19). Ayrıca rezasurin yöntemi de kullanılarak elde edilen sonuçlarla iki yöntem kıyaslandı (20,21).

Primer hücre kültürü pasajlarında, süperoksit anyonu kaynağı olabilecek farklı sistem ve enzimlerin inhibitörleri kullanılarak Ang II uyarımının ardından süperoksit anyonu miktarları ölçüldü. Çalışmamızda, NAD(P)H oksidaz enzimi difenileniyodonyum (DPI) (1,22,16,10), mitokondriyal respiratuvar zinciri rotenon (10,13,22), siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri indometazin, ksantin oksidaz enzimi oksipurinol (10,13,22), NOS enzimi L-NAME (10,13,22), AT₁ reseptörü Losartan (10) ile olmak üzere kendilerine spesifik inhibitörleriyle inhibe edilip ortamdaki süperoksit anyonu seviyeleri kontrolleri ile karşılaştırıldı.

Elde ettiğimiz sonuçlar literatür bilgisi ile karşılaştırılıp değerlendirildi.

GENEL BİLGİLER

2.1. Vasküler Duvar ve Vasküler Düz Kas Hücreleri

Vasküler duvar farklı özellikler gösteren bir organdır. Vasküler duvar; proliferere olabilir (hücre sayısını artırıp hiperplaziye uğrama), hipertrofi yapabilir (DNA içeriğinde değişim olmadan hücre boyutlarının artması) ve apoptoze gidebilir (programlı hücre ölümü) (23). Bu fonksiyonları itibarıyla vasküler duvar esnek, entegre ve aktif bir organdır. Vasküler duvar, hücreli (vasküler düz kas hücreleri, fibroblastlar, endotelial hücreler) ve hücreli olmayan komponentlerden oluşmaktadır. Vasküler düz kas hücre (VDKH)'leri farklı büyüme faktörlerine cevap verebilme yetenekleri göz önünde bulundurulduğunda, tüm hücreler arasındaki en esnek hücrelerdir (2). Birçok durumda VDKH'i otokrin ve parakrin büyüme mekanizmalarını beraber kullanır. Gospodarowicz ve arkadaşları (24) 1970'lerde VDKH'nin sadece otokrin büyüme mekanizmaları üzerinde durmuşlarsa da, günümüzde bir çok lokal ve sistemik faktörün vasküler düz kas hücrelerinin fonksiyonlarını düzenlediği bilinmektedir. Bir takım fizyolojik süreçler VDKH büyümesine ihtiyaç duyar. VDKH'nin esnek yapısı; hemodinamik olaylarda, büyüme şeklinde gelişimsel süreçte ve hasarlanma mekanizmasında anahtar rolü oynamaktadır. Yine hipertansiyon, ateroskleroz ve postanjioplasti restenozis gibi patolojik süreçlerde bu mekanizmaları kullanır. Tüm bu süreçlerde endotelial hücreler ve diğer hücreler (fibroblast, dendritik hücreler, inflamatuvar hücreler) ile VDKH'i arasındaki interaksyonlar, patolojik ve fizyolojik yanıtlardaki mekanizmaları belirler. Ateroskleroz patogenezinin insan ve hayvan modellerindeki gelişiminde, VDKH'nin proliferasyonu ve arteriyel medya tabakasından intimaya göçü gösterilmiştir. Yine hipertansiyon patofizyolojisinde, oktapeptid yapılı bir hormon olan angiotensin II (Ang II)'nin VDKH'i üzerindeki etkileri söz konusudur. Renin-angiotensin sistemi de vasküler duvardaki etkilerini özellikle VDKH'i üzerinden göstermektedir (23)

Vasküleri düz kas hücreleri heterojenite göstermektedir. Bir çok araştırmacı damar duvarındaki VDKH'nin morfolojik olarak birbirlerine benzerliğini vurgulasa da, günümüzde vasküler düz kas hücrelerinin fenotip ve fonksiyon olarak heterojenite gösterdikleri bilinmektedir. Bu heterojenite birçok gelişimsel ve çevresel faktörün ortak sonucudur ve vasküleri düz kas hücrelerinin büyüme uyarımına verdiği yanıtı etkilerler (23,25-27)

2.2. Anjiyotensin II (Ang II)

Ang II'nin kardiyovasküleri ve renal hücrelerde vazokonstriksiyon, hücre büyümesi, proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu ve profibrojenik aktivasyonlar gibi bir çok etkisi vardır (28) Ang II özellikle vasküler hastalıkların altında yatan patolojik mekanizmaları ile damar basıncının fizyolojik düzenlenmesinde önemli bir rol üstlenerek, damar duvarının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün korunmasında temel rolü oynamaktadır Ang II etkilerini spesifik reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir (2) Hücre içi sinyalizasyon yolları; bilginin hücre membranı reseptöründen hücre içi proteinlere iletilmesini sağlayan moleküler yolaklarının birbirleri ile etkileşmesini sağlayarak; kasılma, hücre büyümesi, mitogenezis, apoptozis, farklılaşma, migrasyon ve diğer özelleşmiş hücresel fonksiyonları düzenler. Bu sinyal yolları da Ang II'nin hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması ile uyarılmaktadır. Ang II vasküleri motor tonüsü, hücre büyümesini, apoptozisi, hücre göçünü ve ekstraselüler matiks depolanmasını düzenler ve proinflamatuvar etkileri gösterir. Ayrıca Ang II, diğer büyüme faktörlerinin de üretimini uyaran bir hormondur (29).

2.2.1. Anjiyotensin II'nin Vasküler Etkileri

Ang II'nin bilinen her iki reseptörü de (AT₁ ve AT₂) VDKH büyümesinde kesin bir rol oynar. Bu iki reseptör etkilerinde ayrılırlar. AT₁ reseptörü proliferasyon, hipertrofi ve antiapoptotik etkilerle ilgiliyken, AT₂ reseptörü proapoptotik etkilerle ilgilidir Ang II, otokrin büyüme faktörleri içinde en çok

çalışılmış olmalıdır. Renin-Anjiyotensin sisteminin damar duvarında da bulunduğu artık açıkça ortadadır (30).

Ang II doğrudan vasküler hücrelerde bulunan reseptörleriyle, dolaylı yoldan da diğer faktörlerin salınımı ile etkilerini göstermektedir. Ayrıca hücre içi sinyal iletim yollarını etkileyerek vazoaaktif ajanların ve büyüme faktörlerinin seviyelerini arttırmaktadır. VDKH'lerinin gelişme ve vasküler yeniden düzenlenme süreçlerinde önemli sentez özelliklerine sahip olduğu ve vasküler medya tabakasının hücre dışı matris bileşenlerinin major bir kaynağı olduğu gösterilmiştir (30). Olgun kan damarlarında VDKH'leri sessiz ve fibroblast benzeri bir görünümde olurlar (23). Olgun düz kas hücreleri yaralanma ya da hareket meydana gelinceye kadar sessiz kalırlar, ancak yük artışına cevap olarak fizyolojik hipertrofiye uğrarlar (2). Ang II, bu gelişim süreci boyunca AT_1 ve AT_2 reseptörü üzerinden etkin roller oynamaktadır. Vasküler hastalıklarda, düz kas hücreleri uyarıma karşı hiperplazi/hipertrofi ya da migrasyon ile yanıt verirler. AT_1 ve AT_2 reseptörleri hipertansiyon, ateroskleroz ve anjiyogenez ile ilişkili olarak vasküler yeniden düzenlenmede kritik bir rol oynayabilir. AT_2 reseptörleri VDKH'de protein sentezini uyarır. Vasküler düz kas hücrelerinde Ang II reseptör alt tiplerinin her ikisi de bulunur ve vasküler doku cevabı için gereklidir (31-33). Dolayısıyla Ang II, AT_1 reseptörü aracılığı ile vazokonstriksiyonu, büyümeyi, migrasyonu, ekstraselüler matris bileşenlerinin üretimini ve inflamasyonu uyarırken, AT_2 reseptörü aracılığıyla proliferasyon ile hipertrofinin inhibisyonuna ve apoptozis'e katkıda bulunmaktadır (34).

2.2.2. Anjiyotensin II'nin Sentezi ve Moleküler Yapısı

Ang II sekiz aminoasitten oluşan (oktapeptid yapılı) bir hormondur ve renin-anjiyotensin sistemi (RAS)'nin bir komponentidir. Kan basıncını ve plazma hacmini; aldosteron üzerinden düzenlenen sodyum atılımı, sempatik sinir sistemi aktivitesi ve susamaya yanıtla kontrol eder. Ang II, patolojik adaptasyonlarda da (hipertansiyon, vasküler yeniden yapılanma, ateroskleroz) rol oynar. Bunlara ilaveten geleneksel olarak renin-anjiyotensin sistemi (RAS)'da kan basıncı, tuz ve

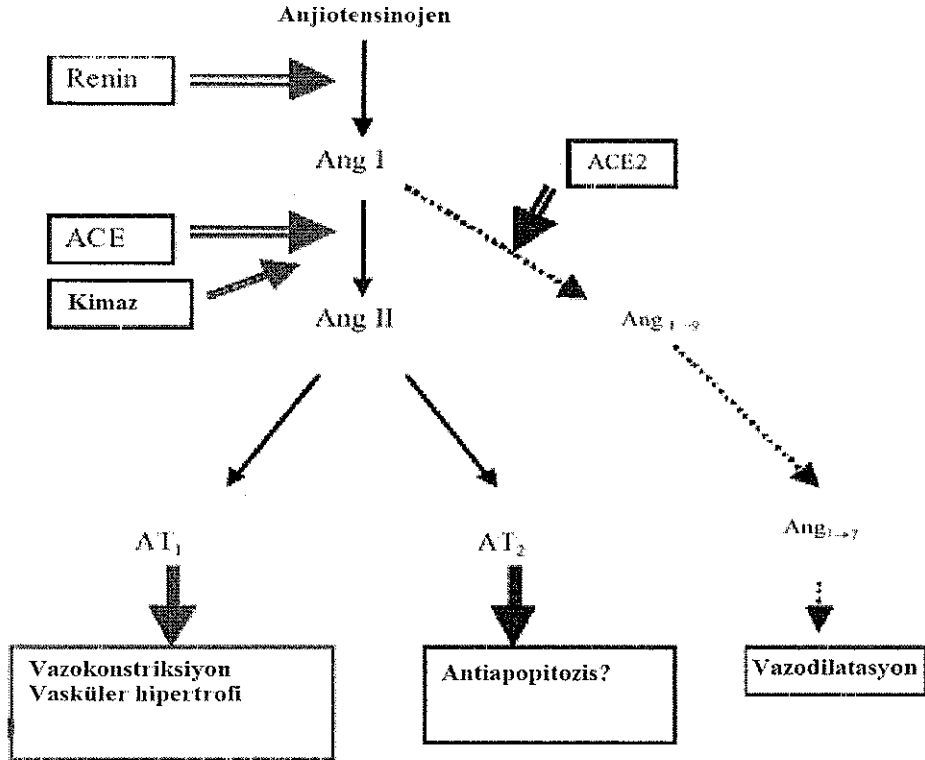
sıvı dengesinde rol oynayan, sirküle bir sistem olarak gözlenmektedir. Bu sistemde temel olarak Ang II'nin de dahil olduğu renal ve adrenal korteks hormonları aktif rolü üstlenirler (2,35,36)

Anjiyotensin oluşumundan önce böbrekler, renin ve onun inaktif prekürsörü prorenin'i dolaşıma bırakırlar. Renin karaciğer kaynaklı anjiyotensinojenden bir dekapeptid olan anjiyotensin I (Ang I)'i dolaşım içinde oluşturur (2,36) Renin, anjiyotensinojeni N-terminalinden keserek dekapeptid yapıdaki Ang I'i oluşturur. Ang I, akciğerde vasküler endoteliumun luminal yüzeyindeki dipeptidil karboksipeptidaz olan anjiyotensin-dönüştürücü enzim (angiotensin converting enzyme, ACE) tarafından aktif form olan Ang II'ye dönüştürülür ACE plazmada dolaşan bir hormon olarak, intersitisyumda ve intraselüler olarak bulunur. Ang II'de vazokonstriksiyon ve aldosteron salınımını uyarır (36-38). Ayrıca Ang I, üç doku nötral endopeptidaz (NEP 24 11, NEP 24 15, NEP 24 26) tarafından heptapeptid olan Ang-(1-7)'ye de çevrilebilir. Ang II aminopeptidazlar tarafından Ang III ve Ang IV'e yıkılır (39) Şekil 2.2.1'de Angiotensin II sentezi, yıkımı ve reseptörleriyle etkileşimleri görülmektedir

Son zamanlarda bu klasik konsept birçok önemli değişikliğe uğramıştır, çünkü RAS komponentleri bir çok dokuda da sentezlenmektedir. Dokulardaki Ang II seviyeleri dolaşımdaki RAS'tan bağımsız olarak kontrol edilmektedir. Anjiyotensinojen lokal olarak vasküler yapılar ve miyokard dokusunda da sentez edilebilmektedir ve kardiyak hipertrofi ile yetmezlik patofizyolojisinde de yer almaktadır (36,40). Renin harici tüm RAS üyeleri vasküler yapılarda gösterilmiş durumdadır (2). Karaciğer tarafından sentezlenen anjiyotensinojenin, mRNA'si ve proteini düz kas hücrelerinde, endotel ve perivasküler yağ dokusunda da bulunmuştur. ACE enkefalinler ve substans P'yi de parçalar, fakat bu etkinin fizyolojik önemi ortaya konamamıştır (41,42) Doku ACE; kan damarları, kalp, beyin, adrenal bez, böbrekler, karaciğer ve üreme organları gibi bütün ana organlarda bulunmaktadır (43). ACE, vasküler endotelial hücrelerin lümenal yüzeyinde lokalizedir (41,44). ACE, kültüre edilmiş vasküler düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinde olduğu kadar adventisyada da yüksek konsantrasyonlarda

bulunmaktadır. Vasküler dokular reninden yoksun olmalarına rağmen, intersitisyumda Ang II'nin lokal üretimi doku ACE tarafından düzenlenmektedir. Doku ACE'nin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir ancak bölgesel kan akımının düzenlenmesine katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (41).

ACE bağımsız yolların Ang II oluşumundaki rolünün, patolojik durumlarda kısmen önemli katkılarının olabileceği Urata ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Setin benzeri proteaz olan kimotripsinin (kimaz), insan kalp ve böbreğinde Ang I'in Ang II'ye dönüşümü için önemli bir yol olabileceği gösterilmiştir (45,46). Fonksiyonel kimaz ve ACE bağımsız yol insan ve köpek vasküler dokularında da Takai (47), Hollenberg (43), Shiota (48) ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir



Şekil 2.2.1. Ang II sentezi, reseptörleri ve etkileri (www.equidel.nes.co.uk)

2.2.3. Anjiyotensin II Reseptör Tipleri ve Görevleri

Memeli hücrelerinde Ang II, etkilerini AT₁ ve AT₂ olarak adlandırılan, yüksek afiniteli plazma membran reseptörleri aracılığıyla göstermektedir (49). Ang II reseptörleri tüm hücrelerin plazma membranları üzerinde bulunmaktadır. Günümüzde bilindiği üzere, Ang II'nin bilinen etkilerinin çoğu AT₁ reseptörü aracılığıyla (50). AT₁ reseptörü yedi transmembran üniteli G protein bağımlı reseptörler süper ailesindedir (51). VDKH'lerinde Ang II AT₁ reseptörüne bağlandığında, tipik olarak heterotrimerik Gq proteini üzerinden fosfolipaz C'yi aktive eder ve inozitol trifosfat ile diaçilgliserolü oluşturur AT₁ reseptörleri hem bazal durumda hem de Ang II uyarımına cevap olarak tirozin birimlerinden fosforile edilir (52,53). AT₁ reseptörünün, Ang II'nin birçok fizyolojik etkilerinde ve Ang II uyarımlı vasküler fonksiyonların kontrolünde baskın rolü gösterilmiştir AT₁ reseptörleri düz kas hücrelerinde yüksek oranda, adventisyada daha az ve endotelde ise saptanamayacak düzeylerde bulunur (54,55). AT₁ reseptörünün AT_{1A} ve AT_{1B} olmak üzere iki alt tipi tanımlanmıştır Aminoasit dizileri bakımından bu iki reseptör alt tipi birbirine benzerdir. AT_{1A} reseptörleri böbrek, akciğer, karaciğer ve VDKH'lerinde belirgin olarak ekspresse edilirken, AT_{1B} reseptörleri adrenal bezi ve ön hipofiz bezinde yüksek miktarlardadır (56).

Anjiyotensin reseptörünün ikinci major izoformu olan AT₂, fetal dokularda büyük miktarlarda ekspresse edilmektedir ve fetal hayat sonrası büyük oranda azalmaktadır (2,57). AT₂ reseptörü vasküler yapıların adventisya tabakasında baskın olarak bulunmaktadır ve mediya tabakasında da rahatlıkla saptanabilir. AT₂ reseptörü 7 transmembran heliksinden oluşan G proteinine bağımlı bir reseptördür. X kromozomu üzerine lokalizedir. Yetişkinlerde pankreas, kalp, böbrek, böbreküstü bezleri, beyin, vasküler yapılar ve üreme organlarında saptanabilir (2,58-60). AT₂ reseptörünün fonksiyonel rolleri tam olarak bilinmemektedir. Özellikle kardiyovasküler dokulardaki etkileri araştırılmaktadır. Ancak AT₁ aracılı fizyolojik etkileri antagonize ettiği düşünülmektedir (34,61-65).

Bu iki reseptör haricinde, Ang II'nin AT₃ ve AT₄ olmak üzere fonksiyonları tam olarak belirlenememiş iki alt reseptör tipi daha tanımlanmıştır. Bu Ang II reseptör alt tipi sadece hücre dizilerinde (cell-lines) bulunmuştur. AT₄ reseptörünün kalp, akciğer, böbrek, beyin ve karaciğerde bulunduğu da savunulmaktadır (51,66).

2.3. Reaktif Oksijen Radikalleri (Reactive Oxygen Radicals, ROS)

2.3.1. ROS ve Metabolizması

Geçmiş yıllar boyunca Ang II'nin farklı hücrelerde yarattığı etkilerin nasıl gerçekleştiğine dair bir çok yorum yapıldı. Ang II 1A, 1B ve 2 reseptörlerinin klonlanmasıyla birlikte ilgi, Ang II'nin farklı etkilerinin ve vasküler, renal ve nöronal hücrelerle nasıl interaksiyona girdiğinin moleküler mekanizmaları üzerine odaklandı. Ang II'nin ROS üzerine etkileri en çok ilgi gören konu haline geldi. Özellikle bu moleküllerin büyümeyle ilişkili sinyaller ürettiği ve oksidatif stresin hiperlipidemi, diyabetes mellitus, hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı ve kronik kalp yetmezliği gibi hastalıklarla ilişkili olan kardiyovasküler fonksiyon bozukluğunun başlaması ve ilerlemesinde major bir rol oynadığı görüldü. Oksidatif stres, reaktif oksijen radikallerinin artması ile karakterize bir durumdur. Reaktif oksijen türleri (ROS), damarsal yapılarda her bir hücre tipi üzerinde farklı fonksiyonel etkiler gösterir ve sadece patofizyolojik değil fizyolojik rollere de sahiptir (67). Reaktif oksidan ajanlar özel bir metabolik yolla oksijenden türetilir. Savunma hücreleri olan fagositlerde bu reaksiyon çok özgündür ve savunma mekanizmasının anahtarı konumundadır. Ancak diğer dokularda; özellikle vasküler, nöronal dokular ve üreme organlarında, ROS kaynakları halen moleküler mekanizmalarıyla birlikte araştırılmayı beklemektedir (68,69).

ROS terimi basit anlamda; serbest radikal olan süperoksit anyonunu (O₂⁻), nonradikal hidrojen peroksiti (H₂O₂) ve yüksek reaktivlik gösteren hidroksil radikalini (OH⁻) kapsamaktadır. Vasküler yapılarda en önemli ROS'lardan biri

oksijenin univalan reaksiyon ile redükte olmasıyla meydana gelen süperoksit anyonu (O_2^-)'dur (70) Bu reaksiyon NAD(P)H oksidaz, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, sikloksijenaz, p450 mono-oksijenaz enzimleri ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla gerçekleşir (7). Spontan bir reaksiyonla veya süperoksit dismutaz (SOD) tarafından O_2^- 'in dismutasyonu, ROS'un daha stabil formu olan ve diğer ROS için merkez pozisyonundaki molekülü, yani hidrojen peroksit'i (H_2O_2) oluşturur. Hidrojen peroksit kloru oksidize eder ve hipoklorik asid (HOCl) oluşur. Bu olay nötrofillerde miyeloperoksidaz enziminin varlığını da işaret etmektedir. HOCl süperoksit anyonuyla reaksiyona girerek hidroksil radikalini (OH \cdot) meydana getirir. Ayrıca hidrojen peroksit katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından da enzimatik bir şekilde H_2O 'ya çevrilir. H_2O_2 ve süperoksit anyonunun demir katalizli bir reaksiyonuyla da hidroksil radikali oluşabilir (Haber-weiss reaksiyonu). Vasküler hücrelerin hemen hemen bütün tiplerinde O_2^- ve H_2O_2 üretilir. Nitrik oksit ile O_2^- reaksiyonu ROS'un vücuda en zararlı üyesi olan peroksinitrit'i oluşturur ve dokular için bu molekül yüksek derecede reaktiftir (7,71).

Süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit gibi önemli reaktif oksijen türleri, hücre içi sinyal yollarında ve böylelikle de hipertansiyon gibi renal ve vasküler hastalıklar, endotelial disfonksiyon, nitrat toleransı, ateroskleroz ve selüler yeniden yapılanma (selüler remodeling) gibi patofizyolojik hallerde temel rolü oynarlar (7). Ang II uyarımı sonrası gerçekleşen uzun dönem etkiler içinde, vasküler yapılardaki süperoksit anyonu üretimi kilit rolü oynamaktadır. Bu noktada Ang II'nin ani sinyal iletim olayları, erken sinyal iletim olayları ve uzun süreli sinyal iletim olayları şeklinde hücre içi sinyal iletim olaylarına etkilerini görmekteyiz (2). Ang II, vasküler yapılarda vazokonstriksiyon gibi kısa süreli etkilere ve hücre büyümesi, migrasyon, inflamasyon ve ekstraselüler matris depolanması gibi uzun zamanlı fizyolojik etkilere yol açan karmaşık hücre içi sinyal iletim yollarının kontrolünü sağlar. Farklı zamanlara ait özelliklerine göre Ang II'nin ani, erken ve geç olarak sırasıyla saniyeler, dakikalar ve saatler içinde gelişen olaylar şeklinde (multifazik) meydana gelen etkileri AT_1 reseptörü aracılığıyla gerçekleşir. ROS metabolitlerini içeren oksidatif stres, proto-

onkogenlerin ekspresyonu ve protein sentezi, saatler içinde gelişen geç sinyal olaylarını oluştururlar (2).

Anjiyotensin II stimülasyonlu ani sinyal iletim olayı vasküler kontraksiyonda olduğu gibi hızlıdır ve Ang II'nin reseptörüne bağlanmasını takiben saniyeler içerisinde oluşan çeşitli sinyal iletim yollarını kullanır (73).

Anjiyotensin II stimülasyonlu erken sinyal iletim olayı dendiğinde; AT₁ reseptörlerinin uyarımının ardından büyüme, migrasyon, ekstraselüler matriks depolanması ve büyüme faktörlerinin üretimi gibi, VDKH'lerinin uzun dönem fonksiyonlarının düzenlenmesi ile ilişkili bir çok hücre içi sinyal iletim yolları kastedilmektedir (73)

Anjiyotensin II stimülasyonlu uzun süreli sinyal iletim yolları ise; Ang II'nin vasküler yapılar ve kardiyak dokudaki hücreleri arasında, matriks depolanmasını takiben gelişen hücre büyümesi, migrasyon ve adhezyonun uzun dönem kontrolünde etkilidir. Böylece aterosklerozda görülen vasküler yeniden düzenlenme (vasküler remodeling) ve kalp büyümesindeki kronik adaptif değişiklikler meydana gelir. Uzun dönem Ang II sinyalizasyonunun temelini oluşturan hücre içi kaskadlar değişik kinazların aktivasyonunu sağlar ve büyüme faktörlerinin üretimi ile nükleer sinyal kaskadlarının uyarılması eninde sonunda hücre büyüme ve farklılaşma ile sonuçlanır (74). Hücre büyümesi ve farklılaşma Ang II'nin VDKH kültürlerinde protein sentezini uyararak gerçekleştirirken diğer büyüme faktörleri gibi, VDKH kültürlerinde hiperplaziyi de indükleyebilir. Ancak sadece hipertrofiyi indüklediği de savunulmaktadır. Ayrıca Ang II'nin VDKH'de migrasyonu da tetiklediği gösterilmiştir (75-77).

Ang II inflamatuvar yanıtın bir çok basamağını düzenlemektedir. Bu basamaklar; vasküler permeabilite, lökosit infiltrasyonu, doku hipertrofi/proliferasyonu ve fibrozisin artışı şeklindedir. Bu noktada Ang II'nin NAD(P)H oksidaz enzim kompleksi üzerinden ROS'u arttırarak endotelial disfonksiyon ve vasküler inflamasyona etkileri olduğu bilinmektedir. Ang II

vasküler inflamasyonu AT_1 reseptörü üzerinden arttırırken, AT_2 reseptörlerinin ise zıt etkileri olduğu bilinmektedir (78).

Ang II ekstraselüler matris (ESM) bileşimindeki değişiklikleri de tetikler. ROS'un matris metalloproteinazlarının (MMP) aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Özellikle de MMP-2'yi arttırır. Ang II ve MMP-2'nin aterosklerotik plaklarda varlığı gösterilmiştir. Böylece ekstraselüler matris dekompozisyonunun artışı, ateros patogenezinde esas rolü alan aterosklerotik plakların oluşumunu sağlar. Ekstraselüler ortamdaki bu değişiklikler VDKH'de proliferasyonu ve migrasyonu da desteklemektedir (79)

2.3.2. VDKH ve ROS

ROS'un vasküler düz kas hücrelerinde bir çok etkisi vardır. ROS vasküler düz kas hücrelerinde hipertrofi/hiperplazi'yi tetikler, migrasyonu, ekstraselüler matris kompozisyonundaki değişimleri, inflamatuvar gen ekspresyonunu ve kontraksiyonu başlatır (71)

VDKH'i ROS'a büyüme şeklinde bir yanıt verirler. Farklı fenotipe sentetik VDKH'leri; hipertansiyon, ateroskleroz ve anjiyoplasti sonrası restenoz gibi kardiyovasküler hastalıklarda bulundu. ROS üretimi hipertrofik ve proliferatif VDKH büyümesinin patolojisinde de yer almaktadır. Endojen olarak süperoksit anyonu üzerinden üretilen hidrojen peroksit VDKH'nin yaşam ve proliferasyonunun düzenlenmesinde de önemli olabilir, çünkü katalaz'ın aşırı ekspresyonu apoptozis oranını arttırırken, düz kas hücre proliferasyonunu inhibe eder. ROS, VDKH'de apoptozis ve farklılaşmaya da neden olur. Bu noktada VDKH'de iki zıt etki, yani apoptozis ve hipertrofi/hiperplazi'den bahsedildiğinde, bu etkilerin ROS konsantrasyonlarına bağımlı olabileceği ileri sürülmektedir. Yüksek konsantrasyonda hidrojen peroksit apoptozise neden olurken, orta derecedeki konsantrasyonlar hücre döngüsünde G1 fazında duraklamaya neden olmaktadır (80).

Yine bir başka patogenez olan vasküler düz kas hücre migrasyonunda ROS'un rolü açıkça gösterilmiştir. Weber ve arkadaşları tarafından PDGF ile uyarılmış VDKH migrasyonunun bir flavoprotein inhibitörü olan difenileniyodonyum (DPI) tarafından inhibe edildiği gösterildi. Bu noktada DPI'nın NAD(P)H oksidaz multienzim kompleksini inhibe ettiği düşünüldüğünde, bu enzim üzerinden oluşan O_2^- üretiminin VDKH migrasyonu için gerekli olduğu anlaşılmaktadır (81).

Matriks metalloproteinazlar (MMP) tarafından ekstraselüler matriksin yapısının düzenlenmesi vasküler yapılarda patofizyolojik süreçlerde önemlidir. MMP aktivitesinin ROS tarafından düzenlendiğine dair literatür bilgileri mevcuttur. İmmunohistokimyasal çalışmalar, aterom plaklarında MMP'lerin varlığını da gösterdi. Örneğin ROS, MMP-2 ekspresyonunu ve aktivitesini artırır. Böylece ROS farklı basamaklarda matriksin yeniden düzenlenmesini kontrol eder (79,82).

Bilindiği üzere ateroskleroz, hipertansiyon ve diyabetes mellitusun vasküler komplikasyonlarında, vasküler yanıt önem kazanır ve nihayetinde bu hastalıklar çeşitli sitokinlerin vasküler lezyonların ilerlemesinde önemli roller oynadıkları inflamatuvar hastalıklar olarak kabul edilmektedir. Ang II uyarımlı inflamatuvar yanıt bu noktada önem kazanmaktadır. ROS bu yanıtta etkin bir rol oynar (78).

Yapılan bir çok çalışmada da süperoksit anyonunun NO inaktivasyonu ile vazomotor tonusu düzenlediği iyi bir şekilde saptanmıştır. Bu iki molekül arasındaki denge vasküler vazomotor yanıt dengeler. NO vasküler relaksasyona neden olurken, ksantin oksidaz ve Ang II tarafından üretilmiş ROS, aortada vasokonstriktör etki yaratır. H_2O_2 ise pulmoner, koroner ve mezenterik arterlerde vasorelaksasyona neden olur (83). Ancak bu konuda savunulan tezat fikirler daha standart ve kaliteli ileri çalışmalarla değer kazanacaktır.

Vasküler yapılarıdaki ROS ve kaynakları üzerine pek çok çalışmalar yapılmıştır. NAD(P)H oksidaz multienzim kompleksi haricinde farklı sistem ve enzimlerde süperoksit anyonu için kaynak olabilirler.

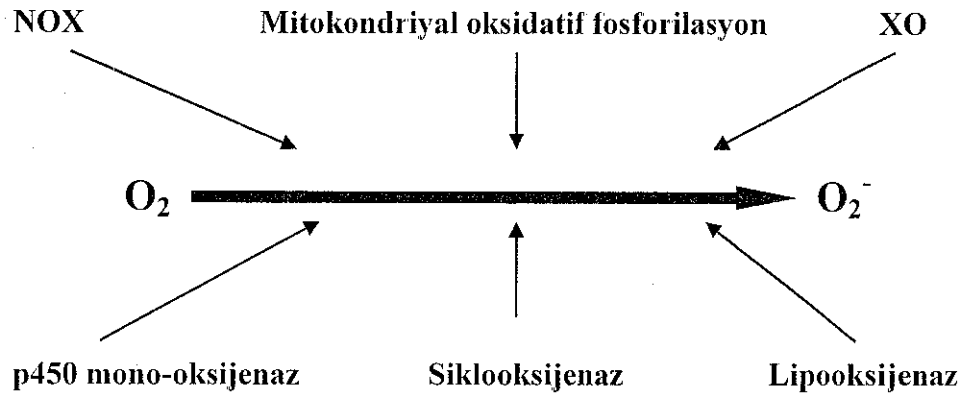
Bu noktada süperoksit anyonu üretimi, primer olarak NAD(P)H oksidaz enzim kompleksi (NOX) üzerinden oluşuyor görünmekle beraber başka kaynaklardan da oluşmaktadır. Bu kaynaklar (8);

1) Flavinler, tiyoller ve katekolaminler gibi normal seltüler içerikleri olan küçük moleküller,

2) Mitokondriyal respiratuvar zincir enzimleri (NADH ve ubikinon Q-sitokrom b kompleksi),

3) Siklooksijenaz, lipooksijenaz ve sitokrom p450 monoooksijenaz gibi araşidonik asit metabolizmasıyla ilgili olayların ürünleri,

4) Ksantin oksidaz (XO) enzimidir (şekil 2.3 1).



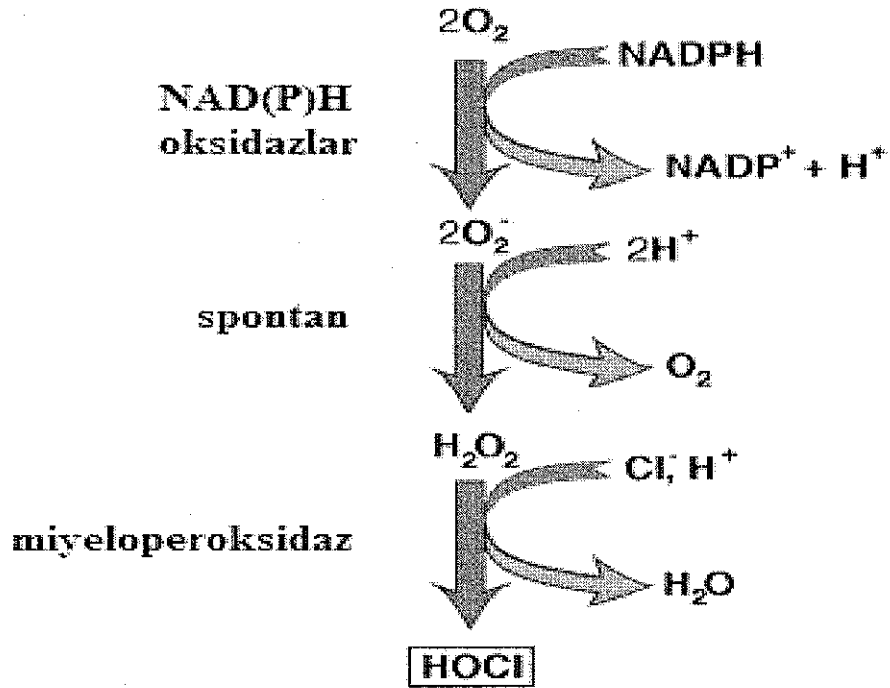
Şekil 2.3.1. Süperoksit anyonu kaynakları (7)

Nitrik oksit süperoksit anyonunun olduğu ortamda peroksinitrit ($ONOO^-$)'i oluşturur. Peroksinitrit'de nitrat ve OH^- 'a parçalanır. Münzel ve arkadaşları, nitrat

toleransının altında yatan mekanizmanın, süperoksit anyonlarının ortamdaki NO'ı azaltmasından kaynaklandığını tezinin, özellikle ROS Ang II tarafından indüklendiğinde meydana geldiğini ilk defa ortaya atan gruptur (84).

Ksantin oksidoredüktaz ksantin dehidrogenaz ve ksantin oksidaz olmak üzere fonksiyonel olarak farklı iki formdadır. Ksantin oksidaz üzerinden meydana gelen ROS, iskemi/reperfüzyon, hiperkolesterolemi ve endotelial disfonksiyonu içeren klinik-patolojik durumların etiyopatogenezinde yer alır (85).

NAD(P)H oksidaz multienzim kompleksi farklı alt ünitelerden oluşmuş bir enzim kompleksidir. NAD(P)H oksidaz enzim kompleksi ilk olarak tanımlandığı fagositlerde, respiratuvar yanma sırasında oluşan süperoksit anyonu rejenerasyonundan sorumlu bir enzimatik komplekstir (7,8). NAD(P)H oksidaz enzim kompleksi birçok non-fagositer hücrede de (fibroblastlar, endotelial hücreler, vasküler düz kas hücreleri, glomerüler mezengiyal hücreler, podositler ve böbrek proksimal tubül hücreleri) bulunur. NAD(P)H oksidaz bu yapılarda süperoksit anyonu üzerinden ROS yapımını tetikler (7,12,13,22)(şekil 2.3.2).



Şekil 2.3.2. NOX ve ROS (www2.phys.rush.edu)

ROS'un pek çok kaynağı göz önünde bulundurulduğunda, non-mitokondriyal membrana bağımlı NADH/NADPH oksidazın hücrelerde süperoksit anyonu için major kaynak olduğu bilinmektedir. Bu enzim elektronları NADPH'tan moleküler oksijene aktararak süperoksit anyonunu oluşturur (7,12,13,22). NAD(P)H oksidaz bir çok alt ünitelerden oluşur: elektron transfer ünitesi gp91^{phox} (91-kDa'luk bir β -alt ünite, nox-1 yada nox-4) ve p22^{phox} (22-kDa'luk bir α -alt ünite) ve düzenleyici alt üniteler (p47^{phox}, p67^{phox} ve düşük moleküler ağırlıklı rac-1 ve rac-2). Fagositer hücreler ve non-fagositer hücrelere ait bu birimler arasında yapısal farklılıklar tespit edilmiştir. Bu alt ünitelerin ekspresyon şekilleri de vasküler hücreler arasında değişmektedir. Enzimin aktivasyonu, spesifik hücre içi sinyallerin uyarılması ile kısa süreli ve enzim alt ünitelerinin üst düzenlenmesi (up-regülasyon) şeklinde uzun süreli etkiler meydana getirir. Düşük Ang II konsantrasyonlarında bile (0.1 nM) NAD(P)H oksidaz kökenli ROS artar, bu da bu enzim sisteminin fizyolojik olarak da önemli olduğunun kanıtıdır. Aktivasyon sırasında p47^{phox} ve p67^{phox} proteinleri membrana transloke olur ve sitokrom b₅₅₈ ile etkileşerek aktif oksidazı oluşturur (67).

Bu enzim elektronları NADH ya da NADPH'tan moleküler oksijene transfer eder ve süperoksit anyonu oluşturur. Vasküler oksidazın tam molekül yapısı bilinmemekle beraber nötrofil oksidaz ile benzer özellikler gösterir. Nötrofillerde NAD(P)H oksidaz beş alt ünitelerden oluşur: 22-kDa'luk bir α -alt ünitesi (p22^{phox}) ve gp91^{phox} (bu ikisi birlikte sitokrom b₅₅₈'i oluşturur, elektron transfer elementi); sitozolik bileşenler p47^{phox} ve p67^{phox}; ve düşük moleküler ağırlıklı G proteini olan rac-1 veya rac-2. VDKH'lerinde p22^{phox} süperoksit anyonu üreten NAD(P)H oksidaz sisteminin kritik bir bileşenidir. NAD(P)H oksidazın Ang II ile aktivasyonu geç olmaktadır ve VDKH'lerinde yalnızca Ang II uyarımından 60 dakika sonra saptanır (68). Bu etki 24 saat boyunca sürekli ve etkili olmaktadır. NAD(P)H oksidaz bağımlı sinyal yolları hücre büyümesi gibi Ang II aracılı uzun dönem sinyal olaylarında muhtemelen önemli bir rol oynamaktadır. Buna dayanarak, NAD(P)H oksidaz DPI ile inhibe edildiği zaman, VSMC'de Ang II ile uyarılmış protein sentezi de baskılanır. NAD(P)H oksidaz

tarafından üretilen süperoksit anyonu, SOD tarafından hızlı bir şekilde H_2O_2 'ye dönüştürülür. H_2O_2 'de peroksidaz ya da katalaz tarafından yakalanır O_2^- ve H_2O_2 birbirleri ile daha ileri reaksiyona girebilir veya demir içeren moleküllerle yüksek derecede reaktif hidroksil (OH) radikalleri oluşturabilir (68,69).

2.4. NADPH Oksidaz Sistemi (NOX)

Hücrel savunma mekanizmasının en belirgin özelliklerinden birisi oksidize halojeni, okside edici radikalleri ve singlet oksijen gibi bir grup yüksek derecede reaktif okside edici ajanları mikrobisidal etki amacıyla kullanmaktır. Bu reaktif oksidanların öncüsü, fagositler (nötrofil, eozinofil, mononükleer hücreler) tarafından oluşturulan süperoksit anyonudur. Bu reaktif oksidanların üretimi oksijen tüketiminde belirgin bir artışa yol açtığı için ortaya çıkan metabolik olaya solunumsal patlama denir (86-89)

NADPH oksidaz multienzim kompleksi NADPH'ı kullanarak bir elektronun indirgenmesiyle oksijenin O_2^- haline dönüşümünü sağlayan hücre membranı yerleşimli bir enzimdir (87). Katalizlediği reaksiyon aşağıdaki şekilde özetlenebilir:



Hücreler uygun uyarana maruz kaldığında dinlenme durumdaki NADPH oksidaz enzimi aktif hale geçer.

NADPH oksidazın altı komponentden oluşmaktadır.

- 1) p47^{phox}
- 2) p67^{phox}
- 3) p40^{phox}
- 4) rac-2

5) p22^{phox}

6) gp91^{phox}

NADPH oksidaz enzim kompleksinin aktifleşmesi için sitoplazmik komponentlerin membrana translokasyonu ve bunların sitokrom b₅₅₈ ile ilişkisi gerekmektedir. Sitokrom b₅₅₈ elektronları NADPH'dan O₂'ye taşır.

Sitokrom b₅₅₈

Allison ve arkadaşları tarafından (90) tarafından NADPH oksidazın bir komponenti olarak tanımlanmış olan Sitokrom b₅₅₈ kızilötesi ışıındaki absorbans piki nedeniyle bu adı almış, membrana bağı bir flavohemoproteindir. İstirahat halindeki nötrofillerde %85'i plazma membranı ile birleşen spesifik granüller ve intraselüler sekretuar veziküllerin membranlarında bulunurlar (87). Uyarımla beraber bu organeller plazma membranı ile birleşir ve sitokromu hücre yüzeyine transfer ederler (91). Sitokrom b₅₅₈, p22^{phox} ve gp91^{phox} undan oluşan kompleksdir ve sadece denatürasyon ile birbirinden ayrılır

gp91^{phox}

gp91^{phox} 570 aminoasit, 3 adet transmembran heliksi, 5 adet N-bağı glikolizasyon bağlanma yeri ve aktivasyon sırasında sitozolik komponentlerle reaksiyona giren C-terminalini de içeren bir polipeptiddir. Kronik granüloamatöz hastalığında gp91^{phox} un eksikliği mevcuttur ve oldukça geniş mutasyonlar gösterir. gp91^{phox} un stabilitesi p22^{phox} un varlığına bağıdır p22^{phox} eksikliği olan enzimlerde, gp91^{phox} un polipeptidi de yoktur (87,92).

p22^{phox}

p22^{phox} hücre membranının iki tarafına da sarkmış durumda bulunan transmembranel bir proteindir. Bu proteinin yapısı diğer sitokromlar ile çok az benzerlik gösterir. Sitokrom b₅₅₈'de bulunan hem'in ya 2 adet p22^{phox} molekülüne

ya da 1 adet p22^{phox} molekülü ve 1 adet gp91^{phox} a ait bir histidin molekülüne bağlı olduğu düşünülmektedir. p22^{phox} komponenti eksik bireylerde, mutasyonların çoğu sitokrom kaybına yol açar (87).

p47^{phox}

p47^{phox} molekülü başka proteinlerle etkileşime yarayan iki SH3 birimi içeren, 390 aminoasit'lik bazik bir proteindir. p47^{phox} mRNA'sı ve protein ekspresyonu fagositik hücelere özgüdür (93) p47^{phox} NADPH oksidazın fonksiyonu için hayati öneme sahiptir. Esas rolünün p67^{phox}'un plazma membranına tutunması olduğu düşünülmektedir. Uyararla etkileşimin ardından sitoskeletonla interaksiyona girer ve sonra sitokrom b₅₅₈ ile birleşeceği plazma membranına doğru hareket eder. Bu etkileşimlerin temelinde p47^{phox}'a ait SH3 birimi vardır. Aktivasyon sonucu bu birim p22^{phox} ile etkileşim için hazır hale gelmiş olur (94,95). Clark ve arkadaşları (91) protein kinaz C'nin p47^{phox}'u fosforile ettiğini ve protein kinaz C inhibisyonunun hem p47^{phox}'un sitoskeleton ile ilişkisini hem de O₂⁻ üretimini engellediğini göstermişlerdir. p47^{phox}'un birçok fosforilasyon bölgesi vardır ve oksidaz aktivitesi için gereklidir (96).

p67^{phox}

El Benna ve arkadaşları (97) p67^{phox}'un protein kinaz C tarafından fosforile edildiğini ve fosforilasyon sonrası p47^{phox} ile kompleks oluşturduğunu göstermişlerdir. Han ve arkadaşlarına (98) göre de p67^{phox}'un NOX fonksiyonu için gerekli olan bir aktivasyon birimi bulunmaktadır. P67^{phox} sitokrom b₅₅₈ içinde NADPH'dan O₂'ye elektron transferini gerçekleştirir (91).

rac-2

NADPH oksidazın aktivasyonunda kritik bir rol oynamaktadır. Koga ve arkadaşları (99) rac-2'nin p67^{phox}'un N-terminali ile olan ilişkisinin, oksidaz aktivitesi için gerekli olduğunu göstermişlerdir. Diğer yandan Philips ve

arkadaşları (100), rac-2 translokasyonunun oksidaz aktivitesi ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir. Rac-2'de gerçekleşen bir inhibitör mutasyonunun insanlarda nötrofil bozukluğu sendromuna yol açtığı yakın zamanda gösterilmiştir (101).

MATERYAL ve METOD

3.1. Tez Materyali ve Kimyasal Malzemeler

Hazır hücre kültürü besiyeri (medyum), (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), HEPES, Tripsin-EDTA (1X), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), kalsiyum klorid (CaCl_2), kalsiyum klorid iki sulu ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), KCl, NaCl, NaH_2PO_4 , MgCl_2 , glukoz, elastaz, kollajenaz, soya tripsin inhibitör (STI), bovine serum albumin (BSA), fetal bovine serum (FBS), L-glutamin, penisilin-streptomisin ve NADPH Sigma'dan satın alındı Tripsin-EDTA (10X) ICN'den satın alındı

Medyum saklama amacıyla 100 mL ve 500 mL hacminde Simax marka otoklavlanabilir özellikte kapaklı cam şişeler kullanıldı. Hücre kültüründe kullanılan 12-kuyucuklu plaklar, 25 cm^2 'lik ve 50 cm^2 'lik hücre kültür kapları ile 15 mL ve 50 mL'lik plastik tüpler ile benzeri sarf malzemeler R&D Falcon firmasından satın alındı.

Steril mikro-cerrahi seti Akdeniz Üniversitesi Deneysel Hayvanları Biriminden temin edildi.

1, 5, 10 ve 25 mL'lik cam pipetler ve Pastör pipetleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı'ndan temin edildi.

Anjiyotensin II Sigma'dan satın alındı AT_1 antagonisti Losartan, Merck Sharp&Dohme firması tarafından bedelsiz temin edildi Difenileniyodonyum (DPI) Calbiochem ve Sigma firmalarından satın alındı Rotenon, indometazin, oksipurinol, L-NAME Sigma firmasından satın alındı.

Resazurin ve sitokrom c Sigma'dan satın alındı.

İmmünohistokimya yönteminde kullanılan primer ve sekonder antikorlar Sigma'dan satın alındı. İmmünohistokimyasal analizler için ise Dako marka immünohistokimya kiti kullanıldı. Protein ölçümleri için Bio Rad marka protein deney kiti kullanıldı.

3.2. Aletler, Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler

İnkübatör	: SL Shel Lab CO ₂ Incubator
Florometre	: Luminescence Spectrophotometer, LS 50 B, Perkin Elmer
Spektrofotometre	: Thermo Lab Systems Multiscan Spectrum, 1500
Santrifüj	: Nuve NF 800
Santrifüj	: Heraeus Instruments Megafuge 1.0 R
Sonikatör	: Bandelin Sonopuls UV 2070
Buzdolabı	: Indesit (+4, -20 °C)
pH metre	: Schott CG 840
Su banyosu	: B. Braun Biotech International
Hassas terazi	: Shimadzu AW 120
İnvert mikroskop	: Zeiss, Olympus
Hood (Kültür Kabini)	: Bilser

Vasküler düz kas hücre dokusu için 250-350 g ağırlığında erkek Wistar ratlar kullanıldı. Ratlar, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları biriminden temin edildi.

Vasküler düz kas hücrelerinin izolasyonu Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminde, steril oda da yapıldı.

Primer hücre kültürü işlemleri ve protein ölçümleri, ferrisitokrom c redüksiyon ölçümleri ile ilgili deneyler, Akdeniz Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

Resazurin ölçüm deneyleri, Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda yapıldı

Tüm plastik ve cam malzemelerin sterilizasyonu için Akdeniz Üniversitesi Sterilizasyon Merkezi ile çalışıldı.

3.3. Rat Aortası Düz Kas Hücrelerinin İzole edilmesi

3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar

Transfer Medyumu

Solüsyonu hazırlamak için 2.94 mg CaCl_2 tartılıp 10 mL HBSS içinde çözüldü Medyum 0.2 mM konsantrasyonda hazırlandı. Sterilizasyon için 0.22 μm 'lik filtreden geçirildi ve 90 mL HBSS eklenip final hacim 100 mL'ye tamamlandı. Total hacimde % 2 konsantrasyonda olacak şekilde 2 mL penisilin-streptomisin antibiyotiği konuldu ve +4 $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Enzim İle Ayrışma Solüsyonu (EAS)

Final hacim 4 mL olacak şekilde steril HBSS solüsyonu (Ca^{+2} - Mg^{+2} içermeyen) içerisinde, her biri stok solüsyonlarından alınan 0.2 mM kalsiyum klorid (CaCl_2), 15 mM HEPES (pH: 7.2-7.3), 0.0625 mg/mL elastaz, 0.25 mg/mL soya tripsin inhibitör (STI), 0.5 mg/mL kollajenaz ve 2.0 mg/mL bovine serum albumin (BSA) çözüldü

Stok solüsyonlar

Bovine Serum Albumin (BSA): Stok solüsyon için 2 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde, 5 mL HBSS solüsyonu içerisinde 80 mg albumin çözüldü. Çözelti 0.22 μm 'lik steril filtreden geçirildi ve +4 $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. EAS hazırlanırken bu stoktan 0.5 mL alınıp total solüsyona eklendi

Hepes: 15 mM konsantrasyonluk stok solüsyon için, 10 mL HBSS içerisinde 143.1 mg Hepes çözüldü. Çözelti 0.22 µm'lik steril filtreden geçirildi ve +4 °C'de saklandı. EAS hazırlanırken bu stoktan 1 mL alınıp total solüsyona eklendi

Kollajenaz (Tip I-A): Steril toz halindeki 100 mg kollajenaz (total 125 ünite), 12.5 mL HBSS içinde çözüldü. 12.5 mL stok solüsyon 25 adet 0.5 mL'lik steril plastik tüplerde -20 °C'de saklandı. Stok solüsyondan alınan 250 µL'lik miktar, enzim ayrışma solüsyonuna eklendi.

Elastaz: Steril toz halindeki 5 mg elastaz (pankreatik tip E, 90 ünite), 5 mL HBSS içinde çözüldü. 5 mL'lik miktar 10 adet 0.5 mL'lik steril plastik tüplere bölündü ve -20 °C'de saklandı. Stok solüsyondan alınan 250 µL'lik miktar enzim ayrışma solüsyonuna eklendi

Soya Tripsin İnhibitör (STİ): 5 mL HBSS solüsyonu içerisinde 5 mg STİ Tip I-S tartılıp çözüldü. Konsantrasyonu 0.25 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. Stok solüsyon 0.22 µm'lik steril filtreden geçirilip, +4 °C'de saklandı. Stok solüsyondan alınan 1 µL'lik miktar enzim ayrışma solüsyonuna eklendi

CaCl₂: Solüsyon konsantrasyonu 0.2 mM olacak şekilde, 10 mL HBSS içerisinde 2.352 mg CaCl₂ çözüldü. Stok solüsyon 0.22 µm'lik steril filtreden geçirilip +4 °C'de saklandı. Stok solüsyondan alınan 0.5 mL'lik miktar enzim ayrışma solüsyonuna eklendi.

Bu stoklardan yukarıda belirtilen hacimler pipetlendikten sonra, üzerine 0.5 mL steril HBSS eklenerek 4 mL'lik enzim ayrışma solüsyonu hazırlandı

3.3.2. Rat Aortası Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu

250-350 g ağırlığında sağlıklı Wistar Rat, eter anestezisi altında uyutulduktan sonra, steril koşullar altında torasik aorta, abdominal aortanın üst

kısmıyla birlikte alındı. Aorta, kan ve benzeri artıklardan transfer medyumuyla dolu bir petri kabında temizlendi. Hücre canlılığını korumak amacıyla petri buz üzerinde daha önceden steril hale getirilmiş odaya nakledildi. Tüm bu işlemler steril koşullar altında gerçekleştirildi. Bundan sonra doku disseksiyon aşamasına geçildi. Bunun için mikroskop altında, steril mikro-cerrahi setle buz üzerinde çalışıldı. Aorta segmenti transfer medyumunu içeren temiz parafinli bir petri kabına alındı. Aorta, alevden geçirilip %70'lik alkolle yıkanmış steril toplu iğneler yardımıyla parafin bloğa tutturuldu. Disseksiyon mikroskobu altında, mikro doku makası ve ince uçlu bir pens yardımıyla, aortanın adventisya tabakası dışında kalan yağlar ve venöz yapılar temizlendi. Aorta boyuna disseke edildikten sonra kağıt biçiminde düzlemsel olarak açıldı ve toplu iğne yardımıyla dört ucundan parafin bloğa tutturuldu. Sonra steril bir bistüri yardımıyla aortanın dış kısmı kazındı ve böylece adventisya dokusu görsel olarak ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra aortanın iç kısmı pamuklu bir çubuk ile hafifçe sıyrıldı. Bu işlem birkaç kez tekrarlandı. Bu sayede aortanın lümenine bakan endotel ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Adventisya ve endotel katmanları aortadan uzaklaştırıldıktan sonra kalan doku transfer medyumunu ile bir çok defa yıkandı ve etrafı buzla kaplı steril transfer medyumuyla dolu 1.5 mL'lik eppendorf'a alındı. Zaman kaybedilmeden hücre kültürü ekim aşamasına geçildi.

3.4. Aorta Düz Kas Hücreleri Primer Kültürü

3.4.1. Gerekli Solüsyonlar

Hank's Dengeli Tuz Solüsyonu (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS)

HBSS solüsyonu (kalsiyum ve magnezyum içermeyen) 0.4 g/L potasyum klorid, 0.06 g/L potasyum fosfat, 8.0 g/L sodyum klorid, 0.04788 g/L sodyum fosfat, 1.0 g/L D-glukoz içermektedir.

Tripsin-EDTA (1X, 10X)

Solüsyon içerisinde standart şekilde % 0.05 (w/v) Tripsin ve 0.02% (w/v) EDTA bulunmaktadır.

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu

Solüsyon içerisinde standart şekilde 10.000 U penisilin, 10 mg streptomisin bulunmaktadır.

3.4.2. Primer Hücre Kültürü Besiyerinin (Medyum) Hazırlanması

Besiyeri olarak kullanılan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)'den her defasında 500 mL hazırlandı. Bunun için önce 425 mL medyum üzerine 50 mL fetal bovine serum (FBS) (%10) ve 5 mL (%1 v/v) penisilin-streptomisin eklendi. L-glutamin 0.584 g/L konsantrasyonda olacak şekilde ve HEPES 25 mM konsantrasyonda olacak şekilde 5.9625 g tartıldı ve her ikisi de 20'şer mL DMEM içinde çözülerek hazırlandı. L-glutamin ve HEPES steril filtrelerden geçirildi ve her birinden her 500 mL medyum içine 10'ar mL konuldu. Toplamda 500 mL'lik besiyeri elde edildi.

3.4.3. Primer Vasküler Düz Kas Hücre Kültürü

Hücrelerin Steril Kültür Kaplarına Aktarılması

Önceden transfer medyumunu ile dolu eppendorf içine alınmış aorta UV ile steril edilmiş kültür kabini içerisinde 15 mL'lik doku petrilere transfer edildi. Transfer medyumunu petriden pipet yardımıyla alındı. Aorta, steril bistüriler yardımıyla mekanik olarak çok küçük parçalara ayrıldı. Bu işlem hücre canlılığını korumak için çok hızlı bir biçimde gerçekleştirildi. EAS ile muameleye hazır hale getirilmiş olan hücreler üzerine, 37⁰C sıcaklığa sahip 4.0 mL EAS eklendi. Petri hafifçe çalkalandıktan sonra, etrafı parafilm ile sarıldı ve 37⁰C'lik etüve kaldırıldı. Etüvün içine yerleştirilmiş çalkalayıcı cihaz üzerinde 45 dakika inkübe edildi. Hücre ve dokuların tekrar bir araya toplanmalarını engellemek için petri her 10

dk.'lık periyotta hafifçe çalkalandı. İyice ayrılan ve dokudan büyük oranda bağımsızlaşan hücreler, steril kültür kabinde bu kez de 10 mL'lik plastik enjektöre çekilip 5-6 kez 14 µm'lik çelik uçlu kanülden geçirildi. Böylece düz kas hücreleri ikinci defa mekanik ayıştırmaya uğramış oldu. EAS içindeki kollajenaz ve elastaz enzimlerini dilüe etmek amacıyla, petriye EAS'ın 2 katı miktarda, 8 mL medyum eklendi. Hücre süspansiyonu 15 mL'lik steril plastik tüplere alındı ve 200 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Dipte kalan pellet 10 mL medyum ile tekrar resüspanse edildi. Tekrar santrifüj edilip, üstteki süpernatant atıldı. Böylece ortamda kalan enzimler (elastaz, kollajenaz) hücrelerden uzaklaştırıldı. Hücre pelletleri 3 mL DMEM ile tekrar resüspanse edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu içindeki medyumla beraber 12.5 cm²'lik steril kültür kaplarına aktarıldı. Steril kültür kabı hemen 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ içeren ve havası nemlendirilmiş (%90-98) olan inkübatöre yerleştirildi. Steril kültür kabı ilk 48 saatin ardından rutin olarak her gün invert kontrast mikroskop ile incelendi. Steril kültür kabında ilk hücreler tutunmuş olarak görüldüğünde, ortamdaki doku ve hücre artıklarını uzaklaştırmak amacıyla hücrelerin medyumunu 5 mL, 37°C sıcaklıktaki medyum ile değiştirildi. Medyum değiştirilmeden önce, hücre ve doku artıklarının uzaklaştırılması için hücreler, 37°C sıcaklıktaki 3 mL HBSS ile yıkandı. Medyumlar 48-96 saat aralıkları ile rutin olarak değiştirildi. Enfeksiyon gelişme riskine karşı, hücreler 2 günde bir kontrol edildi.

Hücre Kültürlerinin Pasaj Aşaması (Tripsinizasyon)

Hücreler %90-%95 yoğunluğa ulaştıktan sonra, hem morfolojilerini korumak hem de canlılıklarını yitirmemeleri amacıyla zaman kaybedilmeden pasajlandı. Pasajlanacak olan steril kültür kabındaki medyum alındıktan sonra, hücreler 37°C sıcaklıktaki 5 mL HBSS ile 3-5 dakika inkübe edildi ve hafifçe çalkalandı. Daha sonra HBSS aspire edilerek 1 mL (1X) tripsin-EDTA hücre kültür kabına eklendi ve 37°C'lik etüvde 5 dakika inkübe edildi. 10X konsantrasyonda tripsin-EDTA kullanıldığı zamanlarda, hücre duvarlarının zarar görmemesi amacıyla inkübasyon süresi en fazla 3 dakika olacak şekilde ayarlandı. Inkübasyon periyodu bitiminde steril kültür kabına 3-4 mL medyum eklendi ve

hafifçe çalkalandı. Hücreler 15 mL'lik steril plastik santrifüj tüpüne alınarak 200 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Dipteki pellet 1 mL medyum ile süspansiyon edildikten sonra süspansiyon 4-5 kez Pastör pipetinden geçirildi. 25 cm²'lik steril kültür kaplarına bölünen hücre süspansiyonlarının hacimleri 4 mL'ye tamamlanarak etüve kaldırıldı. 24 saat içinde medyumları değiştirildi. Daha sonra yoğunlukları %95-%98 oluncaya kadar her 48-96 saatte bir medyumları yenilendi.

Hücre Canlılığı Testi (Tripan-Blue Test)

Bu testte prensip ölü hücrelerin membranlarının mavi renge boyanırken, canlı hücrelerin boyanmamasıdır. Steril kültür kabındaki hücreleri tripsinize edildikten sonra santrifüj yapıp, pellet 3 mL medyum ile resüspansiyon edildi. Buradan alınan 100 µL hücre süspansiyonu, 100 µL % 0,5'lik tripan blue üzerine eklendi. Hücreler thoma lamına alındı ve mikroskopta 20X'lik büyütmede incelendi. Ölü hücrelerin membranı mavi renge boyanırken, canlı hücreler boyanmadı. Hücre sayımı için pellet üzerine 1 mL medyum eklendi. Bu süspansiyondan thoma lamına az bir miktar damlatıldı ve 5 farklı alandaki hücre sayısı sayılıp toplam sayı 5'e bölündü. Çıkan değer 10⁶ ile çarpılınca 1 mL'deki hücre sayısı elde edilmiş oldu.

3.5. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu

3.5.1. Hücrelerden İmmünohistokimya Preparatlarının Hazırlanması

Preparatların hazırlanacağı lamalar %70'lik alkolden geçirildi. Distile su ile yıkandıktan sonrada otoklavlandı. Steril lamalar üzerinde steril ortamda hidrofobik kalemle 2 alan işaretlendi. 25 cm²'lik steril kültür kabındaki hücreler tripsinize edilip, santrifüj sonrası dipte kalan pellete 2 mL medyum eklendi ve resüspansiyon edildi. İşaretli alanlara bu hücre süspansiyonundan 100 µL ekildi. Lamalar büyük steril petrilere konulup etüvde inkübe edildi.

Bir gün sonra petri içindeki preparatların medyumu değiştirildi. Hücreler tamamen lamlara tutunup, yüzeyi kapladıktan sonra hücre medyumu ortamdaki uzaklaştırılıp HBSS (Ca^{+2} - Mg^{+2} içermeyen) ile yıkandı. Steril PBS ile tekrar yıkanan lamlar oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar $-20^{\circ}C$ 'de muhafaza edildi. Preparat üzerinde tutunan hücre olup olmadığını belirlemek amacıyla, hemotoksilen eozin boyasıyla preparatların bir kısmı boyandı.

İmmünohistokimyasal analizler için preparatlar 4 grupta sınıflandırıldı.

1) VDKH'ni göstermek için α -aktin primer antikorunun 1/800 ve 1/1600'lük dilüsyonları çalışıldı.

2) Endotel hücrelerini göstermek için Von-Willebrand faktör primer antikorunun 1/500 ve 1/1000'lük dilüsyonları çalışıldı.

3) İzotip kontrolü için sekonder antikor olarak rat kaynaklı IgG2a'nın 1/800 ve 1/1600'lük dilüsyonları çalışıldı.

4) Normal boyama kontrolleri içinse PBS ile kontrol grubu çalışıldı.

3.5.2. Kullanılan Solüsyonlar

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

Tris Tamponlu Salin Stok Solüsyonu (Tris Buffered Saline, TBS, 10X)

TBS solüsyonu hazırlamak için 60.55 g Tris ve 87.66 g NaCl 800 mL distile suda çözüldü. Solüsyonun pH'sı HCl ile 7.4'e ayarlandı. Final hacim 1000 mL olarak distile su ile tamamlandı.

Tris Tamponlu Salin Stok Solüsyonu (Tris Buffered Saline, TBS, 1X)

TBS stok solüsyondan (10X) 100 ml alınıp 1L'ye tamamlanıp 10 kat dilüe hale getirildi.

3.5.3. İmmünohistokimyasal analiz

İmmünohistokimyasal analiz için izlenen protokol gösterilmektedir;

- Hazırlanan preparatlar aseton tanklarına konuldu ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
- Aseton tanklarından çıkarılan preparatlar 20 dakika oda ısısında kurutuldu.
- Preparatlar TBS ile 3 defa 5 dakika boyunca yıkandı.
- Preparatlar 5 dakika bloklama solüsyonuyla bloklandı.
- Preparatlar üzerine primer antikor damlatılıp 45 dakika beklendi.
- Preparatlar TBS ile 3 kez 5 dakika boyunca yıkandı.
- Preparatlar üzerine sekonder antikor eklenip 30 dakika beklendi.
- Preparatlar TBS ile 3 kez 5 dakika boyunca yıkandı.
- Sekonder antikora bağlanması için enzim (biotin- HRP kompleksi) verildi ve 30 dakika inkübe edildi.
- Enzime amino etil karbizol (AEC) substratı verilip, 3-5 dakika inkübe edildi.
- Preparatlar TBS ile yıkandı, kurutuldu ve kayser jelatin ile kapatılıp karanlıkta buzdolabında saklandı.
- Preparatlar mikroskop altında incelendikten sonra fotoğrafları çekildi.

3.6. Ölçüm Deneylerinde Kullanılan Kimyasallar ve İnhibitörler

3.6.1. Kullanılan İnhibitörler

Losartan

Toz halindeki losartan 4.6201 mg tartılıp 10 mL PBS içinde çözüldü (10^{-3} M). 500 μ L'lik aliyutalara bölünüp -20°C 'de saklandı. İnhibisyon ortamında 10^{-5} M olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

Difenileniyodonyum (DPI)

Toz halindeki 10 mg NAD(P)H oksidaz enzim kompleksi inhibitörü, dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. 50 μ L'lik aliyutalara bölünüp -20°C 'de saklandı. İnhibisyon ortamında 10 μ M olacak şekilde dilüe edildi.

Rotenon

Toz halindeki 3.944 mg rotenon 10 mL kloroform içinde çözüldü. -20°C 'de saklandı. İnhibisyon ortamında 100 μ M olacak şekilde dilüe edildi.

İndometazin

Toz halindeki 8.95 mg indometazin 5 mL distile su içinde çözüldü. -20°C 'de saklandı. İnhibisyon ortamında 10 μ M olacak şekilde dilüe edildi.

Oksipurinol

Toz halindeki 3.8 mg oksipurinol, 5 mL 0.5 N NaOH içinde çözüldü. -20°C 'de saklandı. İnhibisyon ortamında 100 μ M olacak şekilde dilüe edildi.

L-NAME

Toz halindeki 6.742 mg L-NAME, 5 mL distile su içinde çözüldü. -20°C 'de saklandı. İnhibisyon ortamında 100 μ M olacak şekilde dilüe edildi.

3.6.2. Enzim Substratının Hazırlanışı

NADPH

Toz halindeki NADPH'tan 0.8334 mg tartılıp 1 mL distile suda çözüldü ve 1 mL ölçüm tamponuna 100 µL pipetlenerek final konsantrasyonun 100 µmol/L olması sağlandı. Her deney aşamasında deneyden hemen önce taze hazırlandı ve +4°C'de saklandı.

3.6.3. Ölçüm Deneylerinde Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı

Anjiyotensin II

Toz halindeki 1 mg Ang II 9.5 mL distile suda çözüldü (1×10^{-4} M) ve 100 µL'lik alikuatlara bölünüp, -20 °C'de saklandı. Kullanım esnasında 1 mL serum içermeyen medyuma 100 nM konsantrasyon için 10 µL eklendi.

Ferrisitokrom c

Toz halindeki ferrisitokrom c'den 50 mg alındı ve 1 mL'de çözüldü. 250 µL'lik alikuatlara alınıp, -20 °C'de saklandı. İşlemler karanlık ortamda gerçekleştirildi. 1 mL ölçüm ortamına 10 µL pipetlendi ve final konsantrasyon olan 40 µM elde edildi.

Resazurin

Stok solüsyon için 3 mg resazurin alınıp 10 mL distile su içinde çözüldü. Ölçüm ortamına 1 mL için 100 µl pipetlendi ve final konsantrasyon 0.03 mg/ml oldu.

HEPES Modifiye Tyrode's Solüsyonu

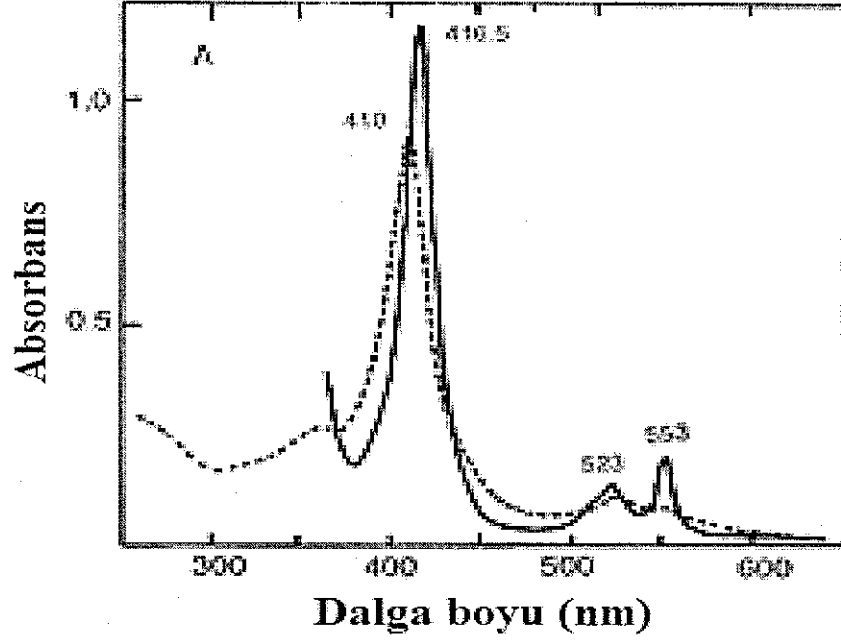
Stok solüsyon için toz halindeki kalsiyum klorid iki sulu ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)'nun 92.61 mg'ı, KCl'nin 67.84 mg'ı, NaCl'nin 2802.19 mg'ı, NaH_2PO_4 'ün 15.117 mg'ı, MgCl_2 'nin 34.865 mg'ı, glukoz'un 353.192 mg'ı, HEPES'in 834.05 mg'ı tartılıp her biri 50'şer cc distile suda çözüldü ve stok halinde + 4°C'de saklandı. Her ölçümden önce hepsinden eşit miktarlarda alınıp

karıştırıldı ve daha sonra pH 7.4'e getirilip, 37°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildi ve hücre deneylerinde kullanıldı

3.6.4. Süperoksit Anyonu Ölçüm Metodları

Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi

Süperoksit anyonu miktarlarının sitokrom c redüksiyonu ile ölçümü Görlach ve arkadaşlarının referans ettiği metoda göre gerçekleştirilmiştir (19). 12-kuyucuklu plaklarda büyütülen hücreler 24 saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra; tüm kuyucuklar HEPES modifiye Tyrode's solüsyonu (pH: 7.4, 1.8 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.6 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.36 mM NaH_2PO_4 , 0.49 mM MgCl_2 , 5.6 mM glukoz ve 10 mmol/L HEPES içermektedir) ile 2-3 kez yıkandı. Ardından bu kuyucuklara HEPES modifiye Tyrode's solüsyonu 1 mL hacimde olacak şekilde eklendi. Ang II ve inhibitörleri uygun konsantrasyonlarında ve inkübasyon sürelerinde ortama eklenip, sitokrom c'nin ışıkta redüksiyonunu engellemek amacıyla karanlık ortamda 10 µL sitokrom c (40 µM), tüm kuyucuklara konuldu. Tüm ölçümlerde NADPH 100 µmol/L konsantrasyonda olacak şekilde sitokrom c ile beraber pipetlendi. Yarım saat içinde tüm kuyucuklardaki solüsyonların 300-600 nm dalga boylarında absorbans spektrumu taramaları yapıldı ve 550 nm dalga boyundaki absorbansları alındı. Her ölçümde dalga boyu spektrumunda sitokrom c redüksiyon piklerine bakılarak deneyler doğrulandı (şekil 3.6.1). Hem substrat (NADPH) kullanılmış kontrol hücrelerinden hem de Ang II uygulanmış hücrelerden elde edilen tüm değerler, substrat kullanılmadan sitokrom c ile süperoksit anyonu ölçümü yapılan kontrol hücrelerinin (körü) verdiği absorbans değerlerinden çıkartıldı. Her kuyucuğun protein miktarlarının ölçümü için plaklar, ölçümden hemen sonra buz üzerinde bekletildiler. End-point ölçümleri yapıldı. Çıkan protein miktarlarına göre de absorbans değerleri hesaplandı.



Şekil 3.6.1. Sitokrom c'ye ait özgün absorbans spektrumu. Sitokrom c 525 ve 550 nm dalga boylarında tipik pikler verir. Bu piklerin varlığı sitokrom c'nin ortamda redükte olduğunu göstermektedir (www.soc.nii.ac.jp/sbiochem/jb/128-3).

Resazurin İle Florometrik Ölçüm

Resazurin yöntemi ile florometrik olarak süperoksit anyonlarının ölçümü, daha önce Fang ve arkadaşları (21) tarafından sığı nötrofillerinde respiratuvar patlama sonucu oluşan süperoksit anyonlarının miktarını tespit etmek için kullanılmıştır. Resazurin (7-Hidroksi-3H-fenoksazin-3-10-okside) okside formda mavi renklidir. İndirgendiğinde pembe floresan formu olan resorufine dönüşür. Resazurin elektron alıcısı olarak davranır ve NAD(P)H oksidaz için moleküler oksijen ile yarışır. Vasküler dokulardaki elektronlar NAD(P)H'dan resazurine transfer edilir. Resazurin'de floresans veren formu olan resorufin'e dönüşür (20, 21). Biz burada ferrisitokrom c redüksiyonu yöntemindeki değerleri desteklemesi amacıyla resazurin florometrik yöntemini çalıştık. 12-kuyucuklu plaklarda yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, serumsuz medyumda 24 saat inkübe edildi. Her kuyucuğa 1 mL serumsuz medyum konulduktan sonra Ang II ve inhibitörler uygun konsantrasyonlarında ve inkübasyon sürelerinde ortama eklendi. Tüm ölçümlerde, NADPH 100 µmol/L konsantrasyonda olacak şekilde resazurin (0.03 mg/mL) ile aynı anda kuyucuklara pipetlenerek, 1 saat boyunca kinetik ölçümler

yapıldı. Belirli aralıklarda ölçümler kontrol edildi Perkin Elmer Luminescence spektrofotometre LS 50 B cihazında, eksitasyon dalga boyu olarak 544 nm, emisyon dalga boyu olarak 584 nm kullanıldı. Aktivite değerleri için 0-1 saat arası florometrik farklar alındı. Elde edilen florometrik değerler her kuyucuğun protein konsantrasyonuna göre hesaplandı.

3.7 Protein Miktarının Tayin Edilmesi

3.7.1. Bradford Protein Ölçüm Yönteminin Prensibi

Yöntemin prensibi (102), 'Coomassie Brilliant Blue G-250' boyasının üç formu arasındaki dengeye dayanmaktadır. Kuvvetli asidik ortamda bu boya iki defa protonlanmış, çok stabil ve kırmızı renkli bir formda bulunur. Boya proteine bağlandıktan sonra protonlarını kaybederek, stabil ve mavi renkli bir forma dönüşür. Mavi rengin 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunması Bradford protein ölçüm yönteminin prensibini oluşturmaktadır.

3.7.2. Hücre Lizatının Hazırlanması

Düz kas hücreleri 12-kuyucuklu plaklara pasajlandı ve %90-95 yoğunluğa ulaşıldıktan sonra ölçüm deneyleri gerçekleştirildi. Ardından hücrelerden lizatlar hazırlandı.

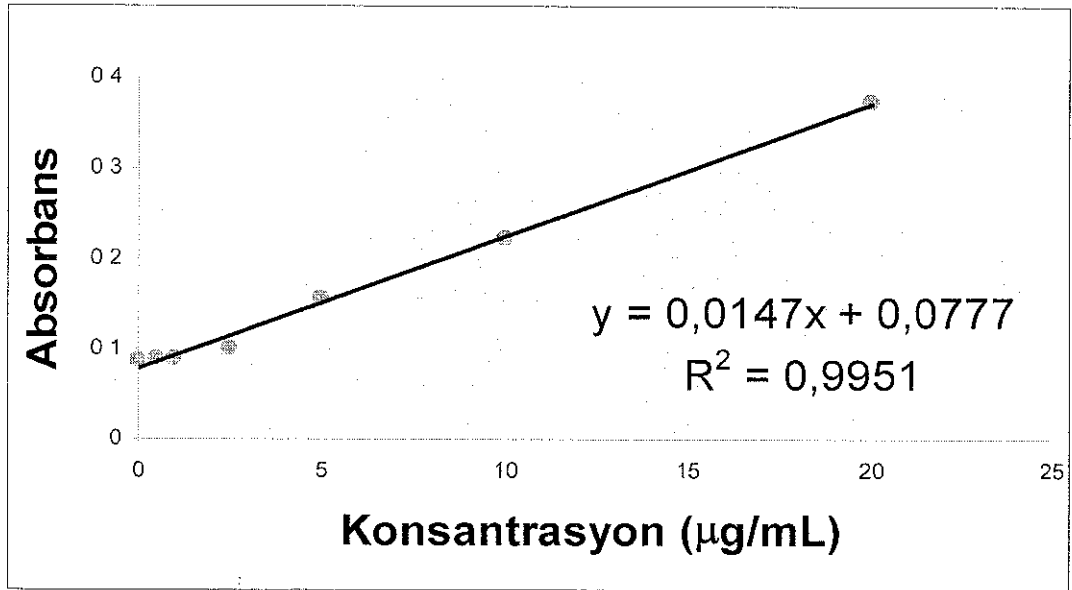
1. Ölçüm deneyleri bitmiş her plak, protein lizatı hazırlanmadan önce buz üzerinde bekletildi.
2. Ardından plaktaki her kuyucuk 1 mL 1X PBS ile 2 kez yıkanıp, hücrelerin üzerine 200 µL buz soğukluğunda ayrışma tamponu eklendi.
3. Hücreler kuyucuklardan özel hücre kazıyıcısı yardımıyla kazınarak plastik tüplere toplandı ve ultrasonik homojenizatörde 5 saniye süre ile sonike edildi.

4. Sonike edilen hücreleri santrifüjde +4⁰C'de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, temiz süpernatant kısmı protein tayininde kullanılmak üzere -20⁰C'de saklandı

3.7.3. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafiğinin Hazırlanması

Stok solüsyon şeklinde hazır olan 0.2 mg/mL BSA (Bovine Serum Albumin)'den 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0 µg/mL konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı Protein ölçümü için kit içinde hazır olarak verilen MA, MB ve MC solüsyonları 25:24:1 oranında karıştırılarak çalışma reaktifi (working reagent, WR) hazırlandı.

Çalışma esnasında 96-kuyucuklu plaklara 100 µL standart ve 100 µl WR pipetlenerek karıştırıldı ve 37⁰C'de 2 saat karanlık ortamda inkübe edildikten sonra standartlar kendi körüne karşı 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu Tüm protein standartlarından çift çalışma yapıp ortalamalar alındı ve standart grafiği çizildi (şekil 3.7.1.). Sonuçlar µg/mL protein miktarı olarak saptandı.



Şekil 3.7.1: Protein Standart Grafiği

3.7.4. Numunelerin Protein Miktarlarının Tayini

Önceden hazırlanıp -20°C 'de bekletilen lizatlar protein tayininde kullanıldı. Her bir lizattan $5\ \mu\text{L}$ alındıktan sonra 48-kuyucuklu plaklara konulup, $95\ \mu\text{L}$ distile su ile üzerileri tamamlandı ve bu $100\ \mu\text{L}$ 'lik numune üzerine $100\ \mu\text{L}$ WR pipetlendi. Ardından 37°C 'de karanlık ortamda 2 saat inkübasyon yapıp, numuneler çift kontrollü olarak spektrofotometrede $562\ \text{nm}$ 'de okundu. Standart grafiği kullanılarak, $\mu\text{g/mL}$ protein değerleri elde edildi.

3.8. İstatistiksel Analiz

Farklı parametrelerin değerlendirilmesi amacıyla, PC ortamında, Microsoft Windows XP işletim sisteminde, SPSS programı versiyon 13.0 kullanılarak, parametrik testlerden eşleştirilmiş örnekler arası T test'i uygulandı.

BULGULAR

4.1. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu

Rat aortasından izole edildikten sonra primer kültürü yapılan hücrelerin, düz kas hücresi olduğunu göstermek için immünohistokimya tekniği kullanıldı. Ratlardan daha önce anlatılan teknikle izole edilip, primer hücre kültürü haline getirilen vasküler düz kas hücrelerine, henüz ilk pasajlarında immünohistokimya tekniği uygulandı. Hücreler ilk tripsinizasyondan sonra lamalar üzerinde üretildi ve immünohistokimyasal karakterizasyon için gerekli preparatlar elde edildi.

İmmünohistokimya preparatları 4 gruba ayrıldı.

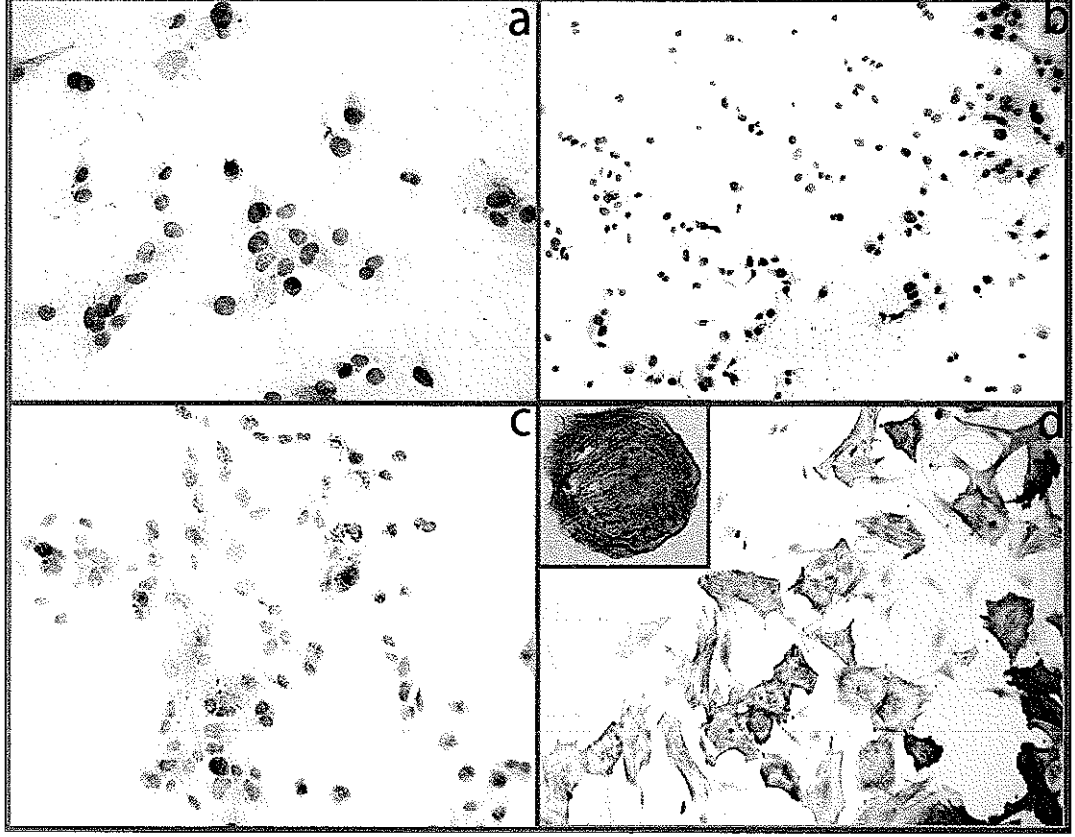
1. Kontrol Grubu: Bu grup, kontrol amacıyla kullanıldı. Primer antikora spesifikliği bu gruplarda boyanma olmaması belirlemektedir (şekil 4.1.1.-a).

2. İzotip Kontrolü: Bu grup, boyanmaların sekonder antikordan kaynaklanıp kaynaklanmadığını göstermek amacıyla kullanıldı. Preparatlarda boyanmanın olmaması, sekonder antikordan kaynaklanan boyanmanın olmadığını, boyanmaların primer antikora spesifik olduğunu göstermektedir (şekil 4.1.1.-b)

3. Von-Willebrand Faktör grubu: Bu grupta, izole edildikten sonra kültürü yapılan hücrelerde, endotel hücresi bulunup bulunmadığını göstermek amacıyla, Von-Willebrand Faktör primer antikoru kullanılıp hücreler boyandı. Preparatlarda kırmızı boyalı alanların olmayışı, izole edilen hücreler içerisinde endotel hücrelerinin bulunmadığını göstermektedir (şekil 4.1.1.-c).

4. α -Aktin Grubu: Bu grupta, vasküler düz kas hücrelerini gösterebilmek amacıyla düz kas hücrelerinin α -aktin'leri, VDKH'ne spesifik α -aktin primer antikoru ile boyandı. Kırmızı boyalı alanlar α -aktin'e spesifik düz kas hücrelerini

ve (şekil 4.1.1-d) primer kültürü yapılan hücrelerin düz kas hücresi olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1.1. Vasküler düz kas hücre kültürlerinin immünohistokimyasal karakterizasyonu a, kontrol grubunu; b, izotip kontrolünü; c, endotel hücrelerinin Von-Willebrand Faktör boyamalarını; d, vasküler düz kas hücrelerinin α aktin'le boyanmasını göstermektedir. Boyalı alanlar kırmızı renkte görülmektedir

4.2. Ang II ile Uyarılan VDKH'de Süre Deneyleri

Bu aşamadan sonra gerçekleştirilen tüm deneyler, VDKH'den yapılan primer hücre kültürlerinde, yaklaşık 2-15 pasajlara gelindiğinde ve her bir kuyucukta en az %90-%95 yoğunluğa ulaşıldığında gerçekleştirildi. Vasküler düz kas hücrelerinde Ang II'nin süperoksit anyonu üretimine etkisi iki farklı yöntemle irdelendi Hücreleri deneylere hazırlamak amacıyla, 12-kuyucuklu plaklarda 24 saat serumsuz medyumla inkübasyon uygulandı. Süre deneylerinde bu

aşamalardan sonra, belirlenen kuyucuklara zamanı geldikçe sırasıyla 24, 4, 1. saatlerde ve 30 dakikada, Ang II inkübasyonları uygulandı. İnkübasyonların ardından iki farklı yöntemle süperoksit anyonu miktarları ölçüldü.

4.2.1. Süre Deneyleri için Ang II ile Uyarılan VDKH'de, Süperoksit Anyonu Miktarlarının Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi ile İrdelenmesi

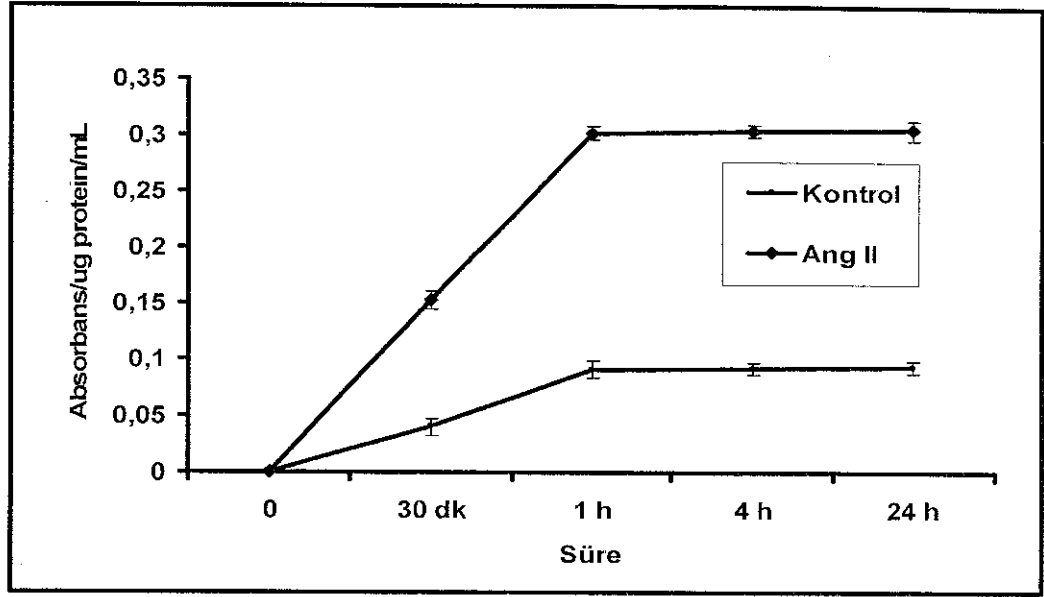
Sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile yapılan süre deneylerinin sonuçları, tablo 4.2.1 tablo 4.2.2. ve şekil 4.2.1 'de gösterilmektedir. Belirlenen sürelerde Ang II (100 nmol/L) uygulandıktan sonra, substrat olarak NADPH (100 µmol/L) ve ardından sitokrom c (40 µM) aynı anda ortama eklenip, süperoksit anyonu miktarları ölçüldü. Veriler protein miktarlarına göre hesaplanarak düzeltildi.

Tablo 4.2.1. VDKH kontrol grubunda, sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile yapılan süre deneylerine ait veriler. NADPH'la (100 µmol/L) yapılan inkübasyonların ardından $X \pm SD$ şeklinde süperoksit anyonu miktarları gösterilmektedir (n = 10, p<0.05)

Kontrol Grubu	Abs/µg protein/mL
0 dk. (kör)	0.000 ± 0.000
30 dk.	0.040 ± 0.007
1 saat	0.091 ± 0.007
4 saat	0.092 ± 0.005
24 saat	0.093 ± 0.005

Tablo 4.2.2. Ang II uyarımının ardından sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile yapılan süre deneylerine ait veriler. 30. dk, 1, 4 ve 24. saatlerde, Ang II (100 nmol/L) ve NADPH (100 µM) varlığında $X \pm SD$ halinde süperoksit anyonu miktarları gösterilmektedir (n = 10, p<0.05)

Ang II Grubu	Abs/µg protein/mL
0 dk. (kör)	0.000 ± 0.000
30 dk.	0.153 ± 0.008
1 saat	0.302 ± 0.006
4 saat	0.304 ± 0.005
24 saat	0.305 ± 0.008



Şekil 4.2.1. Ang II ile inkübe edilen ve kontrol olarak kullanılan hücrelerde, sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile süre deneyleri. 30 dk, 1, 4 ve 24. saatlerde Ang II uygulandı. Hem kontrol hem de Ang II ile inkübe edilen hücrelerde NADPH (100 µM) kullanıldı (n = 10).

Şekil 4.2.1.'de, hem NADPH eklenmiş kontrol hücrelerinde hem de Ang II uygulanan hücrelerde süperoksit anyonu miktarları, 0. dk'dan 1 saat inkübasyon süresine ulaşıldığında maksimuma çıktı. Kontrol hücreleri 1. saat değeri (0.040 ± 0.007) ile Ang II uygulanan hücelere ait 1. saat değeri (0.153 ± 0.008) arasında yaklaşık 4 katlık bir artış gözlenmektedir. 4. ve 24. saatlerdeki süperoksit anyonu miktarları bu değerlere göre devamlılık gösterdi. Şekile ait istatistik verileri de tablo 4.2.3.'de ve 4.2.4.'de gösterilmektedir.

Tablo 4.2.3. Kontrol hücrelerinde sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile yapılan süre deneylerine ait istatistiksel veriler (n = 10, p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi).

Kontrol	t	p
0 dk – 30 dk	-1,112	.000
30 dk – 1 saat	-9.347	.000
30 dk – 4 saat	-21.469	.000
30 dk – 24 saat	-15.697	.000
1 saat - 4 saat	-1.767	.111
1 saat - 24 saat	-3.218	.010
4 saat - 24 saat	-0.408	.693

Kontrol hücrelerindeki t ve p anlamlılık verilerine bakıldığında, kontrol hücreleri arasında 1 - 4 saatler ($p = 0.111$) ve 4 - 24 ($p = 0.010$) saatler arası süperoksit anyonu miktarlarının değerleri arasında anlamlı istatistiksel fark görülmedi (tablo 4.2.3.).

Tablo 4.2.4. Süre deneylerinde, Ang II uygulanmış hücrelerde sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile elde edilen değerlere ait istatistiksel veriler ($n = 10$, $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi).

Ang II	t	p
0 dk – 30 dk	-25,232	.000
30 dk – 1 saat	-62.741	000
30 dk – 4 saat	-104.477	.000
30 dk – 24 saat	-75.664	000
1 saat - 4 saat	-2.268	.050
1 saat - 24 saat	-2.139	061
4 saat - 24 saat	-1.146	.281

Tablo 4.2.4’de, Ang II uygulanmış hücrelerden elde edilen süperoksit anyonu değerleri arasındaki p anlamlılık verilerine bakıldığında, 1 - 4. saatler ($p = 0.050$), 1 - 24. saatler ($p = 0.061$) ve 4 - 24. saatler ($p = 0.281$) arasında anlamlılık gözlenmemektedir ($p > 0.05$). Diğer veriler arası farkları anlamlıdır ($p < 0.05$)

4.2.2. Süre Deneyleri için Ang II ile Uyarılan VDKH’de Süperoksit Anyonu Miktarlarının Resazurin ile Florometrik Olarak Ölçülmesi

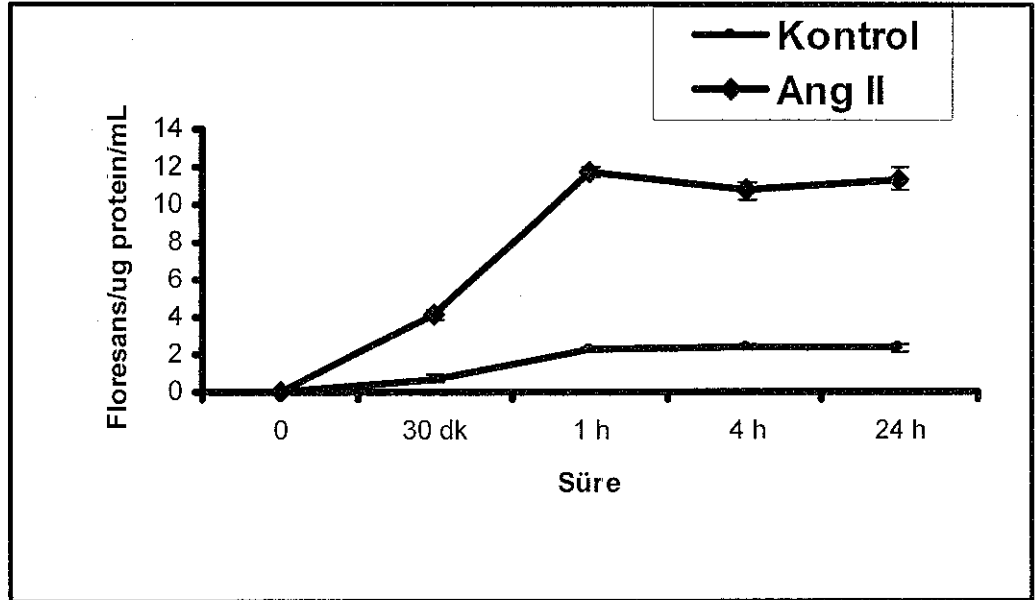
Süperoksit anyonu miktarlarını ölçmek için resazurin yöntemi ile yapılan süre deneylerinin sonuçları, tablo 4.2.5. tablo 4.2.6. ve şekil 4.2.2’de verilmektedir. Belirlenen sürelerde Ang II (100 nmol/L) uygulandıktan sonra, substrat olarak NADPH (100 μ mol/L) ve ardından resazurin (0.03 mg/mL) aynı anda kuyucuklara eklendi ve süperoksit anyonu miktarları ölçüldü

Tablo 4.2.5. Resazurin yöntemi ile yapılan süre deneylerinde kontrol grubuna ait veriler. NADPH (100 $\mu\text{mol/L}$) kullanıldı. Değerler $X \pm \text{SD}$ olarak gösterilmektedir (n = 10 p<0.05)

Kontrol Grubu	Floresans/ μg protein/mL
0 dk. (kör)	0.000 \pm 0.000
30 dk.	0.719 \pm 0.200
1 saat	2.313 \pm 0.147
4 saat	2.402 \pm 0.154
24 saat	2.380 \pm 0.200

Tablo 4.2.6. Süre deneyleri için Ang II ile uyarılan VDKH'de, resazurin yöntemiyle elde edilen veriler. Deneylerde 30 dk ve 1, 4, 24 saatlerde Ang II (100 nM) inkübasyonu uygulandı ve NADPH (100 $\mu\text{mol/L}$) kullanıldı. Değerler $X \pm \text{SD}$ olarak gösterilmektedir (n = 10, p<0.05)

Ang II Grubu	Floresans/ μg protein/mL
0 dk. (kör)	0.000 \pm 0.000
30 dk.	4.129 \pm 0.239
1 saat	11.688 \pm 0.250
4 saat	10.749 \pm 0.475
24 saat	11.400 \pm 0.570



Şekil 4.2.2. Ang II ile inkübe edilen hücrelerde, resazurin yöntemiyle yapılan süre deneyleri NADPH (100 $\mu\text{mol/L}$) kullanıldı. Ang II inkübasyonları 30 dk, 1, 4, 24 saatlerde yapıldı (n=10).

Şekil 4.2.2.'ye göre, hem NADPH eklenmiş kontrol hücrelerinde hem de Ang II uygulanan hücrelerde süperoksit anyon miktarları, 0. dakika süperoksit anyon miktarlarına göre, 1. saate ulaşıldığında maksimum bir değere ulaştı. Kontrol hücreleri 1. saat floresans değeri olan 2.313 ± 0.147 ve Ang II uygulanmış hücrelerdeki floresans değeri olan 11.688 ± 0.250 arasında yaklaşık 4.5 katlık bir fark gözlenmektedir. Hem kontrol hem de Ang II uygulanan hücrelerde ise, 4 ve 24 saat değerlerinde süperoksit anyonları miktarlarındaki artışın devamlılığı gözlemlendi. Sadece Ang II uygulanmış hücrelerde 4 saat süperoksit anyonu miktarları, 1. saat süperoksit anyonu miktarlarına göre biraz daha düşük bulundu.

Sonuçlara ait istatistik verileri de tablo 4.2.7. ve tablo 4.2.8.'de gösterilmektedir

Tablo 4.2.7. Resazurin ile yapılan süre deneylerinde kontrol hücrelerinden elde edilen sonuçlara ait istatistiksel veriler (n = 10. p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi)

Kontrol	t	p
30 dk – 1 saat	-35.404	.000
30 dk – 4 saat	-452.916	.000
30 dk – 24 saat	-113.618	.000
1 saat - 4 saat	-1.600	.144
1 saat - 24 saat	-1.340	.213
4 saat - 24 saat	-1.813	.103

Tablo 4.2.7 'de kontrol hücrelerine ait değerler arasındaki p anlamlılık verilerine bakıldığında, 1. saat ile 4 (p = 0.144) ve 24. saat (p = 0.213) değerleri ve 4. saat ile 24. saat (p = 0.103) değerleri arasında anlamlı fark görülmedi

Tablo 4.2.8. Süre deneylerinde Ang II ile inkübe edilen hücrelerde yapılan süre deneylerine ait istatistiksel veriler (n = 10 p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi).

Ang II	t	p
30 dk – 1 saat	-103.607	.000
30 dk – 4 saat	-53.331	.000
30 dk – 24 saat	-42.205	.000
1 saat - 4 saat	-8.781	.000
1 saat - 24 saat	-2.920	.017
4 saat - 24 saat	-8.269	.000

Tablo 4.2.8'e göre tüm veriler arası farklar anlamlı bulundu (p<0.05)

4.3. Ang II Konsantrasyon Deneyleri

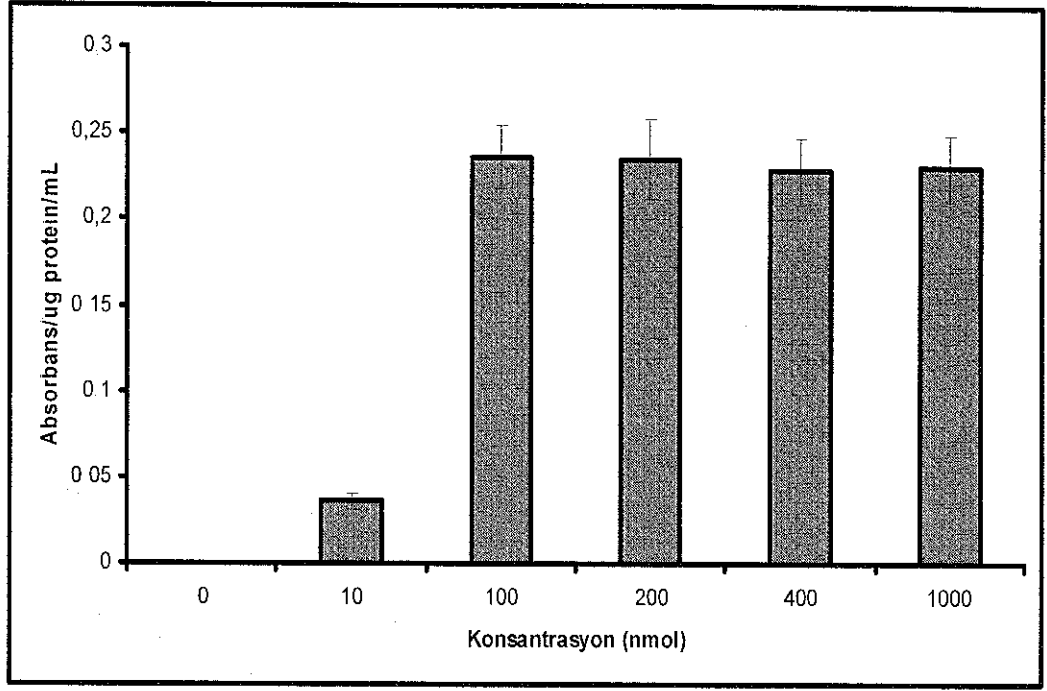
Farklı Ang II konsantrasyonlarında VDKH'deki süperoksit anyonu miktarlarını irdelemek amacıyla konsantrasyon deneyleri yapıldı

4.3.1. Konsantrasyon Deneyleri için Ang II ile Uyarılan VDKH'de Süperoksit Anyonu Miktarlarının Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi ile Ölçülmesi

Serumsuz ortamda 24 saat inkübe edilen VDKH'ne 1 saat süresince farklı konsantrasyonlarda (10, 100, 200, 400, 1000 nM) Ang II uygulandı ve sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile ölçümler yapıldı (tablo 4.3.1. ve şekil 4.3.1.).

Tablo 4.3.1. Farklı konsantrasyonlarda Ang II uygulanmış hücrelerde, sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile elde edilen değerler Değerler $X \pm SD$ şeklinde gösterildi (n = 10. p<0.05).

Konsantrasyon (nM)	Abs/ μ g protein/mL
0	0.000 \pm 0.000
10	0.036 \pm 0.005
100	0.236 \pm 0.017
200	0.235 \pm 0.023
400	0.228 \pm 0.019
1000	0.230 \pm 0.019



Şekil 4.3.1. VDKH’de farklı Ang II konsantrasyonlarında sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile saptanan süperoksit anyonu miktarları. Sırasıyla 10, 100, 200, 400, 1000 nmol/L konsantrasyonlarda Ang II uygulanan hücrelerde, substrat olarak NADPH (100 µM) kullanıldı ve süperoksit anyonu miktarları sitokrom c (40 µM) redüksiyonu yöntemi kullanılarak ölçüldü (n = 10)

Şekil 4.3.1.’de farklı Ang II konsantrasyonlarından elde edilen süperoksit anyonu miktarları irdelendiğinde, en anlamlı fark 10 nM konsantrasyonda Ang II uygulanan hücrelerden elde edilen veri 0.036 ± 0.005 ile 100 nM konsantrasyonda Ang II uygulanmış hücrelerden elde edilen veri 0.236 ± 0.017 arasındadır. Süperoksit anyonu miktarlarında, 100 nM konsantrasyonda Ang II uygulandığında maksimum bir değer yakalandı (0.236 ± 0.017) ve süperoksit anyonu seviyelerinde elde edilen bu veri 200 nM konsantrasyonda 0.235 ± 0.023 , 400 nM konsantrasyonda 0.228 ± 0.019 ve 1000 nM konsantrasyonda 0.230 ± 0.019 değerleri şeklinde süreklilik gösterdi. NADPH varlığında elde edilen değer, bazal seviye olarak alındı ve diğer değerlerden çıkarılarak, 0 olarak kabul edildi (köt) Şekil 4.3.1.’e ait istatistik verileri tablo 4.3.2.’de gösterilmektedir.

Tablo 4.3.2. Ang II konsantrasyon deneylerinde sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile yapılan ölçümlere ait istatistiksel veriler. K: konsantrasyon miktarları (n = 10 p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi)

Konsantrasyon	t	p
K10 – K100	-35.806	000
K10 – K200	-29.579	000
K10 – K400	-37.954	000
K10 – K1000	-39.278	000
K100 – K200	-0.217	.810
K100 – K400	-2.869	.018
K100 – K1000	-10.726	000
K200 – K400	-3.831	.004
K200 – K1000	-8.797	000
K400 – K1000	-5.191	001

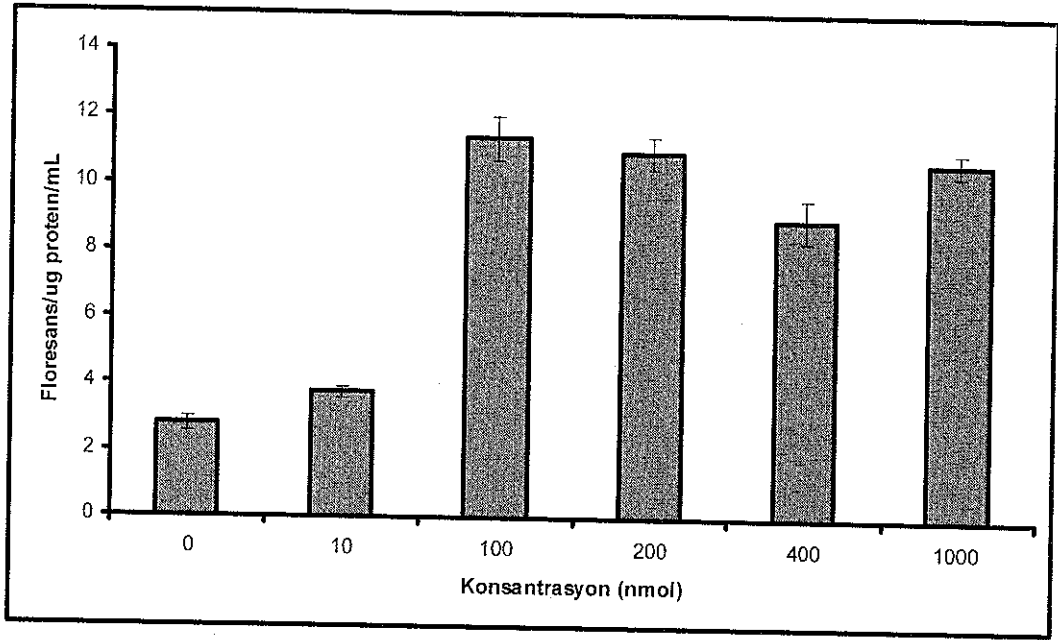
İstatistiksel anlamlılık verilerine bakıldığında, 100-200 nM konsantrasyonlar arası p değeri (p = 0.810) hariç, tüm veriler arası farklar anlamlı bulunmuştur (p<0.05)

4.3.2. Konsantrasyon Deneyleri için Ang II ile Uyarılan VDKH'de Süperoksit Anyonu Miktarlarının Resazurin ile Florometrik Olarak Ölçülmesi

VDKH'ne 1 saat süresince farklı konsantrasyonlarda Ang II uygulandı ve resazurin yöntemi ile ölçümler yapıldı. (tablo 4.3.3 ve şekil 4.3.2.)

Tablo 4.3.3. Farklı konsantrasyonlarda Ang II uygulanmış hücrelerde, resazurin yöntemiyle saptanan süperoksit anyonu miktarları Ang II 10, 100, 200, 400, 1000 nM konsantrasyonlarda uygulandı Değerler $X \pm SD$ şeklinde gösterilmektedir (n = 10, p<0.05).

Konsantrasyon (nM)	Floresans/ μg protein/mL
0	2.786 \pm 0.237
10	3.755 \pm 0.150
100	11.367 \pm 0.652
200	10.955 \pm 0.487
400	8.958 \pm 0.642
1000	10.663 \pm 0.351



Şekil 4.3.2. Farklı konsantrasyonlarda Ang II inkübasyonunun süperoksit anyonu üretimine etkisinin resazurin ile florometrik olarak irdelenmesi. Sırasıyla 10, 100, 200, 400, 1000 nmol/L konsantrasyonlarda Ang II uygulandı. Substrat olarak NADPH (100 µmol/L) kullanıldı ve süperoksit anyonu miktarları resazurin (0.03 mg/mL) ile florometrik olarak ölçüldü (n = 10).

Şekil 4.3.2.'de farklı Ang II konsantrasyonlarında elde edilen süperoksit anyonu miktarlarına bakıldığında, süperoksit anyonu miktarlarında, 100 nM konsantrasyonda Ang II uygulandığında maksimum bir değer yakalandı (11.367 ± 0.652) ve süperoksit anyonu seviyelerinde elde edilen bu veri 200 nM konsantrasyonda 10.955 ± 0.487 , 400 nM konsantrasyonda 8.958 ± 0.642 ve 1000 nM konsantrasyonda 10.663 ± 0.351 değerleri şeklinde süreklilik gösterdi. Kinetik olarak yapılan ölçümlerde NADPH varlığında da bazal süperoksit anyonu seviyeleri 2.786 ± 0.237 elde edildi. Şekil 4.3.2.'ye ait istatistiksel anlamlılık verileri ($p < 0.05$) tablo 4.3.4 'de gösterilmektedir.

Tablo 4.3.4. Farklı konsantrasyonlarda Ang II uygulanmış hücrelerden elde edilen süper oksit anyonu miktarlarına ait istatistiksel veriler. K: konsantrasyon miktarları (n = 10. p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi)

Konsantrasyon	t	p
K10 – K100	-41.076	.000
K10 – K200	-51.414	.000
K10 – K400	-28.813	.000
K10 – K1000	-75.240	.000
K100 – K200	-1.899	.900
K100 – K400	-21.932	.000
K100 – K1000	-4.740	.001
K200 – K400	-9.558	.000
K200 – K1000	-2.077	.068
K400 – K1000	-15.310	.000

İstatistiksel anlamlılık verilerine (p değerleri) bakıldığında (tablo 4.3.4.), 200 - 1000 nM konsantrasyonda Ang II uygulanan hücreler arasındaki değerlere ait veri (p = 0.068) hariç, tüm veriler arası farklar anlamlı bulundu (p<0.05).

4.4. Ang II AT₁ Reseptör Antagonisti Losartan (Los) ve NAD(P)H Oksidaz Enzim Kompleksi İnhibitörü Difenileniyodonyum (DPI) ile Yapılan İnhibisyon Deneyleri

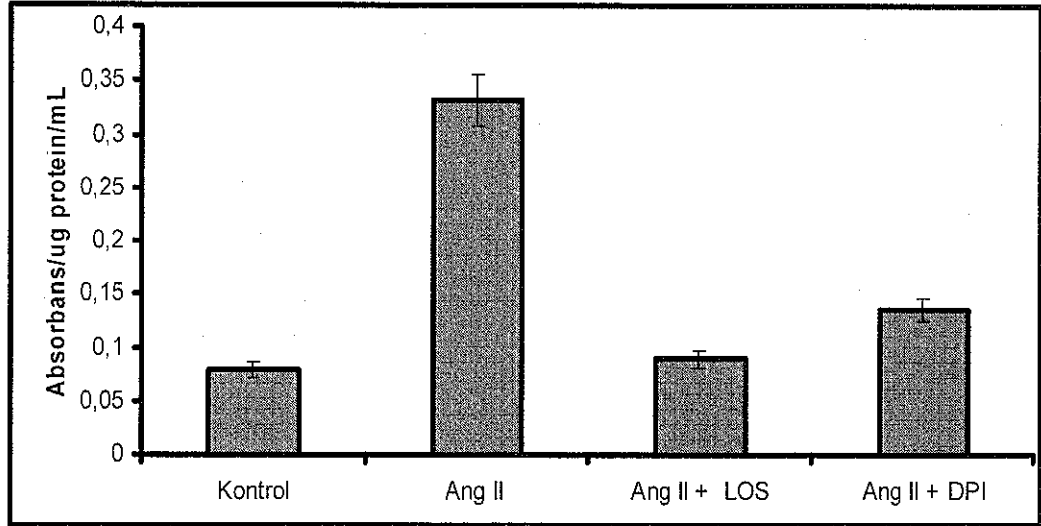
Ang II ve NAD(P)H oksidaz enzim kompleksinin (NOX) vasküler düz kas hücrelerindeki süper oksit anyonu miktarlarına ne derece etkileri olduğunu irdelemek amacıyla, Ang II AT₁ reseptör antagonisti olan Los ve NOX inhibitörü olan DPI ile vasküler düz kas hücrelerinde iki farklı yöntemle inhibisyon deneyleri yapıldı

4.4.1. Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Los ve DPI'nın Etkisinin Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi ile İrdelenmesi

12-kuyucuklu plaklarda uygun yoğunluğa ulaşan VDKH, 24 saat serumsuz medyunda inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklara 1 saatlik Ang II (100 nM) inkübasyonu uygulandı. Los (10^{-5} M) ve DPI (10 μ M) ile 30'ar dakikalık inkübasyonlardan sonra, NADPH (100 μ M) ve sit c (40 μ M) eklenerek end-point ölçümleri yapıldı (tablo 4.4.1 ve şekil 4.4.1.).

Tablo 4.4.1. Ang II varlığında Los ve DPI'nın etkisinin sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile irdelenmesinin ardından elde edilen süperoksit anyonu miktarlarına ait veriler. Los 10^{-5} M, DPI 10 μ M konsantrasyonlarda 30 dk inkübe edildi. Değerler $X \pm SD$ şeklinde gösterildi (n = 10, p<0.05)

Gruplar	Abs/ μ g protein/mL
Kontrol	0.079 \pm 0.006
Ang II	0.332 \pm 0.024
Ang II + Los	0.089 \pm 0.008
Ang II + DPI	0.136 \pm 0.010



Şekil 4.4.1. VDKH'de Ang II varlığında Los ve DPI'nın süperoksit anyonu miktarlarına etkisinin sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile irdelenmesi. Los 10^{-5} M ve DPI 10 μ M konsantrasyonda 30 dk inkübe edildiler. Ang II 1 saat, 100 nM konsantrasyonda inkübe edildi (n = 10)

Şekil 4.4.1.'e göre kontrol hücrelerimizde, ortalama olarak 0.079 ± 0.006 absorbans değeri elde edilirken, Ang II + Los grubunda bu değere yakın bir değer

(0.089 ± 0.008) elde edildi. Ang II + DPI grubunda ise kontrol grubuna göre daha yüksek bir absorbans değeri elde edilmesi (0.136 ± 0.010), NOX enzimidaki inhibisyonun tam olarak gerçekleşmediğini ortaya koydu. Ancak Ang II uyarımı yapılan gruba göre süperoksit anyonu miktarının (0.332 ± 0.024) oldukça düştüğü gözlenmektedir. Şekil 4.4.1.'e ait istatistiksel veriler tablo 4.4.2'de gösterilmektedir.

Tablo 4.4.2. Ang II ile inkübe edilen VDKH'de, Los ve DPI ile inhibisyonla elde edilen değerlere ait istatistiksel veriler K: kontrol (n = 10, p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi).

Grup Karşılaştırmaları	t	p
K - Ang II	-43.734	.000
K - (Ang II + Los)	-11.506	.000
K - (Ang II + DPI)	-41.720	.000
Ang II - (Ang II + Los)	47.738	.000
Ang II - (Ang II + DPI)	41.893	.000
(Ang II + Los) - (Ang II + DPI)	-44.588	.000

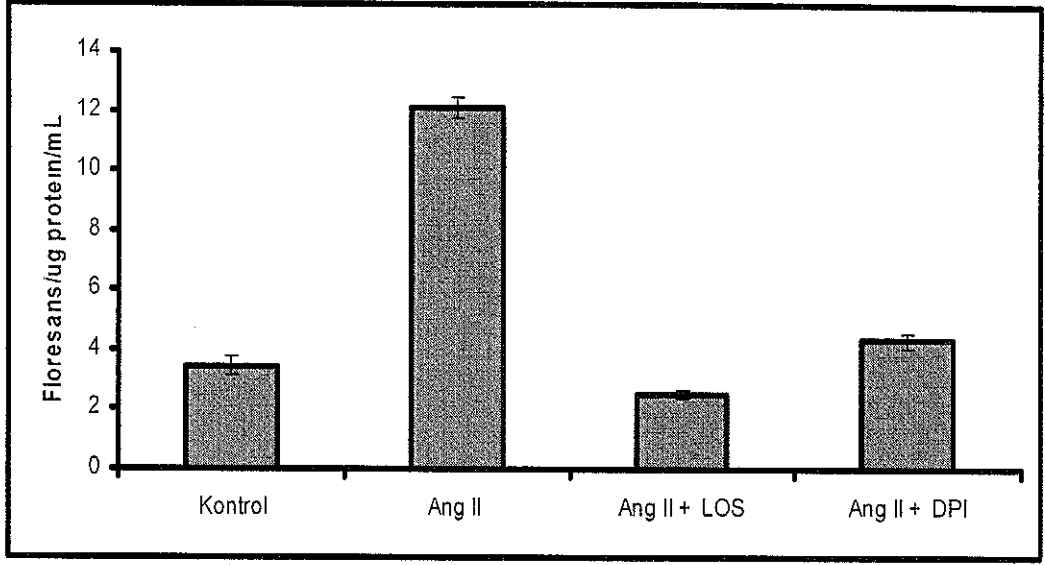
Tüm veriler arası farklar istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (p<0.05).

4.4.2. Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Los ve DPI Etkisinin Resazurin ile Florometrik Olarak İrdelenmesi

Ang II ile inkübe edilen VDKH'de Losartan ve DPI ile, resazurin yöntemi kullanılarak inhibisyon deneyleri yapıldı (tablo 4.4.3. ve şekil 4.4.2.).

Tablo 4.4.3. Ang II uyarımı sonrası Los ve DPI'nın etkisinin resazurin yöntemi ile irdelenmesine ait veriler Los 10^{-5} M ve DPI 10 μ M konsantrasyonda, 30 dk, NADPH 100 μ M kullanıldı. Değerler $X \pm SD$ şeklinde gösterilmektedir (n = 10, p<0.05).

Gruplar	Floresans/ μ g protein/mL
Kontrol	3.450 ± 0.297
Ang II	12.126 ± 0.356
Ang II + Los	2.542 ± 0.139
Ang II + DPI	4.307 ± 0.276



Şekil 4.4.2. Ang II inkübasyonuna bırakılan VDKH'deki süperoksit anyonu miktarlarına Los ve DPI'nın etkisinin resazürin yöntemi ile irdelenmesi. Los 10^{-5} M ve DPI 10μ M konsantrasyonda, 30 dk, NADPH 100μ M kullanıldı (n = 10)

Şekil 4.4.2.'ye göre hem DPI hem de Los ile inhibisyonlar gözlemlendi. Kontrol hücre grubundaki ortalama floresans değeri 3.450 ± 0.297 , deney grupları ile kıyaslandığında; Ang II + Los uygulanan deney grubundan elde edilen 2.542 ± 0.139 floresans değeri tam inhibisyonu göstermektedir. Ang II + DPI uygulanan gruptan elde edilen floresans değeri (4.307 ± 0.276) tam inhibisyonu göstermemektedir. Ancak, Ang II ile stimüle edilen hücrelerdeki floresans değerine (12.126 ± 0.356) göre de bir hayli düşüş göstermiştir. Şekil 4.4.2.'ye ait veriler arasındaki istatistiksel analiz sonuçları tablo 4.4.4 'de gösterilmektedir

Tablo 4.4.4. Ang II ile inkübe edilen VDKH'de, Los ve DPI ile inhibisyonlarla elde edilen verilerin istatistiksel analizi. K: kontrol (n = 10, p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi)

Gruplar	t	p
K - Ang II	-181.713	.000
K - (Ang II + Los)	-12.429	.000
K - (Ang II + DPI)	-10.898	.000
Ang II - (Ang II + Los)	108.279	.000
Ang II - (Ang II + DPI)	110.366	.000
(Ang II + Los) - (Ang II + DPI)	-34.615	.000

Tüm veriler arası farklar istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

4.5. Ang II İnkübasyonu Sonrasında VDKH'de Süperoksit Anyonu Kaynağı Olan Farklı Sistem ve Enzim İnhibitörleri ile İlgili Deneyler

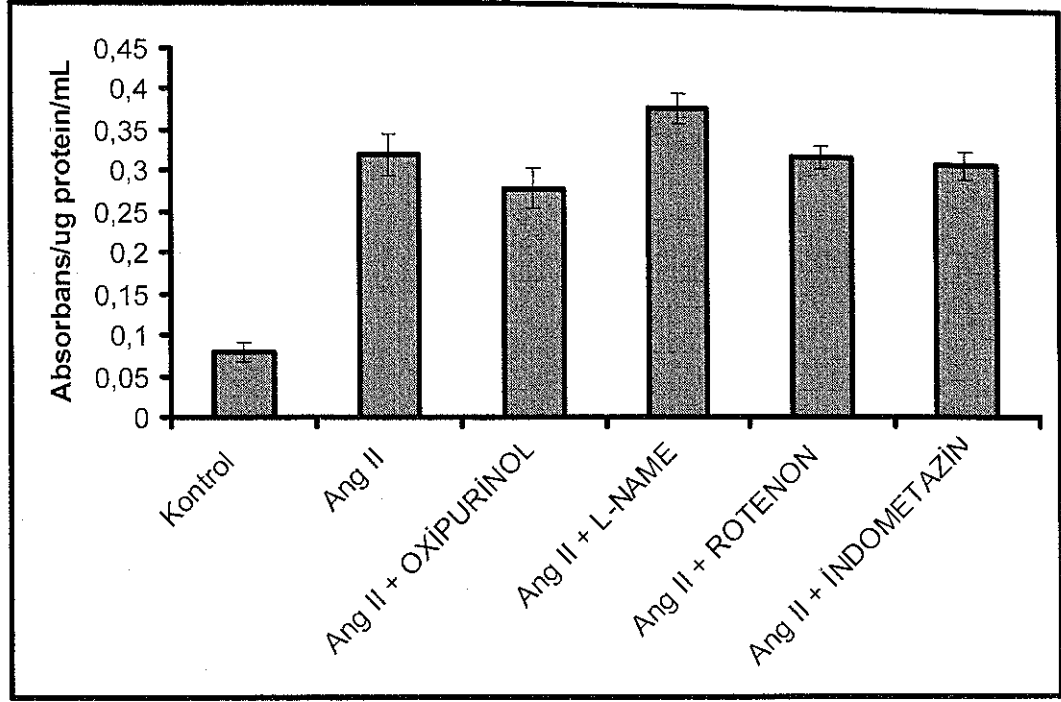
Farklı sistem ve enzimlere ait inhibitörlerin VDKH'nin ürettiği süperoksit anyonu miktarlarına etkilerinin irdelenmesi amacıyla, mitokondriyal respiratuvar zinciri rotenon, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri indometazin, ksantin oksidaz enzimi oksipurinol, NOS enzimi L-NAME ile inhibe edildiler.

4.5.1. Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Rotenon, İndometazin, Oksipurinol ve L-NAME'in Etkilerinin Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi ile İrdelenmesi

24 saat boyunca serumsuz medyumda inkübe edilen VDKH bulunan kuyucuklara 1 saatlik Ang II (100 nM) inkübasyonu uygulandı. Rotenon (100 μ M), indometazin (10 μ M), oksipurinol (100 μ M) ve L-NAME (100 μ M) ile 30'ar dakikalık inkübasyonlardan sonra sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile ölçümler yapıldı (tablo 4.5.1. ve şekil 4.5.1).

Tablo 4.5.1. VDKH'de Ang II inkübasyonu sonrası, farklı sistem ve enzim inhibitörlerinin süperoksit anyonu seviyelerine etkisinin sitokrom c redüksiyon yöntemi ile irdelenmesine ait veriler Rotenon (ROT, 100 μ M), indometazin (İNDO, 10 μ M), oksipurinol (OXF, 100 μ M) ve L-NAME (100 μ M) ile 30'ar dakikalık inkübasyonlar yapıldı. Değerler $X \pm SD$ şeklinde gösterilmektedir ($n = 10$, $p < 0.05$)

Gruplar	Abs/ μ g protein/mL
Kontrol	0.079 \pm 0.011
Ang II	0.320 \pm 0.025
Ang II + OXP	0.278 \pm 0.024
Ang II + L-NAME	0.372 \pm 0.019
Ang II + ROT	0.319 \pm 0.014
Ang II + İNDO	0.312 \pm 0.017



Şekil 4.5.1. Ang II ile inkübe edilen VDKH'de farklı sistem ve enzim inhibitörlerinin süperoksit anyonu miktarlarına etkisinin sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile irdelenmesi. Rotenon (100 µM), indometazin (10 µM), oksipurinol (100 µM) ve L-NAME (100 µM) ile 30'ar dakikalık inkübasyonlar yapıldı. Ang II 100 nM konsantrasyonda, 1 saat inkübe edildi (n = 10).

Şekil 4.5.1.'i irdelediğimizde; Ang II uyarımı sonrasında sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile ortalama absorbans değeri 0.320 ± 0.025 elde edilirken, Ang II + oksipurinol uygulanan grupta 0.278 ± 0.024 değeri elde edildi. İstatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş gözlenmesine rağmen, kontrol grubuna (0.079 ± 0.011) yaklaşılamamıştır. Benzer bulgular L-NAME, rotenon ve indometazin ile yakalanmış olsa da, kıyaslandığında en anlamlı düşüş oksipurinol ile elde edilmiştir. Ang II + L-NAME ile 0.377 ± 0.019 , Ang II + rotenon ile 0.319 ± 0.014 , Ang II + indometazin ile 0.312 ± 0.017 absorbans değerleri yakalanmıştır. Şekil 4.5.1.'e ait değerler arasındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili teste ait veriler tablo 4.5.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 4.5.2. Şekil 4.5.1.'deki değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili p değerlerine ait istatistiksel veriler OXP: oksipurinol, ROT: rotenon, İNDO: indometazin (n =10, p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi).

Gruplar	t	p
Ang II - (Ang II + OXP)	25.827	.000
Ang II - (Ang II + L-NAME)	-28.987	.000
Ang II - (Ang II + ROT)	0.278	.788
Ang II - (Ang II + İNDO)	2.848	.019

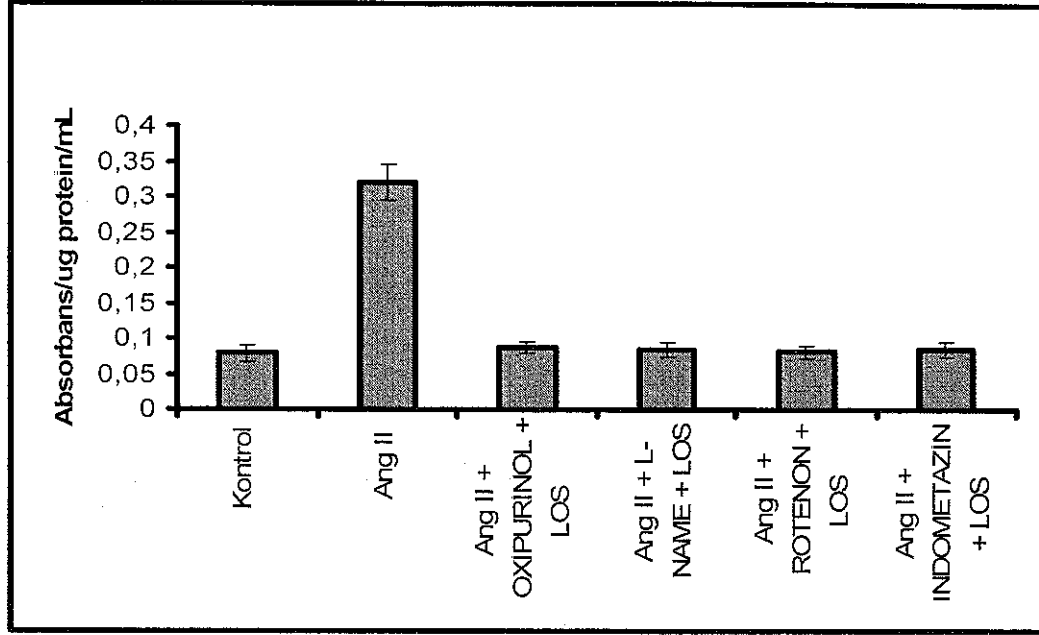
İstatistik verileri (p değerleri) kıyaslandığında, Ang II ve rotenon ile yapılan deneyden elde edilen ortalama süperoksit anyonu miktarları arasında istatistiksel açıdan anlamlılık (p = 0.788) bulunamazken, diğer veriler arasındaki farklar anlamlı bulundu (p<0.05)(tablo 4.5.2.).

4.5.2. Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Rotenon, İndometazin, Oksipurinol ve L-NAME ile Birlikte Los'un Etkilerinin Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi ile İrdelenmesi

VDKH'de farklı sistem ve enzim inhibitörleri [rotenon (100 µM), indometazin (10 µM), oksipurinol (100 µM), L-NAME (100 µM)] ve Los (10⁻⁵ M) beraber inkübe edilerek inhibisyon deneyleri yapıldı Sit c (40 µM) ve NADPH (100 µM) aynı anda ortama eklendi (tablo 4.5.3. ve şekil 4.5.2.).

Tablo 4.5.3. Ang II ile inkübe edilen VDKH'deki süperoksit anyonu miktarlarına farklı enzim ve sistem inhibitörleri ile birlikte Los'un etkilerinin sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile irdelenmesine ait veriler. Değerler X ± SD şeklinde gösterilmektedir (n = 10, p<0.05)

Gruplar	Abs/µg protein/ml
Kontrol	0.079 ± 0.011
Ang II	0.320 ± 0.025
Ang II + OXP + Los	0.086 ± 0.007
Ang II + L-NAME + Los	0.084 ± 0.003
Ang II + ROT + Los	0.081 ± 0.003
Ang II + İNDO + Los	0.085 ± 0.005



Şekil 4.5.2. Ang II ile inkübe edilen VDKH'deki süperoksit anyonu miktarlarına rotenon, indometazin, oksipürinol ve L-NAME ile birlikte Los'un etkilerinin sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile irdelenmesi. Rotenon (100 µM), indometazin (10 µM), oksipürinol (100 µM), L-NAME (100 µM) ve Los (10⁻⁵ M) 30 dakika inkübe edildi (n = 10)

Süperoksit anyonu kaynakları olan farklı sistem ve enzimlere ait inhibitörlerle yapılan deneylerde ortama Los'da eklendi ve Ang II stimülasyonu sonrası elde edilen süperoksit anyonu değerlerinde belirgin inhibisyonlar gözlemlendi. Oksipürinol + Los ile $0,086 \pm 0,007$, L-NAME + Los ile $0,084 \pm 0,003$, rotenon + Los ile $0,081 \pm 0,003$ ve indometazin + Los ile $0,085 \pm 0,005$ değerleri elde edildi ve kontrol hücreleri absorbans değerine ($0,079 \pm 0,011$) çok yaklaşıldı (şekil 4.5.2.) Şekil 4.5.2'ye ait değerler arasındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili teste ait veriler tablo 4.5.4.'de gösterilmektedir.

Tablo 4.5.4. Şekil 4.5.2.'deki değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığı ile ilgili veriler OXP: oksipürinol, ROT: rotenon, İNDO: indometazin, Los: losartan (n = 10, p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi).

Gruplar	t	p
Ang II - (Ang II + OXP + Los)	41.983	.000
AngII - (Ang II + L-NAME + Los)	38.939	.000
Ang II - (Ang II + ROT + Los)	40.360	.000
Ang II - (Ang II + İNDO + Los)	36.752	.000

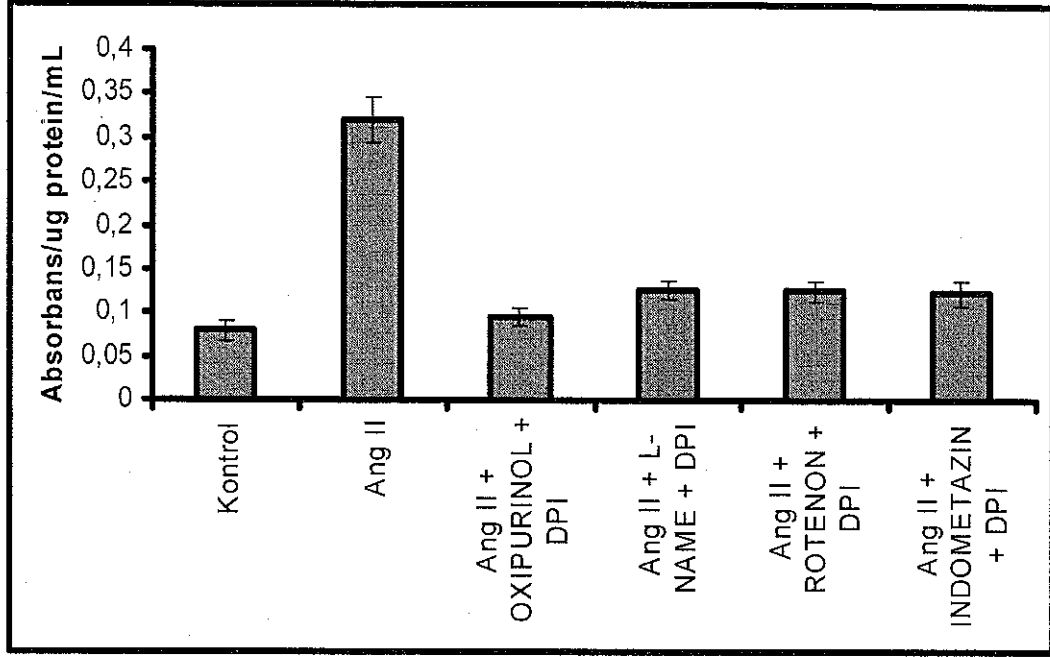
Verilere ait p değerleri kıyaslandığında, sadece Ang II uygulanan hücreler ile Ang II ve inhibitörlerin kullanıldığı hücelere ait, süperoksit anyonlarının miktarlarıyla ilgili veriler arasındaki tüm farklar anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (tablo 4.5.4)

4.5.3. Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Rotenon, İndometazin, Oksipurinol ve L-NAME ile Birlikte DPI'nın Etkilerinin Sitokrom c Redüksiyonu Yöntemi ile İrdelenmesi

VDKH'de farklı sistem ve enzim inhibitörleri ile DPI'nın süperoksit anyonu miktarlarına ortak etkisini irdelemek amacıyla 1 saatlik Ang II (100 nM) inkübasyonunun ardından rotenon (100 μ M), indometazin (10 μ M), oksipurinol (100 μ M), L-NAME (100 μ M) ve DPI (10 μ M) beraber inkübe edilerek inhibisyon deneyleri yapıldı (tablo 4.5.5. ve şekil 4.5.3.).

Tablo 4.5.5. VDKH'de Ang II ile inkübasyon sonrası süperoksit anyonu miktarlarına rotenon (ROT), indometazin (İNDO), oksipurinol (OXP) ve L-NAME ile birlikte DPI'nın etkilerine ait değerler. Değerler $X \pm SD$ şeklinde gösterilmektedir ($n = 10$, $p < 0.05$).

Gruplar	Abs/ μ g protein/mL
Kontrol	0.079 \pm 0.011
Ang II	0.320 \pm 0.025
Ang II + OXP + DPI	0.095 \pm 0.010
Ang II + L-NAME + DPI	0.127 \pm 0.009
Ang II + ROT + DPI	0.126 \pm 0.008
Ang II + İNDO + DPI	0.120 \pm 0.008



Şekil 4.5.3. Ang II ile inkübe edilen VDKH'deki süperoksit anyonu miktarlarına rotenon, indometazin, oksipurinol ve L-NAME ile birlikte DPI'nın etkilerinin sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile irdelenmesi. Rotenon (100 µM), indometazin (10 µM), oksipurinol (100 µM), L-NAME (100 µM) ve DPI (10 µM) ile parantez içinde belirtilen konsantrasyonlarda 30'ar dakikalık inhibisyonlar yapıldı. Ölçümler Sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile gerçekleştirildi (n = 10).

Süperoksit anyonu kaynakları olan farklı sistem ve enzimlere ait inhibitörlerle yapılan deneylerde ortama DPI'da eklendikten sonra, Ang II stimülasyonunun ardından elde edilen süperoksit anyonu değerlerinde belirgin inhibisyonlar gözlemlendi. Ancak tam inhibisyonlar gözlenmedi. Rotenon + DPI ile $0,126 \pm 0,008$, indometazin + DPI ile $0,123 \pm 0,008$, oksipurinol + DPI ile $0,095 \pm 0,010$, L-NAME + DPI ile $0,127 \pm 0,009$ değerleri elde edildi ve kontrol hücrelerinden elde edilen verilere ($0,079 \pm 0,011$) yaklaşıldı (şekil 4.5.3.). Sadece oksipurinol ve DPI ile birlikte yapılan inhibisyon diğerlerine nazaran daha belirgindi. Şekil 4.5.3.'e ait değerler arasındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili veriler tablo 4.5.6 'da gösterilmektedir.

Tablo 4.5.6. Şekil 4.5.3.'deki değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili teste ait veriler OXP: oksipurinol, ROT: rotenon, İNDO: indometazin, DPI: difenilenyodonyum (n = 10, p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi).

Gruplar	t	p
Ang II – (Ang II + OXP + DPI)	48.363	.000
AngII – (Ang II + L-NAME + DPI)	39.072	.000
Ang II - (Ang II + ROT + DPI)	34.418	.000
Ang II - (Ang II + İNDO + DPI)	35.743	.000

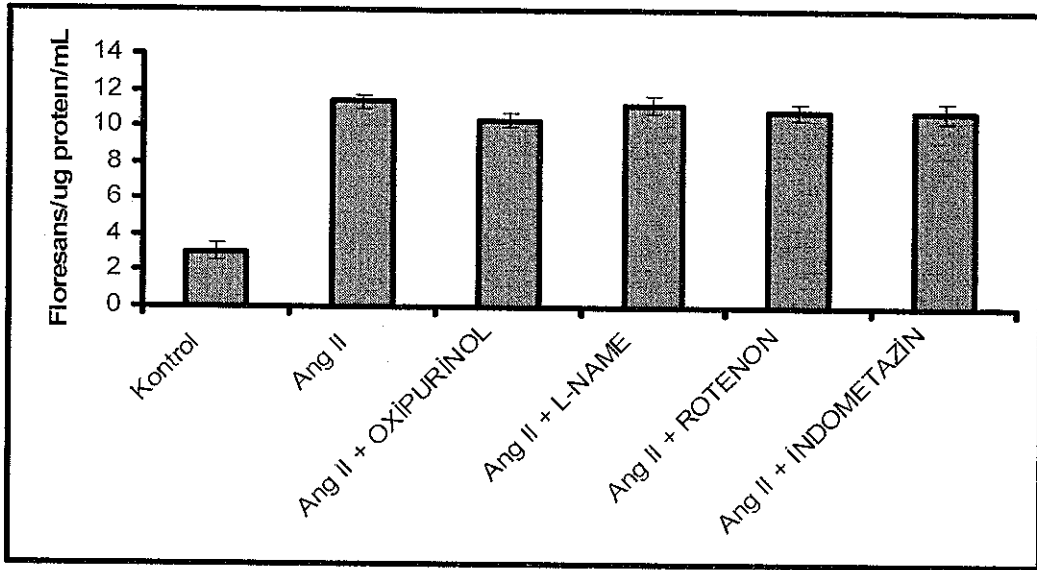
Tüm veriler arasındaki farklar anlamlı bulundu (p<0.05)(tablo 4.5.6.)

4.5.4. Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Rotenon, İndometazin, Oksipurinol ve L-NAME'in Etkilerinin Resazurin Yöntemi ile İrdelenmesi

Farklı sistem ve enzimlerin süperoksit anyonu miktarlarına etkisini irdellemek amacıyla rotenon (100 µM), indometazin (10 µM), oksipurinol (100 µM) ve L-NAME (100 µM) ile 30'ar dakikalık inkübasyonlardan sonra resazurin yöntemi ile ölçümler yapıldı (tablo 4.5.7. ve şekil 4.5.4.)

Tablo 4.5.7. Ang II inkübasyonu sonrası, farklı sistem ve enzim inhibitörlerinin süperoksit anyonu seviyelerine etkisinin resazurin yöntemi ile irdelenmesine ait veriler Rotenon (ROT, 100 µM), indometazin (İNDO, 10 µM), oksipurinol (OXP, 100 µM) ve L-NAME (100 µM) ile 30'ar dakikalık inkübasyonlar yapıldı. Değerler X ± SD şeklinde gösterilmektedir (n = 10, p<0.05).

Gruplar	Floresans/µg protein/mL
Kontrol	3.046 ± 0.501
Ang II	11.374 ± 0.376
Ang II + OXP	10.392 ± 0.404
Ang II + L-NAME	11.225 ± 0.507
Ang II + ROT	10.880 ± 0.381
Ang II + İNDO	10.871 ± 0.500



Şekil 4.5.4. Ang II ile inkübe edilen VDKH'de farklı sistem ve enzim inhibitörlerinin etkilerinin resazürin yöntemi ile irdelenmesi. Rotenon (100 µM), indometazin (10 µM), oksipürinol (100 µM) ve L-NAME (100 µM) ile 30'ar dakikalık inkübasyonlardan sonra resazürin (0.03 mg/mL) yöntemiyle ölçümler yapıldı (n = 10)

Şekil 4.5.4.'te; resazürin yöntemi ile Ang II uyarımı sonrasında ölçülen ortalama floresans değeri 11.374 ± 0.376 elde edilirken, Ang II + oksipürinol uygulanan grupta 10.392 ± 0.404 değeri bulundu. Bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlıdır. Ancak kontrol grubuna (3.046 ± 0.501) yaklaşılamamıştır. Benzer bulgular L-NAME, rotenon ve indometazin ile yakalanmış olsa da, kıyaslandığında en anlamlı düşüş oksipürinol ile elde edilmiştir. Ang II + L-NAME ile 11.225 ± 0.507 , Ang II + rotenon ile 10.880 ± 0.381 , Ang II + indometazin ile 10.871 ± 0.500 floresans değerleri yakalanmıştır (şekil 4.5.4). Şekil 4.5.4'e ait istatistiksel değerlendirme tablo 4.5.8.'de gösterilmektedir.

Tablo 4.5.8. Şekil 4.5.4.'deki değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili veriler. OXP: oksipürinol, ROT: rotenon, İNDO: indometazin (n = 10, p < 0.05 değerleri anlamlı kabul edildi)

Gruplar	t	p
Ang II - (Ang II + OXP)	16.952	.000
Ang II - (Ang II + L-NAME)	2.463	.036
Ang II - (Ang II + ROT)	38.847	.000
Ang II - (Ang II + İNDO)	33.117	.000

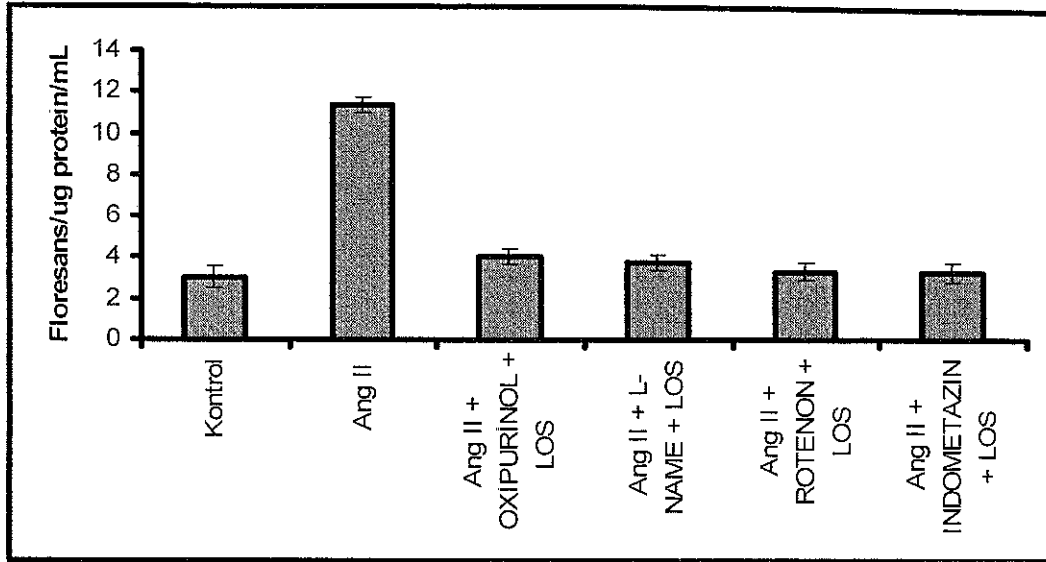
İstatistik verileri (p değerleri) kıyaslandığında tüm verileri arasındaki farklar anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (tablo 4.5.4.).

4.5.5. Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Rotenon, İndometazin, Oksipurinol ve L-NAME ile Birlikte Los'un Etkilerinin Resazurin Yöntemiyle İrdelenmesi

Sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile yapılan deneylere ait verileri desteklemek amacıyla, VDKH'de 1 saatlik Ang II (100 nM) inkübasyonunun ardından farklı sistem ve enzim inhibitörleri [rotenon (100 μ M), indometazin (10 μ M), oksipurinol (100 μ M), L-NAME (100 μ M)] ve Los (10^{-5} M) beraber inkübe edilerek inhibisyon deneyleri yapıldı (tablo 4.5.9. ve şekil 4.5.5.).

Tablo 4.5.9. Ang II stimülasyonu sonrası süperoksit anyonu miktarlarına rotenon (ROT), indometazin (İNDO), oksipurinol (OXP) ve L-NAME ile birlikte Los'un etkilerine ait veriler. Değerler $X \pm SD$ şeklinde gösterilmektedir (n =: 10, $p < 0.05$)

Gruplar	Floresans/ μ g protein/mL
Kontrol	3.046 \pm 0.500
Ang II	11.374 \pm 0.376
Ang II + OXP + Los	4.050 \pm 0.412
Ang II + L-NAME + Los	3.779 \pm 0.390
Ang II + ROT + Los	3.322 \pm 0.425
Ang II + İNDO + Los	3.299 \pm 0.480



Şekil 4.5.5. Ang II İle inkübe edilen VDKH'deki süperoksit anyonu miktarlarına rotenon, indometazin, oksipürinol ve L-NAME ile birlikte Lositanın etkilerinin rezazürin yöntemi ile irdelenmesi. Rotenon (100 µM), indometazin (10 µM), oksipürinol (100 µM), L-NAME (100 µM) ve Los (10⁻⁵ M) birlikte 30 dakika süreyle inkübe edildiler (n = 10)

Süperoksit anyonu kaynakları olan farklı sistem ve enzimlere ait inhibitörlerle yapılan deneylerde ortama Los'da eklendi. Ang II stimülasyonunun ardından elde edilen süperoksit anyonu değerlerinde, oksipürinol + Los ile 4.050 ± 0.412, L-NAME + Los ile 3.779 ± 0.390, rotenon + Los ile 3.322 ± 0.425 ve indometazin + Los ile 3.299 ± 0.480 değerleri şeklinde belirgin inhibisyonlar gözlemlendi ve kontrol hücrelerinden elde edilen floresans değerine (0.079 ± 0.011) çok yakın değerler elde edildi (Şekil 4.5.5.). Şekil 4.5.5'e ait değerler ile ilgili istatistiksel veriler Tablo 4.5.10'da gösterilmektedir.

Tablo 4.5.10. Şekil 4.5.5'deki değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili veriler. OXP: oksipürinol, ROT: rotenon, İNDO: indometazin, Los: losartan (n = 10, p < 0.05 değerleri anlamlı kabul edildi)

Gruplar	t	p
Ang II - (Ang II + OXP + Los)	149.156	.000
Ang II - (Ang II + L-NAME + Los)	161.999	.000
Ang II - (Ang II + ROT + Los)	150.084	.000
Ang II - (Ang II + İNDO + Los)	171.400	.000

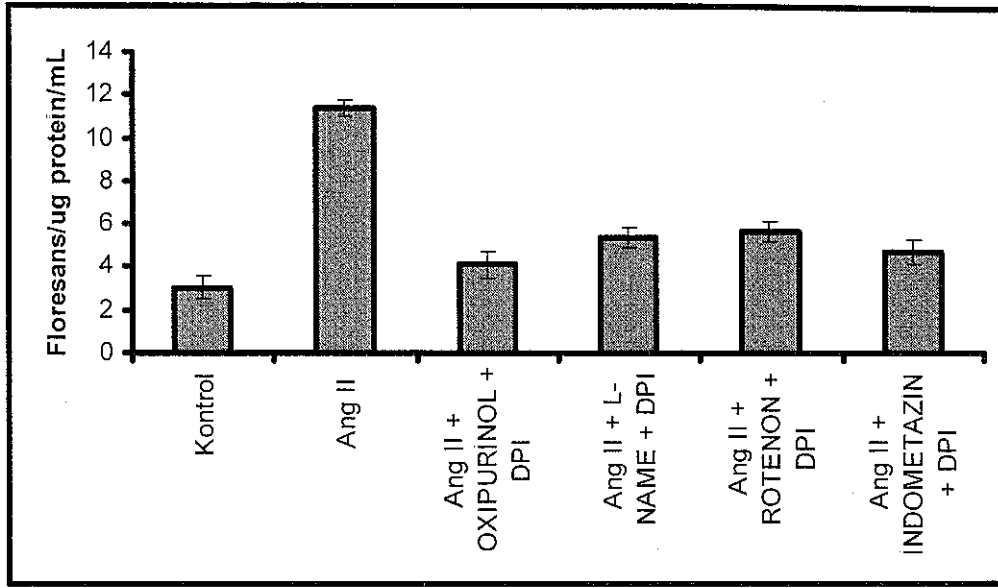
Tüm farklar istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (tablo 4.5.10).

4.5.6. Ang II ile İnkübe Edilen VDKH'deki Süperoksit Anyonu Miktarlarına Rotenon, İndometazin, Oksipurinol ve L-NAME ile Birlikte DPI'nın Etkilerinin Resazurin Yöntemi ile İrdelenmesi

Farklı sistem ve enzim inhibitörleri ile DPI'nın süperoksit anyonu miktarlarına ortak etkisini irdellemek ve sitokrom c redüksiyonu yöntemi ile yapılan deneyleri desteklemek amacıyla, 1 saatlik Ang II (100 nM) inkübasyonunun ardından rotenon (100 μ M), indometazin (10 μ M), oksipurinol (100 μ M), L-NAME (100 μ M) ve DPI (10 μ M) beraber inkübe edilerek inhibisyon deneyleri gerçekleştirildi (tablo 4.5.11. ve şekil 4.5.6.).

Tablo 4.5.11. VDKH'de süperoksit anyonu miktarlarına rotenon (ROT), indometazin (İNDO), oksipurinol (OXP) ve L-NAME ile birlikte DPI'nın etkilerinin resazurin yöntemi ile irdelenmesiyle elde edilen değerler Değerler $X \pm SD$ şeklinde gösterilmektedir ($n = 10, p < 0.05$)

Gruplar	Floresans/ μ g protein/mL
Kontrol	3.046 \pm 0.500
Ang II	11.374 \pm 0.376
Ang II + OXP + DPI	4.130 \pm 0.610
Ang II + L-NAME + DPI	5.340 \pm 0.486
Ang II + ROT + DPI	5.625 \pm 0.497
Ang II + İNDO + DPI	4.689 \pm 0.599



Şekil 4.5.6. Ang II ile inkübe edilen VDKH'de resazurin yöntemi ile ölçülen süperoksit anyonu miktarlarına rotenon, indometazin, oksipurinol ve L-NAME ile birlikte DPI'nın etkileri. Rotenon (100 μ M), indometazin (10 μ M), oksipurinol (100 μ M), L-NAME (100 μ M) ve DPI (10 μ M) ile belirtilen konsantrasyonlarda 30'ar dakikalık inhibisyonlar gerçekleştirildi (n = 10)

Ang II ile stimülasyondan sonra resazurin yöntemiyle, süperoksit anyonu kaynakları olan farklı sistem ve enzimlere ait inhibitörlerle yapılan deneylerde, ortama DPI'da eklendikten sonra, elde edilen değerlerde belirgin inhibisyonlar gözlemlendi. Rotenon + DPI ile 5.625 ± 0.497 , indometazin + DPI ile 4.689 ± 0.599 , oksipurinol + DPI ile 4.130 ± 0.610 , L-NAME + DPI ile 5.340 ± 0.486 değerleri elde edildi ve kontrol hücrelerinden elde edilen verilere (3.046 ± 0.500) yaklaşıldı, ancak tam inhibisyonlar gözlemlenmedi (Şekil 4.5.6). Şekil 4.5.6.'ya ait istatistiksel veriler Tablo 4.5.12.'de gösterilmektedir.

Tablo 4.5.12. Şekil 4.5.6.'daki değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığıyla ilgili veriler. OXP: oksipurinol, ROT: rotenon, İNDO: indometazin (n = 10, p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi)

Gruplar	t	p
Ang II - (Ang II + OXP + DPI)	81.871	.000
AngII - (Ang II + L-NAME + DPI)	108.545	.000
Ang II - (Ang II + ROT + DPI)	125.654	.000
Ang II - (Ang II + İNDO + DPI)	87.515	.000

İstatistiksel anlamlılık açısından p değerleri kıyaslandığında tüm veriler arası farkları anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (tablo 4.5.12)

TARTIŞMA

Mevcut çalışmamızda, vasküler düz kas hücrelerinin primer kültüründe, Ang II'nin ve süperoksit anyonu kaynağı olabilecek farklı sistem ve enzim inhibitörlerinin süperoksit anyonu üretimine etkileri irdelendi. NOX substratı olarak NADPH kullanılarak, süperoksit anyonu miktarları ölçüldü. Süperoksit anyonu miktarları hem ferrisitokrom c redüksiyonu yöntemi hem de resazurin yöntemi kullanılarak desteklendi.

Hipertansiyon, ateroskleroz, diyabetes mellitus ve mekanik hasar gibi bir takım patofizyolojik süreçler, damar duvarında pek çok ortak etkileri paylaşırlar. Bu süreçlerin işleminde, hücre içi sinyal iletim yolu ön plana çıkar (2)

Ang II otokrin büyüme faktörleri içinde en çok çalışılmış olanıdır (23) Ang II farklı etkilere yol açan reseptörlere sahiptir Ang II'nin her iki reseptörü de (AT_1 ve AT_2), ROS üretimine neden olarak VDKH büyümesinde kesin bir rol oynar (2,3,4,5) ROS'un, büyümeyle ilişkili sinyaller ürettiği ve oksidatif stresin; hiperlipidemi, diyabetes mellitus, hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı ve kronik kalp yetmezliği gibi hastalıklarla ilişkili olan kardiyovasküler fonksiyon bozukluğunun başlaması ve ilerlemesinde major rolü oynadığı bilinmektedir (67).

Redoks reaksiyonları, oksijenin metabolizması sonucu hücrelerde, süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve nitrik oksit gibi reaktif oksijen ürünleri oluştururlar (6-8). Vasküler yapılarda en önemli ROS'lardan biri, oksijenin univalan bir reaksiyonla redükte olmasıyla oluşan süperoksit anyonudur. Bu reaksiyon NAD(P)H oksidaz, ksantin oksidaz, lipooksijenaz/sikloksijenaz, p450 mono-oksijenaz enzimleri ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla gerçekleşir (7) ROS; vasküler yapılarda birincil olarak NOX tarafından üretilirler (8). NOX substrat olarak hem NADH'ı hem de NADPH'ı kullanabilir

Fagositlerde respiratuvar yanma sırasında oluşan hızlı ve yoğun süperoksit anyonu salınımı, ekstrasellüler mesafeye hızla geçer, ancak non-fagositer yapılarda hücre içinde oluşan süperoksit anyonunun ekstrasellüler mesafeye salınımı anyon kanalları vasıtasıyla gerçekleşmektedir (103)

Ang II tarafından indüklenen ROS, respiratuvar patlama ile oluşan ROS'a göre farklı kinetik özellikler ve düşük konsantrasyonlar sergiler. Respiratuvar patlamanın aksine daha yavaş bir hızda ve uzun süren süperoksit anyonu üretimi gerçekleşir (7). NAD(P)H oksidazın Ang II ile aktivasyonu geç olmaktadır ve VDKH'lerinde yalnızca Ang II uyarımından 60 dakika sonra saptanır. Bu etki 24 saat boyunca sürekli olmaktadır (68).

Vasküler düz kas hücreleri heterojenite göstermektedir. Bu heterojenite vasküler düz kas hücrelerinin büyüme uyarımına verdiği yanıt etkiler (23,25-27)

Vasküler yapılardaki ROS, popüleri ölçüm yöntemlerinden biri olan lusigenin kemilüminesans yöntemi kullanılarak, pek çok çalışmada ölçülmüş olsa da (10,12,15,16,22), lusigeninin yüksek dozlarının süperoksit anyonu ile interferans verdiği şeklinde spekülasyonlar da yapılmaktadır. Çünkü lusigenin süperoksit anyonuyla verdiği sekonder reaksiyondan önce kendisi univalan redüksiyona gitmektedir (19,104,105). Bu da süperoksit anyonu miktarlarının ölçümü için alternatif ölçüm yöntemlerinin gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Süperoksit anyonu miktarları ferrisitokrom c'nin redüksiyonu yöntemi kullanılarak da ölçülebilir. Ferrisitokrom c süperoksit anyonları ile interferans vermemektedir (19). Daha önce Fang ve arkadaşları (21), florimetrik olarak resazurin yöntemini sıgır nötrofillerinde respiratuvar patlama sonucu NOX üzerinden oluşan süperoksit anyonu miktarlarını tespit etmek için kullandılar.

Çalışmamızın spesifikliği açısından üretilen hücrelerin vasküler düz kas hücresi oldukları immunohistokimya yöntemiyle gösterildi. Böylece çalışma için *in vivo*'ya yakın bir ortam sağlanmış oldu.

Ang II uyarımı ile yapılan süre deneylerinde Ang II uyarımının ardından, hem sitokrom c redüksiyonu hem de resazurin yöntemi ile, süperoksit anyonu miktarlarının 1 saatlik bir zaman diliminde maksimum bir değere ulaştığı ve süperoksit anyonu miktarlarının bu pikten sonra 24 saate yayılan artışlarının olduğu gözlemlendi. Ang II ile uyarılan VDKH süperoksit anyonlarının 1. saat miktarlarında, kontrol grubu 1. saat miktarlarına göre yaklaşık 4 katlık bir artış gözlemlendi (şekil 4.2.1.) Griendling ve arkadaşları ilk defa 1994'te (11) Ang II'nin vasküler düz kas hücrelerinde süperoksit anyonlarını arttırdığını gösterdiler. Griendling ve arkadaşlarına göre, VDKH'nin Ang II ile 4 saatlik uyarımı sonrasında süperoksit anyonu seviyelerinde 3-4 katlık artışlar gerçekleşmekte ve bu artışlar 24 saat boyunca sürekliliğini korumaktadır. Yine aynı grubun çalışmalarına göre, NOX'un Ang II uyarımı gecikmeli başlar ve Ang II uyarımından ancak 60 dakika sonra saptanır. Çalışmamızda süperoksit anyonu miktarlarının NADPH substratı varlığında, Ang II ile uyarımın ardından 30 dakikada artmaya başladığı gözlemlendi (şekil 4.2.1) Bu artış düşük miktarlarda görünmekle beraber fizyolojik olarak önemli olabilir. Seshiah ve arkadaşlarının (106) Ang II'nin NAD(P)H oksidaz enzim aktivasyonunun moleküler mekanizmaları üzerine yaptığı bir çalışmada, Ang II'nin NAD(P)H oksidazı (NOX) uyarımasından sonra ikincil mesajcıları aracılığıyla NAD(P)H oksidaz enzimini yeniden uyardığı belirtilmektedir. Griendling ve arkadaşlarının (11) çalışmalarına göre VDKH'de Ang II uyarımından sonra, 0-1 saatlik zaman aralığında da süperoksit anyonlarının salınımının başladığı gözlenmektedir. Çalışmamızda, Ang II uyarımı 1. saatinden sonra süperoksit anyonu miktarları yüksek seviyelerde kalsa da, 1. saat süperoksit anyonlarının seviyeleri ile 4. ve 24. saat süperoksit anyonu seviyeleri arasında anlamlı istatistiksel farklar yakalanamadı (tablo 4.2.4). VDKH'de Ang II uyarımının ardından resazurin yöntemi ile yaptığımız süre deneylerinde de benzer sonuçlara ulaştık. Ang II uyarımı 1. saatinde görülen süperoksit anyonu miktarları, 4. ve 24 saatlerde de yüksek seviyelerde kaldı (şekil 4.2.1.).

Bir çok *in vivo* ve *in vitro* sistemde, uyarımın farklı konsantrasyonları ve şiddetine karşı organizma farklı yanıtlar verebilir ve hatta farklı

konsantrasyonlarda zıt etkileri gözlemlenebilir. Çalışmamızda, farklı Ang II konsantrasyonları ile vasküler düz kas hücreleri uyarıldı. Ferrisitokrom c redüksiyonu yöntemi ile yapılan deneylerimizde, Ang II için 100 nM'lık konsantrasyon kullanıldığında, Ang II uyarımına karşı süperoksit anyonu miktarları artışı şeklinde alınan cevabın, 10 nM konsantrasyonda Ang II kullanıldığında elde edilen cevaba göre yaklaşık 4-6 katlık bir fark yarattığı gözlemlendi (şekil 4.3.1). Deney resazurin yöntemiyle tekrarlandığında benzer bir sonuçlar elde edildi (şekil 4.3.2). Griendling ve arkadaşlarına göre (103); düşük Ang II konsantrasyonlarında bile (0.1 nM), NOX kökenli ROS artar. Bu yükseliş VDKH'lerinde 60 dakika sonra saptanı ve 24 saat boyunca devam eder. Griendling ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda da Ang II ile 100 nM konsantrasyonda uyarımlar yapıldığı görülmektedir. Çalışmalarımızda süperoksit anyonu seviyelerini ölçtüğümüz her iki yöntemle de, Ang II konsantrasyonu 10 nM'ın altına düşürüldüğünde NOX aktivitesi gözlenmedi (veri gösterilmedi) Ferrisitokrom c redüksiyonu yönteminde Ang II konsantrasyonu 100 nM'dan 1000 nM konsantrasyona arttırılsa da yakalanan değerler stabil seyretti. Ancak resazurin ile yapılan deneylerde, Ang II konsantrasyonları arttıkça süperoksit anyonu miktarlarında az miktarda düşüşler görüldü. 100 nM Ang II konsantrasyonunda her iki yöntemle de elde ettiğimiz yüksek süperoksit anyonu miktarları, Zhang ve arkadaşlarının (107) vasküler yapılarda yaptığı deneyleri desteklemektedir. Hong Zhang ve arkadaşlarının aorta endotel hücrelerinde yaptığı çalışmalar da, 100 ve 1000 nM Ang II konsantrasyonlarında 0-1 saat aralığında, bazal seviyelere göre anlamlı farklar var ve bu artışlar 1. saatte yaptığı pikin ardından bir miktar düşüşler göstererek yine stabil düzeylerde seyretmektedir. Her iki yöntemle de yaptığımız çalışmalar da 100 nM Ang II konsantrasyonunun süperoksit anyonu seviyeleri için yeterli olduğunu gözlemledik.

Süperoksit anyonlarındaki artışın, Ang II'den kaynaklanıp kaynaklanmadığını irdelemek için, AT₁ reseptör inhibitörü Losartan ile VDKH'de inhibisyon deneyleri yapıldı. Oluşan süperoksit anyonlarının NOX üzerinden üretilip üretilmediğini göstermek için, NOX inhibitörü DPI ile de hücreler inkübe

edildi. Her iki yöntemle yapılan deneylerde de, hem losartan hem de DPI, Ang II ile uyarılmış süperoksit anyonu miktarlarını etkin bir biçimde inhibe etti (şekil 4.4.1 ve şekil 4.4.2.) Losartan ile gerçekleşen inhibisyon Ang II uyarımı ile elde edilen süperoksit anyonu miktarlarını bazal seviyelere kadar düşürürken, DPI ile yapılan deneylerde süperoksit anyonu miktarları bazal seviyeye kadar düşmedi. Bu sonuçlar, Ang II'nin vasküler düz kas hücrelerindeki süperoksit anyonu seviyelerini AT₁ reseptörleri üzerinden uyardığını desteklemektedir. Günümüzde de Losartan ve türevleri primer hipertansiyon tedavisinde etkin bir biçimde kullanılmaktadır. DPI ile hücre içi bazal süperoksit anyonu seviyelerine kadar inhibisyonun görülmemesi, Ang II uyarımlı başka hücre içi süperoksit anyonu kaynaklarının varlığını da göstermektedir. DPI bir flavoprotein inhibitörüdür. Warnholtz ile arkadaşlarının (22) vasküler yapılarda yaptığı çalışmalara göre de Ang II stimülasyonu sonrası DPI, Ang II üzerinden oluşan süperoksit anyonu miktarlarını etkin bir biçimde azaltmaktadır. Ancak araştırmacılar lusigenin kemilüminesans yöntemini kullanarak süperoksit anyonu seviyelerini ölçmüşlerdir. Liochev (105) ve arkadaşları lusigenin'in nitrik oksit sentaz ve ksantin oksidaz enzimlerinin 1 elektronluk redüksiyonuyla süperoksit anyonu üretebildiğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmalarımızda; hem sitokrom c redüksiyonu yöntemi hem de resazürin yöntemi ile benzer sonuçlar elde etmemiz, yapılan inhibisyon deneylerinin sonuçlarını desteklemektedir. Jaimes ve arkadaşlarının (16) mezengial hücrelerde (NOX bulunan non-fagositer hücre gruplarından bir diğeri) yaptıkları çalışmalarda da Ang II stimülasyonu sonrası süperoksit anyonları miktarları, DPI ile inhibisyonun ardından, kontrol hücreleri süperoksit anyonu miktarlarının da altına düşmüştür. Çalışmamızda, bazal seviyedeki süperoksit anyonu miktarları ve DPI ile inhibisyondan sonraki süperoksit anyonlarının verileri arasında anlamlı fark görünmektedir (tablo 4.4.1. ve tablo 4.4.2.) Bu sonuç farklı sistem veya enzimlerinde, Ang II ile uyarımın ardından süperoksit anyonu için kaynak olabileceğini düşündürmektedir. Yine de süperoksit anyonu bazal seviyeleri ile DPI inhibisyonunun ardından elde edilen süperoksit anyonu miktarları arasında büyük farklılıklar bulunmamaktadır (şekil 4.4.1. ve şekil 4.4.2.).

Losartan ile yaptığımız inhibisyon deneylerinde, süperoksit anyonu seviyeleri bazal süperoksit anyonu seviyelerine kadar düşse de (şekil 4.4.1. ve şekil 4.4.2.), bazal seviyeler ile Ang II uyarımı sonrası Los ile inhibe edilen süperoksit anyonu seviyeleri arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı görünmektedir. Zhang (107) ve arkadaşlarının, vasküler yapılarda yaptığı deneylerde de Ang II stimülasyonu sonrası oluşan süperoksit anyonu seviyeleri etkin bir biçimde inhibe edilmiştir. Yine aynı grup çalışmalarında Ang II stimülasyonu için 1 saatlik inkübasyonu yeterli bulmuşlardır. Zhang ve arkadaşları aortaya ait endotel hücrelerinde çalıştıklarında da süperoksit anyonu seviyelerinin büyük oranda Losartan ile inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Ang II uyarımı sonrası Losartan ile inhibe ettiğimiz VDKH süperoksit anyonu seviyeleri, sitokrom c redüksiyonu yöntemi ya da resazurin yöntemi kullanıldığında da benzer bir şekilde inhibe oldu ve bulgularımızı destekledi (şekil 4.4.2.).

Özellikle DPI ile yaptığımız deneylerde hücre içi farklı süperoksit anyonu kaynakları olabileceğini gördükten sonra, çalışmalarımızda, hücre içi süperoksit anyonu kaynağı olabilecek farklı sistem ve enzimler olan; mitokondriyal respiratuvar zinciri rotenon, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri indometazin, ksantin oksidaz enzimi oksipurinol, nitrik oksit sentaz enzimi L-NAME ile inhibe edilerek, Ang II uyarımının ardından deneyler yapıldı. Bu sistem ve enzimlerde vasküler düz kas hücrelerinde muhtemel süperoksit anyonu kaynakları olarak göze çarpmaktadır (7). Her iki yöntemiyle de, VDKH'de Ang II stimülasyonunun ardından inhibisyon deneyleri yapılarak süperoksit anyonu miktarları ölçüldü (şekil 4.5.1. ve şekil 4.5.4). Deneylerde en belirgin inhibisyon, ksantin oksidaz enzimi inhibitörü oksipurinol ile yapılan inhibisyonda görüldü. Ancak istatistiksel açıdan anlamlı da olsa, bazal süperoksit anyonu seviyelerine yaklaşılamadı. Rotenon ve indometazin ile yapılan deneylerde Ang II ile stimüle edilen süperoksit anyonu seviyelerinde inhibisyonlar gözlenmedi. L-NAME ile yapılan inhibisyonlarda ise süperoksit anyonu miktarları Ang II ile elde edilen süperoksit anyonu seviyelerinden biraz daha yüksek bulundu (şekil 4.5.1. ve şekil 4.5.4.). Rotenon ve indometazin ile yapılan inhibisyonlardan sonra görülen

süperoksit anyonu seviyeleri ile Ang II stimülasyonu sonrası elde edilen süperoksit anyonu miktarları arasında anlamlı fark görülmedi (tablo 4.5.1.). Ancak oksipürinol ve L-NAME ile yapılan inhibisyon deneylerinde elde edilen süperoksit anyonu seviyeleri ile, Ang II uyarımı sonrası görülen süperoksit anyonu seviyeleri arasındaki farklar az miktarlarda da olsa, anlamlıydı. Oksipürinol ile elde edilen inhibisyon diğer inhibitörlere göre yüksek görünmektedir (şekil 4.5.1 ve şekil 4.5.4). Bu sonuçlara göre, Ang II major etkilerini AT₁ reseptörü ve NOX üzerinden gerçekleştiriyor görünse de, özellikle ksantin oksidaz enzimi ile ilgili farklı çalışmalar da önemli sonuçlar verebilir. Ksantin oksidaz enzimi vasküler düz kas hücrelerinde AT₁ reseptörünün etkisine benzer biçimde vazokonstriksiyon yaratır. Bu etkisini ROS aracılığıyla ve Ang II uyarımı ile aktive olan NOX'un etkilerini amplifiye ederek gerçekleştiriyor olabilir. Yakın bir zaman da, White ve arkadaşları (83) ile Spiekermann (85) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara göre de, ksantin oksidaz üzerinden meydana gelen ROS, iskemi/reperfüzyon, hiperkolesterolemi ve endotelial disfonksiyonu içeren klinik-patolojik durumların etiyopatogenezinde yer aldığını ileri sürmüşlerdir. VDKH'de Ang II ile elde ettiğimiz süperoksit anyonu seviyelerinin Los ile bazal süperoksit anyonu seviyelerine kadar, DPI ile bazal seviyelere yakın inhibe edildiğini düşünürsek, Ang II ksantin oksidaz enzimini de VDKH'de stimüle ederek süperoksit anyonu seviyelerini artırıyor olabilir. Bu görüşümüzü, White ve arkadaşlarının (83) yaptığı çalışma da ksantin oksidaz açısından desteklemektedir. Bu konuda yapılacak ileri çalışmalar ile VDKH'deki süperoksit anyonu kaynakları aydınlatılıp, hipertansiyon, diyabetes mellitus ve ateroskleroz gibi patolojik süreçlerin altında yatan mekanizmalar aydınlığa kavuşacaktır. Böylece medikal tedavi aşamalarında önemli gelişmeler kaydedilebilir.

Çalışmalarımızın son aşamasında, farklı sistem ve enzim inhibitörleri ile yapılan deneylerde ortama Los ve DPI eklenerek, her iki yöntemle de inhibisyon deneyleri gerçekleştirildi. Ang II ile uyarılan VDKH, farklı sistem ve enzim inhibitörleri ksantin oksidaz enzim inhibitörü oksipürinol, lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzim inhibitörü indometazin, NOS inhibitörü L-NAME, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon inhibitörü rotenon ile inkübe edilirken; her

biri Los ve DPI ile de aynı anda inkübe edildi. Farklı sistem ve enzim inhibitörleriyle beraber Los ve DPI ile yapılan deneylerde, Ang II ile elde edilen süperoksit anyonu miktarları bazal seviyelere kadar geriledi. Ang II muhtemelen VDKH üzerindeki etkilerini AT₁ reseptörü üzerinden göstermektedir. Ushio-Fukai ve arkadaşlarının (12) Ang II uyarımı sonrası vasküler düz kas hücre hipertrofisi üzerine yaptıkları deneylerde de Los, Ang II ile indüklenen vasküler düz kas hücre hipertrofisini inhibe etmiş ve Ang II'nin vasküler yapılardaki etkilerine AT₁ reseptörünün aracılık ettiğini desteklemiştir. Bulgularımıza göre, Ang II süperoksit anyonu seviyelerini de AT₁ reseptörü üzerinden arttırıyor görülmektedir. Çalışmalarımızın sonuçlarını resazurin ile yaptığımız deneylerle de destekledik ve benzer sonuçlara ulaştık (şekil 4.5.5.). Farklı sistem ve enzim inhibitörleri ile yaptığımız deneylerde, Los yerine ortama DPI ekleyerek de her iki yöntemle çalışmalar tekrarlandı. Çalışmalarımız sonucunda, süperoksit anyonu kaynağı her bir sistem ve enzim inhibitörü DPI ile birlikte, Ang II uyarımı sonrası artan süperoksit anyonu seviyelerini inhibe etti. Süperoksit anyon miktarları, bazal seviyelere kadar inhibe olmasa da, özellikle Ang II uyarımı sonrası oksipürinol + DPI ile inhibe edilen hücrelerde bazal süperoksit anyonu seviyelerine çok yaklaşıldı (şekil 4.5.3 ve şekil 4.5.6). Bu sonuç, Ang II ile uyarılan hücrelerde ksantin oksidaz enziminin de süperoksit anyonu kaynağı olması ihtimalini desteklemektedir. Ang II NOX'tan farklı bir mekanizma üzerinden, ksantin oksidaz enzimi aracılığıyla süperoksit anyonu miktarlarını arttırıyor olabilir.

Primer hücre kültürü yapılan vasküler düz kas hücrelerinde yapılan deneyler *in vivo*'ya yakın cevaplar elde etmek açısından faydalıdır. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, Ang II'nin organizmada patolojik konsantrasyonlarının oksidatif stres aracılığıyla yaptığı zararlarla mücadele etmek için birer yol gösterici durumundadır. Ang II'nin etki mekanizmaları her ne kadar çözülmeye başlamışsa da, bunun klinik yansımaları için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü *in vitro* çalışmalar bir çok faktörden (kullanılan ölçüm yöntemleri, *in vitro* ortamdaki heterojeniteler, kimyasal madde ve gereçlerin standardizasyonu, v.s.) etkilenmekte ve farklı sonuçlar elde edilmektedir. Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar, ROS'un birçok hastalığındaki etkin rolünü

aydınlatma açısından faydalı olabilir. Günümüzde Ang II'nin özellikle vasküler yapılardaki etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması, patogenezinde vasküler inflamasyon ve vasküler hasar yatan bir çok hastalığın aydınlatılmasını sağlayacaktır. Bu konunun son yıllardaki örneklerinden biri, Losartan ve türevlerinin primer hipertansiyon tedavisinde yerini almış olmasıdır. Yakın bir gelecekte NOX, ksantin oksidaz, ve ROS arasındaki interaksiyonların gün ışığına çıkarılması, prevalansı yüksek bir çok hastalığın medikal tedavi yelpazesini arttıracaktır. Zira ROS ve dahil olduğu sinyalizasyon yolları, halen gizemini korumaktadır.

SONUÇLAR

1. Ang II ile stimülasyon sonrası 1 saat içinde, VDKH'de görülen süperoksit anyonu miktarlarında 4-6 katlık artışlar yakalandı. Bu artışlar 24 saat boyunca etkili bir seviyede devam etti.
2. VDKH'de Ang II ile 100 nM konsantrasyonda yapılan uyarımla maksimum süperoksit anyonu miktarları elde edildi. Ang II ile 200, 400, 1000 nM konsantrasyonda yapılan inkübasyonlarla elde edilen süperoksit anyonu seviyeleri yüksek değerlerde, ancak; 100 nM konsantrasyonda elde edilen süperoksit anyonu seviyelerinin altında kaldı.
3. Ang II uyarımı sonrası süperoksit anyonu miktarlarındaki artışların, AT₁ reseptör inhibitörü Losartan ile bazal seviyelere gerilemesi, süperoksit anyonu oluşumundan Ang II'nin sorumlu olduğunu göstermektedir. NOX inhibitörü DPI ile inkübe edilen hücrelerde, Ang II uyarımının ardından süperoksit anyonu seviyelerinin belirgin bir şekilde düşmesi, süperoksit anyonu kaynağının NOX olduğunu işaret etmektedir.
4. Ang II uyarımı sonrası farklı sistem ve enzim inhibitörleriyle yapılan deneylerde, Ang II uyarımı sonrası görülen süperoksit anyonu değerlerinde bir miktar düşüşler gözlemlense de Los ile yakalanan bazal seviyeler elde edilemedi. Ksantin oksidaz enzimi inhibitörü oksipürinol ile yapılan deneylerde, diğer sistem ve enzim inhibitörlerine nazaran Ang II ile stimülasyonu sonrası elde edilen süperoksit anyonu seviyeleri daha belirgin inhibe oldu.
5. Ang II uyarımı sonrası farklı sistem ve enzim inhibitörleriyle beraber Los ve DPI ile yapılan inhibisyon deneylerinde, ortama Los

eklendiğinde bazal süperoksit anyonu seviyelerine dönüldü DPI ile yapılan deneylerde ise, bazal süperoksit anyonu seviyelerine ancak oksipürinol ile DPI beraber inkübe edildiğinde yaklaşıldı. Bu sonuç bize, Ang II uyarımıyla üretilen süperoksit anyonu kaynaklarının NOX ve XO olduğunu düşündürmektedir.

ÖZET

Kardiyovasküler hastalıklar ve renal hastalıklar damar duvarında ortak etkileri ve patofizyolojik süreçleri paylaşırlar. Bu etkilerde ortak nokta artmış oksidatif strestir. Anjiotensin II, ROS ve NOX oksidatif stres ve bu patofizyolojik süreçlerde hücre içi ve hücreler arası sinyalizasyonun mediyatörleri olarak davranırlar.

Çalışmamızda, rat aortasından izole edilen VDKH, primer kültürü yapıldıktan sonra Ang II uyarımı yapılarak NADPH varlığında sitokrom c redüksiyonu yöntemi ve rezasurin yöntemi ile süperoksit anyonu miktarlarının tayinleri yapıldı. Kültüre edilen düz kas hücrelerinin immünohistokimyasal teknikle düz kas hücreleri olduğu gösterildi. Ang II uyarımında süre, konsantrasyon ve süperoksit anyonu kaynağı olan farklı enzim ve sistem inhibitörleriyle inhibisyon deneyleri yapıldı. Yapılan deneyler sonucunda VDKH'de Ang II uyarımının ardından süperoksit anyonları 30 dk'dan itibaren tespit edildi ve 1. saatte maksimum (Bazal seviyelere göre yaklaşık 4-6 kat) değere ulaştıktan sonra 24 saat boyunca bu seviyeler süreklilik gösterdi. Ang II 100 nM konsantrasyonda VDKH süperoksit anyonları miktarlarını belirgin şekilde arttırdı. Ang II ile 100 nM konsantrasyonda, 1 saat süreyle yapılan uyarımın ardından elde edilen süperoksit anyonu miktarlarını AT₁ reseptör inhibitörü Losartan bazal hücre içi seviyelere, NOX inhibitörü DPI bazal hücre içi seviyelere yakın bir değere kadar, ksantin oksidaz enzimi oksipürinol ise bazal hücre içi seviyelere kadar olmamasına karşın anlamlı miktarda inhibe etti. Süperoksit anyonu kaynağı olabilecek diğer enzim ve sistem inhibitörleriyle etkili inhibisyonlar elde edilemedi. Tüm deneyler hem rezasurin hem de sitokrom c redüksiyonu yöntemleriyle gösterildi ve her iki yöntemde de benzer sonuçlara ulaşıldı.

KAYNAKLAR

1. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin O, Shah A, Harrison DG, Taylor RW, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 32:488-495, 1998.
2. Touyz RM, Schiffman EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 52:4, 639-672, 2000.
3. Siragy HM. The role of the AT₂ receptor in hypertension. *Am J Hypertens*. 13:62-67, 2000.
4. Frank GD, Eguchi S, Yamakawa I, Motley ED. Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II. *Endocrinology*. 141: 3120-3126, 2000.
5. Nickeing G. Central Role of the AT₁-receptor in atherosclerosis. *J Hum Hypertens*. 16:26-33, 2002.
6. Kirsch M, De Groot H. NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *FASEB J*. 15, 1569-1574, 2001.
7. Wolf G. Free radical production and angiotensin. *Curr Hypertens Rep*. 2:167-173, 2000.
8. Touyz M. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2:98-105, 2000.
9. Griendling KK, Ushio Fukai M. NADH/NADPH oxidase and vascular function. *Trends Cardiovasc Med*. 301-307, 1997.

10. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *J Clin Invest* 97:1916-1923, 1996.

11. Griendling KK, Minieri CA, Minieri, Jeremy D, Ollerenshaw, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1141-1148, 1994

12. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui I, Ishizaka N, Griendling KK. P22^{phox} is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates Angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 23317-23321, 1996

13. Souza HP, Laurindo FRM, Ziegelstein RC, Belowitz CO, Zweier JL. Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: 658-667, 2001.

14. Chanock SJ, Benna JE, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase, Minireview. *J Biol Chem* 24519-24522, 1994.

15. De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK. Tumour necrosis factor α activates a p22^{phox}-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 329: 653-657, 1998.

16. Jaimes EA, Galceran JM, Raij L. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int* 54:775-784, 1998.

17. Cecil Essentials of Medicine Saunders WB (Editör: Salangu Ç, Türkçe, 3. edisyon, Yüce Yayın) Bölüm 29: 230-237, 1995.

18. Chamley JH, Campbell GR, McConnell JD. Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and in subculture. *Cell Tiss. Res.* 177:503-523, 1997.

19. Görlach A, Brandes RP, Bassus S, Kronemann N, Kirchmaier CM, Busse R, Schini-Kerth VB. Oxidative stress and expression of p22phox are involved in the upregulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response *FASEB J* 14:1518-1528, 2000.

20. Jeffrey M, Dood O, Pearse B. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion lung injury *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279:303-312, 2000.

21. Fang W, Myllys V, Sandholm M. Resazurin reduction as a function of respiratory burst in bovine neutrophils *AJVR.* 58 (6):601-607, 1997.

22. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer I, Stasch JP, Griendling KK. Increased NADH oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis, evidence for involvement of renin-angiotensin system (RAS). *Circulation.* 99:2027-2033, 1999.

23. Berk BC. Vascular Smooth Muscle Growth: Autocrine Growth Mechanisms. *Physiol Rev.* 81:3, 2001

24. Gospodarowicz D, Moran J, Braun D, Clonal BC. Growth of bovine vascular endothelial cells: fibroblast growth factor as a survival agent *Proc Natl Acad Sci* 73: 4120-4124, 1976

25. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease *Physiol Rev.* 84 (3):767-801, 2004

26. Lise R. Bonin, Karen Madden, Katherine Shera, Jennifer Ihle, Connie Mathews, Salim Aziz, Nuria Perez Reyes, James K. McDougall, Stephen C. Comroy. Generation and characterization of human smooth muscle cell lines derived from atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:575-587 1999.
27. Gunter S, Alexander RW, Atkinson WJ, Gimbrone MA. Functional Angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 92:289-298, 1982.
28. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthases, role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med.* 48:489-509, 1997
29. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest.* 91: 2268-2274, 1993.
30. Pollman MJ, Yamada I, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res,* 79: 748-756, 1996.
31. Berk BC, Vekshtein BBC, Gordon HE, Tsuda I. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 13:305-314, 1989
32. Touyz RM, Endemann D, He G, Li JS, Schiffrin EL. Role of AT2 receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small arteries in young. *Soc Hypertens Rep.* 33:366-373, 1999.
33. Zahradka P, Wilson D, Saward L, Yau L, Cheung PK. Cellular physiology of angiotensin II receptors in vascular smooth muscle cells, in

angiotensin II receptor blockade: Physiological and Clinical Implications (Ed. by Dhalla NS, Zahradka P, Dixon I and Beamish R), Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, pp:41-50, 1998

34. Millatt LJ, Abdel-Rahman EM, Sirag HM Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regul Pept* 81; 1-10, 1999

35. Arık N, Korkmaz M Primer hipertansiyon patogenezi. *Hipertansiyon*, (Editör: Arık N, Format Matbaa, İstanbul) pp: 275-294, 1998.

36. Wollert KC, Drexler H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure *Cardiovasc Res*. 43:838-849, 1999.

37. Reid IA. The renin-angiotensin system: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Am Physiol Soc*. 20:236-245, 1998.

38. Skeggs LT, Lentz KE, Gould AB, Hochstrasser H, Kahn JR Biochemistry and kinetics of the renin-angiotensin system. *Fed Proc*. 26:42-47, 1967

39. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI Counterregulatory actions of angiotensin (1-7). *Hypertension*. 30:535-541, 1997.

40. Danser AH Local renin-angiotensin systems. *Mol Cell Biochem*. 157:211-216, 1996

41. Satis JJ, Van Dijk MA, Kroon I, Schalekamp MA, Danser AH Functional importance of angiotensin-converting enzyme-dependent in situ angiotensin II generation in the human forearm. *Hypertension*. 35:764-768, 2000.

42. Naftilan AJ, Zho WM, Ingelfinger J, Ryan TJ, Pratt RE, Dzau VJ. Localization and differential regulation of angiotensinogen mRNA expression in the vessel wall. *J Clin Invest*. 87:1300-1311, 1991.

43. Hollenberg NK, Fisher NDL, Price DA Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue Evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension*. 32:387–392, 1998
44. Schutz S, Le Moullec JM, Corvol P, Gasc JM. Early expression of all the components of the renin-angiotensin-system in human development. *Am J Pathol* 149:2067–2079, 1996.
45. Urata H, Nishimura H, Ganten D. Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am J Hypertens*. 9:277–284, 1996.
46. Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem*. 265:22348–22357, 1990.
47. Takai S, Shiota N, Jin D, Miyazaki M. Functional role of chymase in angiotensin II formation in human vascular tissue. *J Cardiovasc Pharmacol*. 32:826–833, 1998.
48. Shiota N, Okunishi H, Takai S, Mikoshiba I, Sakonjo H, Shibata N, Miyazaki M. Tranilast suppresses vascular chymase expression and neointima formation in balloon-injured dog carotid artery. *Circulation*. 99:1084–1090, 1999
49. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*. 351:233–236, 1991.
50. Sadoshima J. Versatility of the angiotensin II type I receptor. *Circ Res*. 82:1352–1355, 1998.

51. Inagami T Recent progress in molecular and cell biological studies of angiotensin receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4:47–54, 1995.
52. Kai H, Griendling KK, Lassegue B, Ollerenshaw JD, Runge MS, Alexander RW Agonist-induced phosphorylation of the vascular type 1 angiotensin II receptor. *Hypertension* 24:523–527, 1994.
53. De Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M, Goodfriend I, Harding JW, Inagami T, Timmermans PB Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* 25:924–927, 1995.
54. Allen AM, Zhuo J, Fao M Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* 13:31–38, 2000.
55. Zhuo J, Moeller I, Jenkins I, Chai SY, Allen AM, Mitsuru O, Mendelsohn AO. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J Hypertens* 16:2027–2037, 1998.
56. Iwai N, Inagami T Identification of two subtypes in the type 1 angiotensin II receptor. *FEBS Lett* 298:257–260, 1992.
57. Nahmias C, Strosberg D The angiotensin AT1 receptor: Searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 16:223–225, 1995.
58. Viswanathan M, Saavedra JM. Angiotensin II receptor subtypes and growth. In *Angiotensin receptors*. Ed by Saavedra JM, PBMWM Timmermans. Plenum Pres, 1994.
59. Tamura M, Wanaka Y, Landon EJ, Inagami T. Intracellular sodium modulates the expression of angiotensin II subtype 2 receptor in PC12W cells. *Hypertension* 33:626–632, 1999.

60. Touyz RM, Schiffrin EL. Tyrosine kinase signaling pathways modulate angiotensin II-induced calcium transients in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 27:1097–1103, 1999.

61. Hayashida W, Horiuchi M, Grandchamp J, Dzau VJ. Antagonistic action of angiotensin II type-1 and type-2 receptors on apoptosis in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Hypertension* 28:535, 1996.

62. Horiuchi M, Yamada T, Hayashida W, Dzau VJ. Interferon regulatory factor-1 upregulates angiotensin type 2 receptor and induces apoptosis. *J Biol Chem*. 272:11952–11961, 1997.

63. Gallinat S, Busche S, Raizada MK, Sumners C. The angiotensin II type 2: Receptor: An enigma with multiple variations. *Am J Physiol*. 278:357–374, 2000.

64. Unger T. The angiotensin type 2 receptor: Variations on an enigmatic theme. *J Hypertens*, 17:1775–1786, 1999.

65. Siragy HM. The role of the AT2 receptor in hypertension. *Am J Hypertens*, 13:62S–67S, 2000.

66. Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KI, Miller-Wing AV, Cook VI, Harding ECE, Harding JW. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3–8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* 40:409–419, 1992.

67. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II Signaling in Vascular Smooth Muscle. *Hypertension* 29:366–373, 1997.

68. Bernard M. Babior. Oxidants from phagocytes: Agents of defence and destruction. *Blood*. 64:959-966, 1984.

69. Franco MCP, Akamine EH, Marco GS, Casarini DE, Fortes ZB, Tostes RCA, Carvalho MHC, Nigro D. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res* 59:767-775, 2003.

70. Fridovich I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*. 272:18515-18517, 1997.

71. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279:L1005-L1028, 2000.

72. Lassegue B, Alexander RW, Clark M, Akers MA and Griendling KK. Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *Biochem J*. 292:509-517, 1993.

73. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Duff JL, Berk BC and Bernstein KB. The role of tyrosine phosphorylation in angiotensin II mediated intracellular signaling. *Cardiovasc Res*. 30:530-536, 1995.

74. Abe J, Berk BC. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 8:59-64, 1998.

75. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res*, 62:749-756, 1988.

76. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res*, 68:450-456, 1991.
77. Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Central role of the MAPK pathway in Ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:73-82, 1999.
78. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit*, 11(6): 194-205, 2005
79. Luchtefelda M, Grotea K, Grothusena C, Bleya S, Bandlowa N, Sella I, Struberb M, Haverichb A, Bavendieka U, Drexlera H, Schieffera B. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *BBRC*, 328:183-188, 2005.
80. Deshpande NN, Sorescu D, Seshiah P, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Griendling KK. Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxid Redox Signal* 4:845-854, 2002.
81. Li AE, Ito H, Rovira II, Kim KS, Takeda K, Yu ZY, Ferrans VJ, Finkel I. A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ Res*. 85:304-310, 1999.
82. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7) a mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 276:41279-41287, 2001.
83. White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR, McAdams M, Gore JZ, Thompson JA, Parks DA, Tarpey MM, Freeman BA. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci*. 93:8745-8749, 1996

84. Munzel T, Savegh H, Freeman BA, et al. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest.* 95:187-194, 1995

85. Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Bredt M, Gamez G, Tatge H, Reepschlager N, Hornig B, Drexler H, Harrison DG. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium dependent vasodilatation. *Circulation.* 107:1383-1389, 2003

86. Smith RM, Woodman R, Babior BM. Lymphocytes and granulocytes. *Blood Cell Biochem.* 3:215-254, 1991.

87. Babior BM. The respiratory burst oxidase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 65:49-95, 1992

88. Yagisava M, You A, Younemaru M, Ohmi S, Kanegasaki S. Superoxide release and NADPH oxidase components in mature human phagocytes. *Biochem Biophys Res.* 228:510-516, 1996.

89. Lawson N, Berliner N. Neutrophil maturation and the role of retinoic acid. *Exp Hematol.* 27:1355-1367, 1999.

90. Segal AW, Jones OI, Webster D, Allison AC. Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *Lancet.* 2(8087):446-449, 1978

91. Nathalie B, Michael P. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol.* 99(1):7-17, 2001.

92. Parkos CA, Dinauer MC, Jesaitis AJ, Orkin SH, Curnutte JT. Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. 73 (6):1416-1420, 1989.
93. Dinauer MC. The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 30(4):329-369, 1993.
94. Nauseef WM, Volpp BD, McCormick S, Leidal KG, Clark RA. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J Biol Chem*. 266:5911-5917, 1991.
95. Hata K, Ito T, Takeshige K, Sumimoto H. Anionic amphiphile-independent activation of phagocyte NADPH oxidase in a cell-free system by p47^{phox} and p67^{phox}, both in C terminally truncated forms. *J Biol Chem* 273:4232-4236, 1998.
96. Faust LR, Benna J, Babior BM. The phosphorylation targets of p47^{phox}, a subunit of respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest*. 96:1499-1505, 1995.
97. El Benna J, Dang PM, Gaudry M, Fay M, Morel F. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase c-dependent and independent pathways. *J Biol Chem* 272:17204-17208, 1997.
98. Han CH, Freeman JL, Lee T, Motabeli SA. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* 273:16663-16668, 1998.

99. Koga H, Terasava H, Nunoi H, Takeshige K. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with small GTPase Rac and activation of phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 274:25051-25060, 1999.

100. Ambruso DR, Knall C, Abell AN. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:4654-4659, 2000.

101. Harry L, Galin J. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* 317 (11):687-694, 1987.

102. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of μ g quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254, 1976.

103. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42:1075-1081, 2003.

104. Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA. Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. *Circ Res.* 84:1203-1211, 1999.

105. Liochev SI, Fridovich I. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys* 337:115-120, 1997.

106. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Ang II stimulation of NAD(P)H oxidase activity, upstream mediators. *Circ Res* 91: 406-413, 2002.

107. Zhang H, Schmeisser A, Garlichs CD, Plötze K, Damme U, Müge A, Daniel WG. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: Role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res* 44:215-222, 1999