



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**MATRİKS METALLOPROTEAZLARIN DİYABETİK
SIÇANLARIN ENDOTEL BAĞIMLI DAMAR
FONKSİYONLARINDAKİ ROLÜ**

Esmâ Nur ZEYDANLI

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Belma TURAN**

2008- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MATRİKS METALLOPROTEAZLARIN DİYABETİK
SIÇANLARIN ENDOTEL BAĞIMLI DAMAR
FONKSİYONLARINDAKİ ROLÜ**

Esmâ Nur ZEYDANLI

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Belma TURAN**

2008- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 04 / 08 / 2008

Prof. Dr. Feride SEVERCAN
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Faköltesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Belma TURAN
Ankara Üniversitesi Tıp Faköltesi

Prof. Dr. Mehmet UĞUR
Ankara Üniversitesi Tıp Faköltesi

Prof. Dr. Metin BAŞBUĞ
Ankara Üniversitesi Tıp Faköltesi

Doç. Dr. Aslıhan KÖKSOY
Ankara Üniversitesi Tıp Faköltesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Diyabetes Mellitus ve Tipleri	1
1.2 Deneysel Diyabet	1
1.3 Diyabetin Vasküler Sistem Üzerine Etkileri	2
1.4 Matriks Metalloproteinazlar	6
1.5 MMP' lerin Vazoaktif Etkileri	9
1.6 Tetrasiklinler	11
1.7 Diyabet ve MMP ilişkisi	12
1.8 Selenyum ve Vasküler Sistem Üzerine Etkileri	14
1.9 Diyabet-Selenyum İlişkisi	15
1.10 Çalışmanın Amacı	16
2.GEREÇ VE YÖNTEM	19
2.1 Sıçanlarda Diyabet Oluşturulması	19
2.2 Vasküler Aktivitenin İncelenmesi	19
2.3 Adenilat siklaz aktivitesi ölçümü	20
2.4 cAMP derişimi ölçümü	21
2.5 MMP-2, MMP-9 ve TIMP-4 protein seviyelerinin ölçümü	21
2.6 MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin ölçümü	22
2.7 Tiylol Oksidasyon Ölçümü	22
2.8 Nitrik Oksit Türevlerinin Ölçümü	23
2.9 İstatistiksel Analizler	23
2.10 Kullanılan Kimyasallar	24
3.BULGULAR	25
3.1 Deney Hayvanlarının Genel Bulguları	25
3.2 Doksisiklin veya Selenyum Uygulamasının Diyabetik Sıçanlarda Alfa-1 Adrenerjik Reseptör Agonisti Yanıtlarına Etkisi	26
3.3 Doksisiklinin veya Selenyumun Diyabetik Sıçanlarda Endotel Varlığında Gerçekleşen Gevşeme Yanıtlarına Etkisi	26
3.4 Doksisiklinin veya Selenyumun Diyabetik Sıçanlarda Uyarılmış cAMP Seviyeleri Üzerine Etkisi	32
3.5 Doksisiklinin veya Selenyumun Diyabetik Sıçanlarda Damar MMP-2 Protein Seviyeleri ve Aktiviteleri Üzerine Etkisi	35
3.6 Doksisiklinin ve Selenyumun Diyabetik Sıçanlarda Damar MMP-9 Protein Seviyeleri ve Aktiviteleri Üzerine Etkisi	36
3.7 Doksisiklinin ve Selenyum Diyabetik Sıçanlarda Damar TIMP-4 Protein	37

Seviyeleri Üzerine Etkisi	
3.8 Doksisiklinin veya Selenyumun Diyabetik Sıçanlarda Doku Tiyo	38
Oksidasyon Seviyeleri Üzerine Etkisi	
3.9 Doksisiklinin ve Selenyumun Diyabetik Sıçanlarda Doku Nitrik Oksit	40
Seviyeleri Üzerine Etkisi	
4.TARTIŞMA	41
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
ÖZET	51
SUMMARY	52
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	64

ÖNSÖZ

Bu çalışma matriks metalloproteinazların diyabetle birlikte gelişen vasküler disfonksiyonlardaki rolünü değerlendirmektedir. Ayrıca bir MMP inhibitörü olan doksisisiklinin ve bilinen bir antioksidan olan selenyumun gelişen bu patogenezi geri çevirme kapasitelerini ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasının danışmanlığını üstlenen, çalışmamın gerçekleştirilmesi ve bireysel gelişimim için gerekli tüm olanakları sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Belma TURAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet UĞUR, Doç. Dr. Aslıhan KÖKSOY, Prof. Dr. Hakan GÜRDAL, Prof. Dr. Ogun ONARAN, Prof. Dr. Özlem UĞUR ve Uzm. Biyolog Ali KAYA' ya çok teşekkür ederim.

Karşılaştığım her türlü zorlukta hep yanımda olan sevgili arkadaşlarım Ali Aytaç SEYMEN ve Erkan TUNCAY' a çok teşekkür ederim, çalışmak zaten bir zevkken sizinle festival oldu, katkılarınız için minnettarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca Yurtiçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında beni destekleyen ve bu sayede akademik çalışmalarına konsantre olmama imkan sağlayan Türkiye Bilimsel Araştırma ve Teknoloji Kurumu TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman yanımda olan aileme ve özellikle; bana güvenen, vizyonumu genişleten, elde ettiğim ve edeceğim tüm başarılarda büyük katkısı olan değerli Hocam Prof. Dr. Beytiye ÖZGÜN'e gönülden şükranlarımı sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
AR	Adrenerjik Reseptör
AS	Adenilil Siklaz
ATP	Adenozin trifosfat
CaM	Kalmodulin
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat (Bir hücre içi ikincil mesajcı)
DAG	Diaçilgliserol
DM	Diyabet grubu
DM+DOXY	Bir ay boyunca doksisisiklin ile beslenen diyabet grubu
DM+SEL	Bir ay boyunca selenyum ile beslenen diyabet grubu
FORS	Forskolin(Adenilil Siklaz Aktivatörü)
GTP	Guanin trifosfat
IP ₃	İnositol-trifosfat
ISO	Isoproterenol (β -adrenerjik reseptör agonisti)
K	Kontrol grubu
MAPK	Mitojen Aktiviteli Protein Kinaz
mRNA	Mesajcı RNA
MMP	Matriks Metalloproteinazlar
PKA	Protein Kinaz A
PKC	Protein Kinaz C
PLB	Fosfolamban
PLC	Fosfolipaz C
PPI	Fosfolipid fosfoinositol
RIA	Radioimmunassay
SH	Tiyol Grubu
SR	Sarkoplazmik Retikulum
STZ	Streptozotocin
TIMP	Matriks Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri
α AR	α adrenerjik reseptörü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1 Düz kas kasılma-gevşeme sinyal iletim mekanizmaları.	4
Şekil 1.2 Damar tonusunu sağlayan sinyal yollarına genel bir bakış.	6
Şekil 1.3 MMP' lerin şematik yapıları.	8
Şekil 1.4 MMP-2' nin ekstraselüler ve intraselüler hedefleri.	9
Şekil 1.5 MMP-2' nin vasküler ton üzerine etkisi.	10
Şekil 1.6 Doksisiklinin kimyasal yapı formülü.	12
Şekil 1.7 proMMP' nin proteolitik ve oksidatif aktivasyonu.	13
Şekil 3.1 Endotelli damar şeritlerinde Fenilefrine karşı gösterilen kasılma cevapları.	27
Şekil 3.2 Endotelli damar şeritlerinden elde edilen yüzde gevşeme yanıtları.	29
Şekil 3.3 Endotelli damar şeritlerinden elde edilen yüzde gevşeme yanıtları.	30
Şekil 3.4 Endotelli damar şeritlerine kümülatif olarak uygulanan gevşetici ajanların EC₅₀ değerleri.	31
Şekil 3.5 Damar homojenatlarında ölçülen MMP-2 protein seviyesi ve aktivitesi.	32
Şekil 3.6 Damar homojenatlarında ölçülen MMP-9 protein seviyesi ve aktivitesi.	33
Şekil 3.7 Damar homojenatlarında ölçülen TIMP-4 protein seviyeleri.	34
Şekil 3.8 Damar şeritlerinde ölçülen cAMP değerleri.	36

Şekil 3.9 Damar şeritlerinde ölçülen yüzde cAMP değerleri.	37
Şekil 3.10 Toplam ve serbest SH seviyeleri.	39
Şekil 3.11 Doku nitrit seviyelerinin gruplara göre dağılımı.	40

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1 Deney grubunda bulunan hayvanların ağırlık ve kan şekeri değerleri.

1. GİRİŞ

1.1 Diyabetes Mellitus ve Tipleri

Kısaca diyabet olarak tanımlanan “Diyabetes Mellitus” pankreastan insülin salgılanmasının mutlak ya da nisbi eksikliği veya insülin etkisinin yetersizliği sonucu oluşan bir sendromdur (Larner ve ark., 1985).

Diyabetin başlıca iki tipi vardır. Tip I diyabet (insuline bağımlı diyabet, Juvenil tip diyabet) pankreasın beta hücrelerinin çeşitli etkenlerle tahrip olmasından kaynaklanmaktadır (Madsbad ve ark., 1983). Erişkin tip diyabet ya da insüline bağımlı olmayan diyabet olarak tanımlanan Tip II diyabet ise, insülin etkisine karşı belirgin bir direnç ile ve/veya glikoz, aminoasid gibi besinsel uyaranlara yanıt olarak insülin salgılanmasında bozuklukla ilişkili olan bir hastalıktır. Bu tip diyabetin oluşumundaki nedenler şu şekilde sıralanabilir;

- a) Beta hücreleri üzerindeki glukoz reseptörlerinde meydana gelen bir bozukluk sonucu glukoz aracılığıyla glukoz reseptörlerin uyarılmasına bağlı olarak oluşan insülin salgılanmasının azalması (De Fronzo ve Ferranninni, 1982),
- b) Beta hücresine giren glukozun öteki stimulanların insülin salıverici etkilerini güçlendirme yeteneğinin azalması (Champbell ve ark., 1984),
- c) İnsülin reseptörlerinin sayısının azalması (Weir ve ark., 1982).

Yapılan istatistikler Tip II diyabetin genellikle obezite ve kalıtımla ilişkili olduğunu göstermiştir (Porte ve ark., 1981).

1.2 Deneysel Diyabet

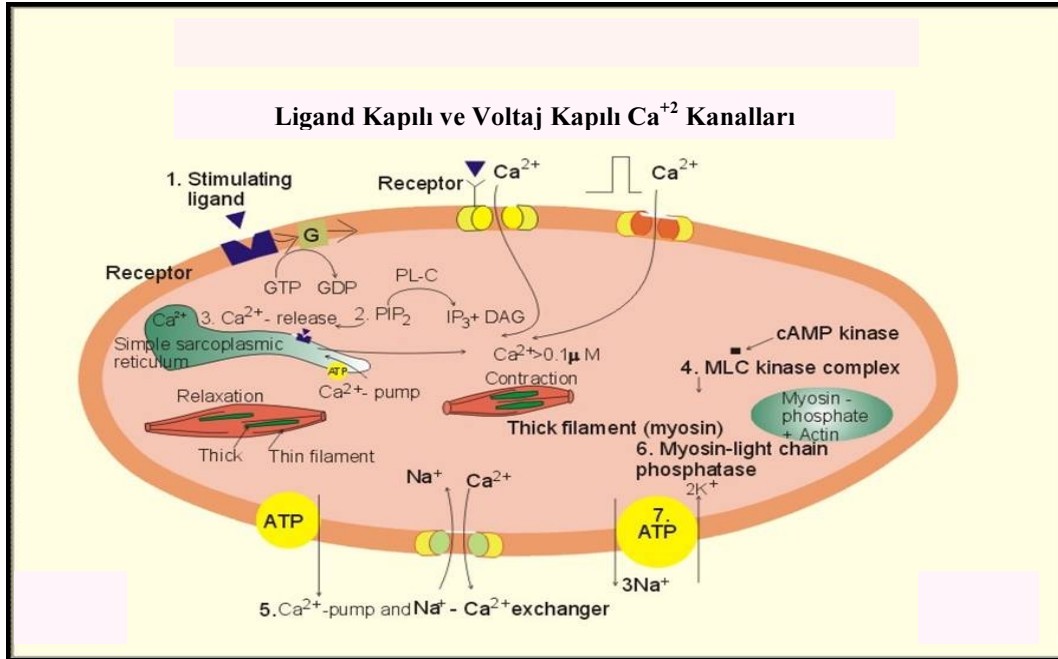
Diabetes Mellitus'daki en önemli hormonal bozukluk mutlak ya da nisbi insülin eksikliğidir. Deneysel diyabet, pankreotektomi ya da pankreasın beta hücrelerinin tahrip edilmesiyle yapılabilir. Hemen hemen bütün hayvan türlerinde

kalıcı bir diyabet oluşturmak için pankreasın % 80' inden fazlasını almak gerekmektedir (Lukens ve ark., 1937). Buna ek olarak hayvanlarda deneysel diyabet oluşturmak için kimyasal maddelerden de yararlanılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanları alloxan ve streptozotosindir. Rakieten ve arkadaşları 50 mg/kg streptozotosinin intravenöz uygulamasının sıçan ve köpeklerde kalıcı bir diyabet oluşturduğunu saptamışlardır (Rakieten ve ark., 1963). Streptozotosinin diyabetojenik etkisi pankreasın beta hücrelerini selektif olarak tahrip etmesinden kaynaklanmaktadır.

1.3 Diyabetin Vasküler Sistem Üzerine Etkileri

Diabetes Mellitus' daki morbitide ve mortalitenin temel nedeni hipertansiyon ve koroner kalp hastalıkları gibi kardiyovasküler bozukluklardır (Garcia ve ark., 1974). Diyabette görülen yapısal ve fonksiyonel kardiyovasküler bozukluğun nedeni tam olarak anlaşılamamış olmasına karşın, bunun en azından kısmen nörotransmitter ve hormonlara karşı damar reaktivitesindeki değişikliklerden kaynaklandığı öne sürülmüştür (Weidmann ve ark., 1976). Bilindiği gibi damarlardaki post sinaptik alfa-adrenerjik reseptörlerin stimülasyonu vazokonstriksiyonla sonuçlanmaktadır (Legan ve ark., 1985). Çok sayıdaki damar yatağında noradrenalinin vazokonstriktör etkisine hem alfa-1 hem de alfa-2 adrenerjik reseptörlerin aracılık ettiği gösterilmiştir (Scarborough ve ark., 1982). Seçici alfa-1, alfa-2 agonistlerin ve nonselektif etkili noradrenalinin damarlarda kasılma doz-yanıt eğrilerinin iki fazlı olarak ortaya çıkmasına neden oldukları gözlenmiştir (Scarborough ve ark., 1984). Damar yatağında noradrenalin ile stimüle edilen kasılmalar, kısa sürede gelişen (fazik) komponentinin dihidropridin türevi Ca^{2+} antagonisti nifedipine duyarlı olmadığı ve hücre içi kalsiyum ($[Ca^{2+}]_i$) mobilizasyonu ile ilişkili olduğu, öte yandan kasılmanın daha sonra ve daha yavaş olarak gelişen (tonik) komponentinin ise ekstrasellüler Ca^{2+} hücre içine girişi ile ilişkili olduğu ve bu yanıtın nifedipin ile bloke edilebildiği gösterilmiştir. Bu olaylardan ilki hücre içi depolarda bulunan Ca^{2+} serbest hale geçmesiyle, ikincisi ise ekstrasellüler Ca^{2+} voltaja bağımlı ya da reseptör aracılı kanallar yoluyla hücre

içine girmesiyle ilişkilidir (Bolton ve ark., 1979). Damar düz kasında noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının fosfotidilinozitol (PI) döngüsü ile ilişkili olduğu konusunda önemli kanıtlar bulunmaktadır (Abebe ve ark., 1990). Son yıllarda yapılan çalışmalar, serotonerjik, M₂ muskarinik, alfa-1 adrenerjik ve öteki bazı reseptörlerin agonistler ile aktivasyonu sonrasında damar düz kas hücresi membranında bulunan fosfolipaz-C'nin aktivasyonuna bağlı olarak fosfotidilinozitol-4,5-bifosfat(PIP₂)' in hidroliz olduğu gösterilmiştir (Rapaport ve ark., 1987). PIP₂' nin hidrolizi sonucu 1,2 diaçilgliserol ve inositol-1,4,5-trifosfat(IP₃) oluşmaktadır. Hidrofilik karakterde olan IP₃, sitoplazma içine salınarak burada özellikle [Ca²⁺]_i arttırarak çeşitli mekanizmalara aracılık etmektedir. Lipofilik özellik gösteren diaçilgliserol ise hücre membranında etkin olup membrandaki Na⁺/H⁺ kotransport sisteminin kontrolünde rol oynayan kalsiyum bağımlı protein kinaz-C' yi aktive etmektedir. Bu aktivasyonla çeşitli hedef proteinlerin fosforillenmeleri suretiyle bu proteinlerin fonksiyonlarının düzenlenmesi sağlanmaktadır (Legan ve ark., 1989; Lucchesi ve ark., 1989). Hücre içindeki serbest kalsiyum, miyozin hafif zincir kinazı aktive etmek için kalmodulin ile kompleks oluşturmaktadır. Kalsiyum-kalmodulin bağımlı protein kinazların miyozin hafif zincir kinazları fosforile etmesi sonucu damar düz kasındaki fazik kasılmalar gerçekleşmektedir. Bir diğer ikinci haberci olan diaçilgliserolün damar düz kası kontraksiyonunda gerekli olan bir dizi fosforilasyon olaylarını başlatmak için protein kinaz-C' yi aktive etmesiyle noradrenalinin damar düz kasındaki tonik yanıtları oluşmaktadır (Legan ve ark., 1985) (Şekil 1.1). Çok sayıda araştırmacı streptozotosin ile diyabet yapılmış deney hayvanlarında vasküler yanıtlardaki değişiklikleri ve bu değişikliklerin olası mekanizmalarını yoğun bir şekilde araştırmışlardır. Ne var ki bu alanda şimdiye dek yapılan araştırmalardan çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bir grup araştırmacı diyabette farmakolojik vasküler reaktivitenin azaldığını öne sürerken (Christlieb ve ark., 1976; Sullivan ve ark., 1979) öteki bir grup ise arttığını bildirmiştir (Brody ve ark., 1979). Sonuçlar arasındaki bu farklılığın kullanılan hayvan türü ve cinsiyeti, kullanılan diyabetojenik madde, diyabet kalma süresi ve şiddeti, incelenen damar preparatı ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür.

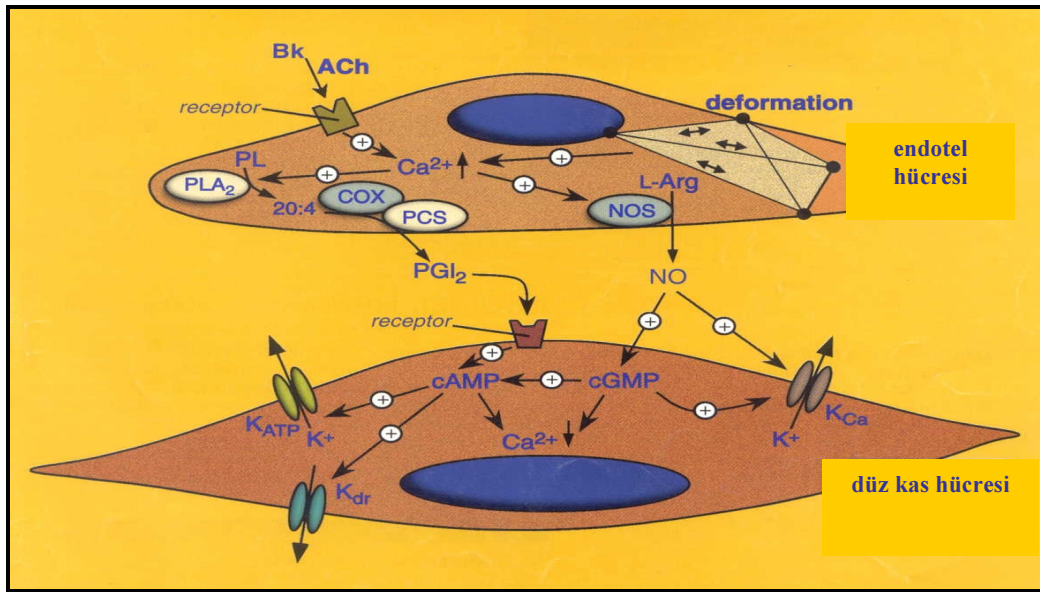


Şekil 1.1 Düz kas kasılma-gevşeme sinyal iletim mekanizmaları. (www.cvphysiology.com).

Bilindiği gibi diyabet kronik hiperglisemi ve genellikle hiperinsülinemiyle karakterizedir. Her iki durumda da diyabetin kardiyovasküler komplikasyonları için birer potansiyel risk faktörü olduğu ve böylelikle vasküler yaralanma ve disfonksiyona sebebiyet verdiği bilinmektedir (Schmid ve ark., 1994). Endotel hücrelerinin çeşitli nedenlerden (hiperglisemi, hiperlipidemi, hiperinsülinemi veya bunlara bağlı olarak gelişen serbest radikal miktarlarının artışı v.b.) ötürü fonksiyonel olarak hasara uğramasıyla meydana gelen patolojik durum endotelial disfonksiyon adını almaktadır. Endotelium disfonksiyonuna neden olan en önemli etmen kan glukoz konsantrasyonlarının artmasıdır. Yapılan bir araştırmada endoteliuma bağlı gevşemelerin aort dokusunun altı saat boyunca yüksek glukoz içeren ortamda bekletilmesiyle bozulduğu, bu bozulmanın ise süperoksitdismutaz (SOD) ve katalaz gibi antioksidan bileşiklerin ortama katılmasıyla önlendiği gösterilmiştir (Tesmafiarim ve Cohen, 1992). Bu sonuç bize hiperglisemi nedeniyle organizmada konsantrasyonları artan serbest radikallerin endotelium disfonksiyonu oluşturduğunu göstermektedir.

Vasküler endotel hücreleri arterial kan akımını ve kan basıncını çeşitli vazoaaktif maddeler; prostasiklinler (Moncada ve ark., 1978), endotel kaynaklı gevşetici faktör (Furchgott ve Zawadzki, 1980; Palmer ve ark., 1987) ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (Feletou ve Vanhoutte, 2000; McGuire ve ark., 2001) salarak düzenlerler. Damar da nitrik oksit (NO) ana endotel kaynaklı gevşetici ajan olarak bilinmektedir. NO için primer reseptör soluble guanilat siklazın (sGC) heme bölgesidir. NO bağlanmasıyla aktive olan sGC hücre içi guanozin 3',5'-siklik monofosfat (cGMP) düzeylerinin artmasına neden olur bu sayede de cGMP bağımlı protein kinaz-G (PKG) aktive olarak hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu düşürülür ve damar gevşemesi sağlanır (McDonald ve Murad, 1995) (Şekil 1.2). Nitrik oksit vazodilatasyonu arttırarak, platelet agregasyonunu inhibe ederek, lenfositlerin adhezyonunu ve düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek kardiyovasküler fonksiyonları düzenlemektedir (Rubanyi ve ark., 1993). Bu sebeple disfonksiyon gösteren bir endotel; bozulmuş antikoagülan, antiinflamatuvar cevap, vasküler büyüme ve vasküler remodelling ile karakterizedir. Fakat endotel disfonksiyonu ile karakterize edilen ve en çok kabul gören bozukluk; NO biyoyararlanım/biyoaktivite oranında görülen azalmaya bağlı olarak gelişen endotel bağımlı gevşeme yanıtlarındaki bozulmadır (DeVriese ve ark., 2000).

Diyabete bağlı olarak gözlenen hipergliseminin vasküler disfonksiyon oluştururken kullandığı mekanizmalar; nonenzimatik glikolizasyon (Bucala ve ark., 1991; Vlassara ve ark., 1992), oksidatif stres (Giugliano ve ark., 1996; Laight ve ark., 2000), diaçilgliserol ve protein kinaz-C yollarının aktivasyonu (Williams ve ark., 1997; Koya ve King, 1998; Hink ve ark., 2001) ve poly (ADP-riboz) polimeraz aktivasyonu (Garcia ve ark., 2001) şeklinde sıralanabilir. Tüm bu biyokimyasal değişimlerin “uncoupled NOS” fenomeninden kaynaklandığı düşünülmektedir. Endotelial nitrik oksit sentazın eşlenememe durumu, oksidatif stresin ve endotelial disfonksiyonun artmasına en azından üç mekanizma üzerinden yol açabilir. Bunlar; enzimatik nitrik oksit üretiminin azalması, enzimatik süperoksit üretiminin artması ve peroksinitrit üretimi yoluyla tetrabiyopterin (BH_4) oksitlenmesi şeklinde sıralanabilir (Katusic ve ark., 2001).



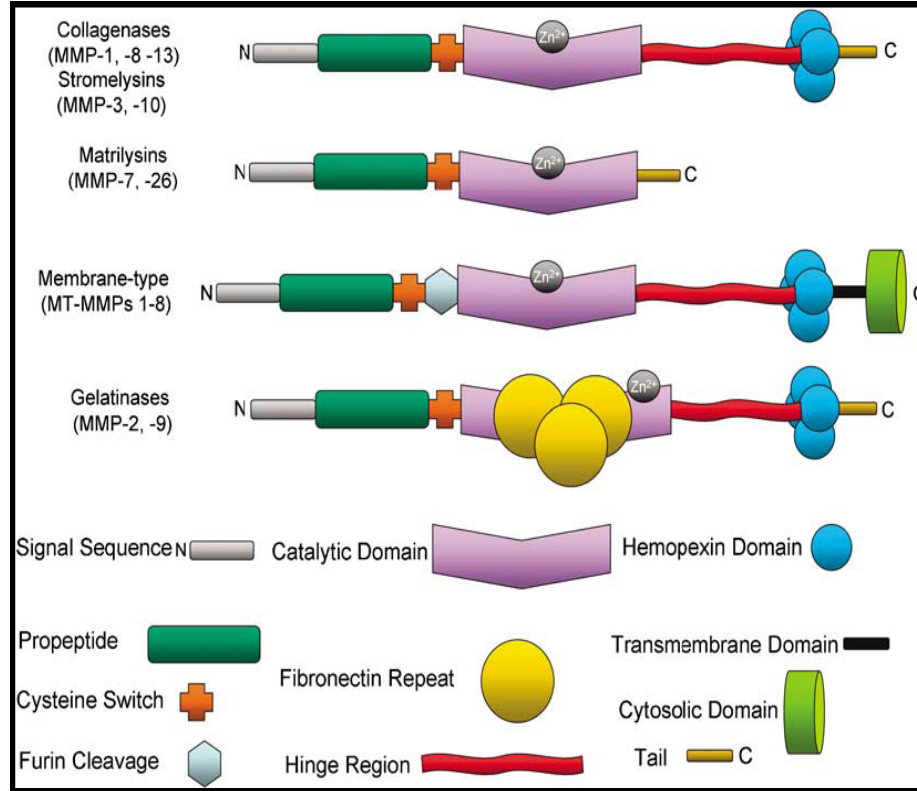
Şekil 1.2 Damar tonusunu sağlayan sinyal yollarına genel bir bakış. (www.mona.uwi.edu).

1.4 Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar (MMP) ekstraselüler matriksin çeşitli bileşenlerini degrade edebilen çinko içeren endopeptidaz grubu proteazlardır. Omurgalılarda yirminin üzerinde MMP tanımlanmıştır (Nagase ve ark., 1999). MMP' ler genel olarak latent proenzim olarak üretilirler ve aktive olmaları için proteolitik işleminden geçmiş olmaları gerekir (Rundhaug ve ark., 2005; Visse ve ark., 2003). Matriks metalloproteinazlar yapısal ve/veya substrat özelliklerine göre kendi içlerinde en az 5 alt gruba ayrılır. MMP' lerin en basit yapısal alt sınıfı matrilisindir; bir sinyal peptid, bir propeptid domain ve çinko bağlayıcı alanı kapsayan katalitik domainden oluşmaktadırlar (Visse ve ark., 2003). Kollajenazlar; tip I, II, III ve diğer fibriller kollajenlerin doğal sarmal yapılarını degrade eden, prolinden zengin menteşe bölgesi vasıtasıyla katalitik domaine bağlanmış basit hemopexin benzeri domain içeren küçük domain yapılarını bulundurulur (Lee ve ark., 2004). Jelatinazlar katalitik domainleri içinde fibronektin tip-II' nin üç kez tekrarını içeren ek bir bölge içerirler (Şekil 1.3). Bu onlara jelatin ve aynı zamanda tip-IV, V, VII ve X kollajen, fibronektin ve laminini degrade edebilmeleri için bir üstünlük sağlar (Allan ve ark., 1995).

Katalitik domainler tek başlarına diğer substratlara karşı proteolitik aktiviteyi sağlarken, hemopeksin domaini kollajenazların üçlü sarmal interstitiyal kollajenleri toplaması için gereklidir. Katalitik ve hemopeksin domainleri bağlayan prolinden zengin bağlayıcı peptidin fonksiyonu bilinmemekle birlikte moleküler modellemeye dayanarak üçlü sarmal kollajenle etkileştiği varsayılır (Nagase ve ark., 1999). Matriks metalloproteinazlar bir kez aktive oldukları zaman bütün ekstraselülmatriks komponentlerini tamamiyle degrade edebilirler, bu yüzden bu enzimlerin aktivitesi sıkı kontrol altında tutulur. Bu kontrol mekanizması transkripsiyon, latent proenzimlerin aktivasyonu ve proteolitik aktivitenin inhibisyonu olmak üzere üç seviyede çalışır (Dollery ve ark., 1995).

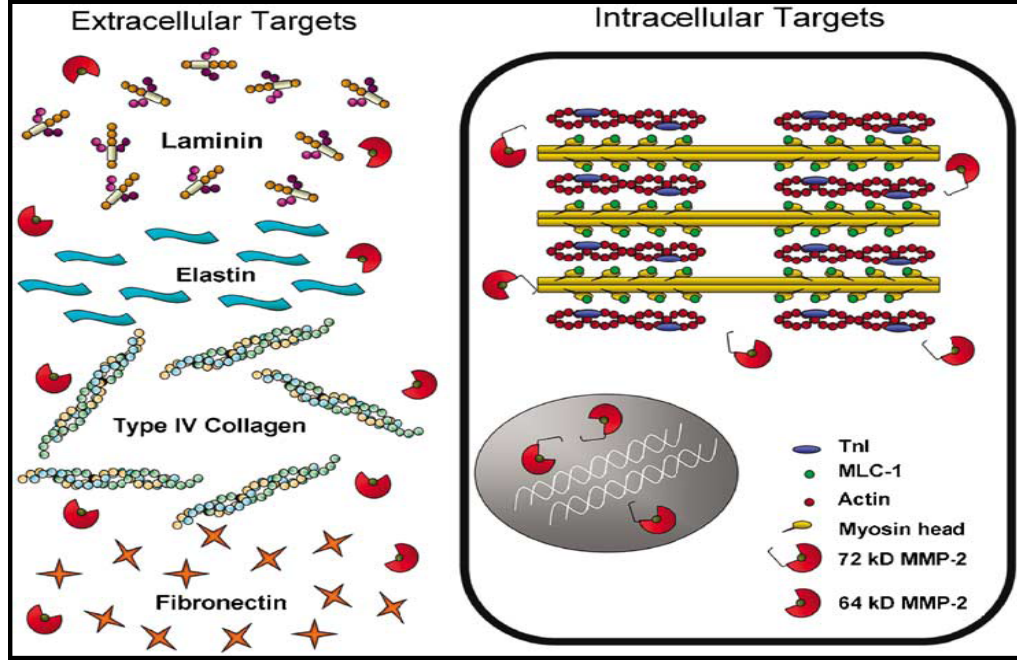
MMP' ların tümü latent pro-enzim olarak üretilirler. Aktif merkezde bulunan bir çinko atomu katalitik aktiviteden sorumludur. Bu metal, propeptitdeki eşlenmemiş sistein rezidüsünü kordine eder. Her enzim amino terminalindeki propeptit ile beraber salgılanır ve bu bölgenin proteolizi sonucu aktif hale gelir. Sistein-çinko bağlantısının fiziksel ya da kimyasal yollarla bozulması MMP' ların ilk aktivasyon basamağıdır. Sistein-çinko etkileşiminin bozulması sonucu çinko aktif merkezde açıkta kalarak substratlardaki duyarlı bağları hidrolize eder. Bu süreç "sistein değişimi" olarak adlandırılmaktadır. Son derece potent olan bu endopeptidazların regülasyonunda çeşitli sitokinler, büyüme hormonları, perisellüler ortam, hücre matriks ilişkisi ve ekstraselülmatriks rol oynar. Bu enzimlerin ekstraselüler aktivasyonlarının kontrolünde endojen inhibitörleriyle olan ilişkileri de oldukça önemlidir. Özgül doku inhibitörleri olan bu moleküller (TIMP-1, -2, -3, -4) metalloproteinazların aktif ve inaktif formlarına sıkı bir şekilde bire bir bağlanırlar (Chakrabort ve ark., 2003; Luttun ve ark., 2004; Malemud ve ark., 2006; Mancini ve ark., 2006; Moehler ve ark., 2003; Rundhaug ve ark., 2005; Stamenkovic ve ark., 2003; Sternlicht ve ark., 2001; Tai ve ark., 1998; Visse ve ark., 2003).



Şekil 1.3 MMP' lerin şematik yapıları. (Chow ve ark., 2007).

Matriks metalloproteinazlar, lökositler, keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler, düz kas hücreleri gibi epitelyal ve mezenkimal kökenli hücreler tarafından sentezlenirler. Pek çok MMP embriyogenez aşamasında yaygın olarak eksprese edilir. Yetişkinlerde ise plasentada, endometriyumda, meme bezlerinin involüsyonu esnasında ve inflamasyonda hızla eksprese edilirler. Matriks metalloproteazlar fötal doku gelişimi, blastokist implantasyonu, organ morfogenezini, uterus ovülasyonu, kemik rezorbsiyonu, yara iyileşmesi ve programlanmış hücre ölümü gibi pek çok fizyolojik olayda rol almalarının yanı sıra periodental hastalıklar, otoimmün deri hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, nefrit, nörolojik hastalıklar, kan-beyin bariyerinin yıkılması, osteoartrit gibi patolojik olaylarda da önemli yer tutarlar (Vespaget ve ark., 1998; Walokovits ve ark., 1992; Fabunmi ve ark., 1996). Son çalışmalar metalloproteinazların sanıldığı gibi sadece hücre dışında bulunmadığını aynı zamanda hücre içinde de görev aldığını ortaya konmuştur. Hücre içinde özellikle

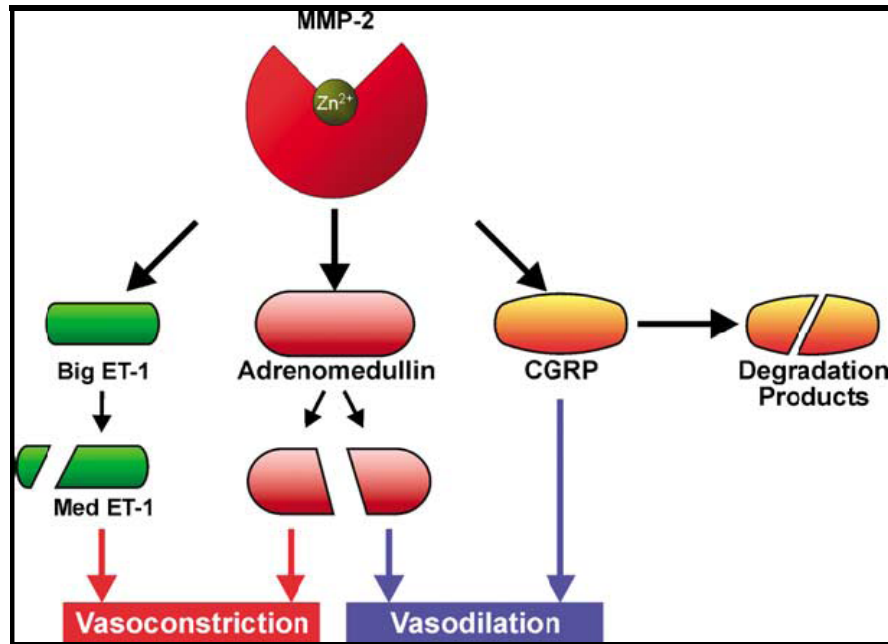
aktin-miyozin etkileşmesinde rol aldığı düşünülmektedir (Wang ve ark., 2002)(Şekil 1.4).



Şekil 1.4 MMP-2' nin ekstraselüler ve intraselüler hedefleri. (Chow ve ark., 2007).

1.5 MMP' lerin Vazoaktif Etkileri

Proteolitik olarak aktifleşmiş MMP'ler çeşitli substratları parçalayarak bazı vazoaktif maddelerin oluşumuna neden olurlar. Örneğin MMP-2 büyük (big) Endotelin-1 mediatörünü parçalayarak vazokonstriktör bir peptid olan orta (medium) Endotelin-1' in oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Fernandez-Patron ve ark., 1999). Yine aynı araştırma grubu MMP-2' nin kalsitonin gene related peptidi parçalayarak onun vazodilatör etkisini ortadan kaldırdığını göstermişlerdir (Fernandez-Parton ve ark., 2000). Ayrıca Martinez ve ark. MMP-2' nin vazodilatör bir peptid olan adrenomedullini parçalayarak vazodilatör ya da vazokonstriktör etkiye sahip farklı ürünler oluşturduğunu göstermişlerdir (Martinez ve ark., 2004). Tüm bu veriler ışığında MMP-2' nin proteolitik aktivitesi sonucunda dolaylı yoldan vasküler tonunun düzenlenmesinde rol aldığı anlaşılmaktadır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 MMP-2' nin vasküler ton üzerine etkisi. (Chow ve ark., 2007).

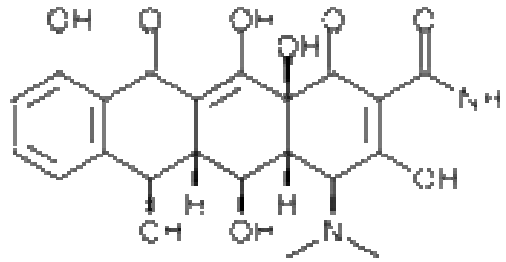
Son yıllarda yapılan bir çalışmada MMP-2 ve -9 Ca^{2+} hücre içine girişini engelleyerek vazodilatasyona neden olduğu rapor edilmiştir (Chew ve ark., 2004). Bu deneyde fenilefrin ya da KCl ile kastırılmış damar şeritleri üzerine rekombinant MMP-2 ve -9 eklenerek gevşeme yanıtı gözlenmiştir. Buna ek olarak, gevşeme etkisinin matriks yapısına yönelik bir enzimatik işlem ile ilişkili olup olmadığını test etmek amacıyla elektron mikroskobu yardımıyla ekstraselüler matriks incelenmiş fakat herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Gözlenen bu cevabın endotelde bulunan ve protezlar tarafından aktive edilen bir reseptörün uyarımı sonucunda NO üzerinden gerçekleşen gevşeme yolağını kullanarak ortaya çıkmış olabileceği ileri sürülmüştür. Paralel olarak, başka bir çalışmada MMP-2' nin pulmoner düz kas hücresi plazma membranında bulunan Ca^{2+} -ATPaz aktivitesini upregüle ettiği gösterilmiştir ve bu sayede $[Ca^{2+}]_i$ ayarlanmasını regüle ettiği öne sürülmektedir (Mandal ve ark., 2003). İlginç bir sonuç, MMP-2' nin yukarıdaki etkilerinin okside edici ajanlarla sinerjistik etki göstermesidir (Das ve ark., 2002). Tüm bu veriler MMP' lerin vazodilatör etkilerini Ca^{2+} kontrolü üzerinden sağlıyor olabileceğini göstermektedir.

MMP' ler vasküler tonun düzenlenmesinde sinyal yollarını etkileyebilme özellikleri yoluyla rol oynamaktadırlar. Jeyabalan ve ark. sıçan renal arterleri üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda MMP-9 aktivasyonunun relaksinin sağladığı ve gevşeme yanıtına katkı da bulunduğunu göstermişlerdir (Jeyabalan ve ark., 2007). Sıçan mezenterik arterlerinde yapılan çalışmalarda da farklı G-protein kenetli agonistlerin MMP aktivasyonu aracılığıyla kasılma yanıtına neden oldukları düşünülmüş bu etkinin ise epidermal büyüme faktörü reseptörünün aktivasyonu ve/veya mitokondriyel ROS artışı sonucunda oluştuğu düşünülmektedir (Hao ve ark., 2004; 2006).

1.6 Tetrasiklinler

Tetrasiklinler bakteriyostatik etkili maddelerdir, tetrasiklinlerin bu etkisi bakteri hücreindeki ribozomların 30S alt ünitelerine tersinir bir şekilde bağlanarak protein sentezi inhibisyonuyla meydana gelmektedir (Dökmeci, 2000). Ancak günümüzde yapılan son çalışmalar, doksisisiklin (doxycycline) ve diğer tetrasiklin türevlerinin güçlü MMP inhibitörü olduklarını ve antibiyotik etkileri dışında birçok hücresel fonksiyonu etkileyen pluripotent ilaçlar olduklarını göstermiştir (Golub ve ark., 1998). Kimyasal olarak modifiye edilmiş tetrasiklinler ile yapılan çalışmalar antibiyotik ve anti-MMP etkisinin molekülün farklı bölgelerinde olduğunu göstermiştir. Buna göre tetrasiklinlerin antibiyotik etkileri A halkasının karbon-4 pozisyonundaki dimetilamino grubunda, anti-MMP aktivitesi karbon-12 hidroksil ve karbon-11 karbonil oksijen grubunda bulunmaktadır (Bendeck ve ark., 2002). Tetrasiklinlerin anti-MMP aktivitesine dayanarak yapılan çalışmalarda doksisisiklin (Şekil 1.6) ve diğer tetrasiklinlerin damar intima kalınlaşmasını azalttığı (Bendeck ve ark., 2002; Bendeck ve ark., 1996; Loftus ve ark., 1999), aortik anevrizma (Thompson ve ark., 1999; Curci ve ark., 2000), periodontal hastalık (Bazerra ve ark., 2002), artritide doku yıkımını azalttığı (Steinmeyer ve ark., 1998), tümör hücre invazyonu, tümör metastazı (Selzer ve

ark., 1999; Seftor ve ark., 1998) ve tümör angiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (Tamargo ve ark., 1991).



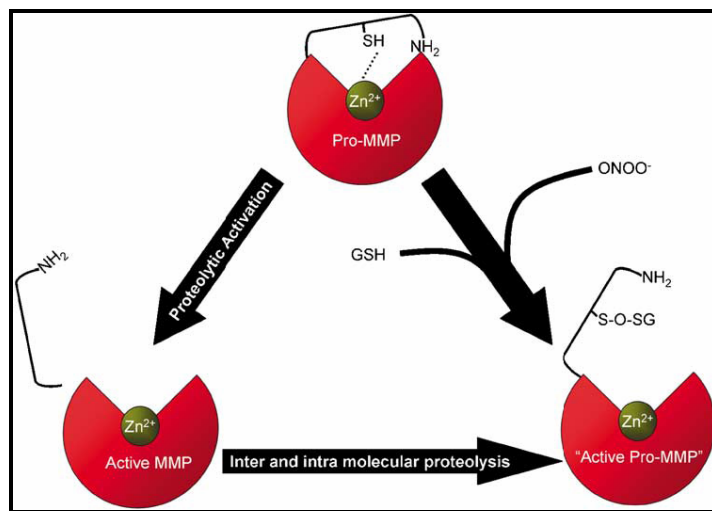
Şekil 1.6 Doksisiklinin kimyasal yapı formülü (<http://upload.wikimedia.org>).

Tetrasiklinlerin aynı zamanda makrofajlar ve mezengial hücrelerdeki nitrik oksit sentezi için mRNA'nın destabilizasyonunu ve salınımını inhibe ettiği ve tümör nekrozis faktör- α ve reaktif oksijen türlerini azalttığı gösterilmiştir (Golub ve ark., 1998).

1.7 Diyabet ve MMP ilişkisi

Kollajen, memelilerde en çok bulunan proteindir ve bağ dokularına gerilme kuvveti, organizasyon ve bütünlük sağlar. Benzer olarak tüm doku tamirinin güç ve bütünlüğü, kollajenin çapraz bağlanmasına ve deposizyonuna dayanır (Carrico ve ark., 1984; Spanheimer ve ark., 1988). Diyabetli hastalarda artmış kollajenaz aktivitesi gözlenir, kollajen aşırı şekilde yıkılır ve yetersiz olarak yerine konur. Bu yıkımdan büyük ölçüde kollejenazlar sorumludur (Golub ve ark., 1985). Son yıllarda, tetrasiklinlerin subantimikrobiyal dozlarda kollejenaz inhibisyon aktivitesinin bulunmasıyla birlikte (Yu ve ark., 1993; Creamer ve ark., 1991) pek çok çalışmada tetrasiklin tedavisinin etkisi in vivo olarak da incelenmiş ve sonuç olarak; diyabetik sıçanların dişetleri ve derilerinde patolojik olarak artmış kollejenaz aktivitesini azalttığı gözlenmiştir. Sıçan lökositleri ve tavşan kondrositlerinde yapılan in vitro çalışmaların sonucunda ise tetrasiklinlerin kollejenaz aktivitesini direkt olarak inhibe ettiği bulunmuştur (Golub ve ark., 1985). Diğer yandan diyabetli olanlarla olmayan insanlar üzerinde yapılan bir

çalışmada, kollejenaz aktivitesinin minosiklin tedavisinin başlatılmasından bir hafta sonra oldukça azaldığı ancak penisilin uygulamasının etkisiz kaldığı gözlenmiştir (Golub ve ark., 1983). Uemura ve arkadaşları ise diyabetik sıçanlarla yaptıkları deneyler sonucunda MMP-9 aktivitesinin diyabetik damarlarda arttığını göstermiş ve bu artışın hiperglisemi tarafından tetiklenen oksidatif stresin, enzimin ekspresyon aşamasına etkisi sonucunda gözlendiğini göstermişlerdir (Uemura ve ark., 2001). Okamoto ve ark. MMP-1, 8 ve 9' un propeptid domainin ayrılması gerçekleşmeksizin peroksinitrit tarafından aktive edilebildiklerini göstermişlerdir (Okamoto ve ark., 1997; 2001) (Şekil 1.6). Buna karşın Owens ve ark. yüksek doz peroksinitrit varlığında ($>100\mu\text{M}$) MMP aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir (Owens ve ark., 1997). Rajagopalan ve grubu ise bu azalmanın tirozin bölgelerinin nitrasyonu sonucu gerçekleşmiş olabileceğini önermişlerdir (Rajagopalan ve ark., 1996). Son yıllarda gerçekleştirilen paralel çalışmalarda 72 kDa' luk full length insan rekombinant MMP-2'sinin $0,3-10\ \mu\text{M}$ konsantrasyonlarında peroksinitrit uygulamasıyla aktive olduğunu ancak $100\ \mu\text{M}$ konsantrasyonunda bu aktivasyonun yerini inhibisyona bıraktığı gösterilmiştir (Viappianni ve ark., 2006). Ayrıca MMP' lerin doku inhibitörlerinden olan TIMP-4' ün özellikle oksidatif hasara karşı koruyucu cevap olarak, ekspresyon düzeyinde artış gösterdiği düşünülmektedir (Schulze ve ark., 2003; Cox ve ark., 2004).



Şekil 1.6 proMMP'nin proteolitik ve oksidatif aktivasyonu. (Chow ve ark., 2007).

1.8 Selenyum ve Vasküler Sistem Üzerine Etkileri

Selenyum, serbest radikallerin üretimini önlemek için gerekli olan, doymamış yağ asitlerinden türeyen peroksidleri yok ettiği düşünülen glutatyon (GSH) peroksidaz enziminin aktivitesinin sağlanması için önemli bir kofaktördür (Rotruck ve ark., 1973). Selenyumun GSH peroksidazın aktif bölgesinde olduğuna dair ilk bilgiler Rotruck ve arkadaşları tarafından selenyum eksikliği bulunan sıçan eritrositlerinde peroksitin yol açtığı hemolizin ileri derecede şiddetlendiğinin gösterilmesi ile saptanmıştır (Schweizer ve ark., 2004). GSH peroksidaz karaciğer, böbrek, eritrosit, damar endotel tabakası, gözün lensi başta olmak üzere birçok hücrede bulunmakta ve hücre membranı ile hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruduğu kabul edilmektedir (İtegin ve ark., 2002; Gupta ve ark., 2003; Arteel ve ark., 2001). Selenyum eksikliği, serbest radikallerin birikimine bağlı hücre membranlarının hasarı ile birlikte seyreder. Selenyum bileşikleri hücre siklusundaki regülör proteinler, sinyal molekülleri, proteazlar, mitokondri ile ilişkili faktörler, transkripsiyonel faktörler, tümör supressor genler, poliamin ve glutatyon seviyelerinin ekspresyonları ve/veya aktivitelerini düzenlerler (Burk ve ark., 2003).

Vasküler yanıtlar açısından selenyumun fonksiyonunu araştırmaya yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda, sodyum selenitle beslenen ratlarda asetilkolin uyarımına karşı elde edilen gevşeme cevabının arttığı gözlenmiştir ve bu artışın nitrik oksit üretimindeki aktivasyona bağlı olduğu öne sürülmüştür. Aynı çalışmada organ banyosuna direkt olarak selenyum, glutatyon yada glutatyon peroksidaz eklenmesinin yanıtlarda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (Lu ve ark., 2004). Damar fonksiyonlarının düzenlenmesinden büyük katkısı olan endotel tabakası üzerine selenyumun etkisinin araştırıldığı çalışmalarda ise endotel hücreleri üzerine sitotoksik etki gösteren okside LDL' nin elimine edilmesinde glutatyon bağımlı selenoperoksidazların önemli rol oynadığı in vivo çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca in vitro çalışmalarda da kültüre edilmiş endotel hücrelerin medyasında selenyum eksikliği durumunda okside LDL' nin

toksik etkisinin yeterli miktarda selenyum ihtiva eden medyada yetişen hücrelere oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir (Thomas ve ark., 2003). Son yıllarda yapılan bir çalışmada selenyumla beslenmiş ratlarda kolesterol oksitlerin damar duvarında gerçekleştirdikleri yıkıcı etkilerinin deprese olduğu ve bu sayede ateroskleroz gelişiminin baskılandığı gösterilmiştir (Wu ve ark., 2007). Kardiyovasküler etkilerinin ötesinde selenyumun pek çok hücre içi sinyal yolağında düzenleyici olarak rol aldığına ve özellikle belirli hastalıkların patogeneğinde koruyucu rol oynadığına dair çeşitli çalışmalar vardır, bu çalışmalardan birinde araştırmacılar insan trabeküler hücrelerini 1-10 μ M konsantrasyonları arasında 24 saat boyunca inkübe etmeleri sonucunda konsantrasyona bağlı olarak MMP-2 ve TIMP-1 sekresyonunda ve ERK1/2 fosforilasyonunda azalma olduğunu gözlemişlerdir. Bu inhibitör etkisiyle selenyumun kanser metastaz ve invazyonunu belirli ölçülerde kontrol ettiği düşünülmektedir (Conley ve ark., 2004).

1.9 Diyabet-Selenyum İlişkisi

Deneyssel diyabet modellerinde selenyumun diyabetik hayvanların kan şekerini düşürdüğü, ayrıca sıvı tüketimlerini, ağırlık artışlarını ve bazı biyokimyasal parametrelerini normalleştirebildiği bildirilmiştir (McNeill ve ark., 1991; Ghosh ve ark., 1994). Son yıllarda yapılan in vivo ve in vitro araştırmalarda selenyumun pek çok insülin benzeri aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Ezaki ve ark., 1990). Bu aktiviteler; glikoz alımının stimülasyonu, glikolizis ve glikoneogenezis, yağ asidi sentezi ve pentoz fosfat yolu gibi metabolik olayların düzenlenmesi olarak sayılabilir. Bu etkileri açıklayabilmek için çeşitli olası mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunun yanında selenyum, bir büyüme faktörü gibi etki göstermekte ve insülinin yapıtaşına benzer metabolik değişiklikler yapabilmektedir (Ezaki ve ark., 1990). Bir başka deyişle, insülin yokluğunda da insüline benzer değişiklikler yapabilmekte, ya da insülinin reseptörünün duyarlılığını arttırmaktadır (Ezaki ve ark., 1990; Ayaz ve ark., 2002). Diyabette serbest yağ asitleri ve serbest radikal türevli çeşitli oksidanların arttığı, bu artışın pek çok sistemik bozukluklara neden

olduğu bilinmektedir (Reusch ve ark., 2003; Das ve ark., 2002). Selenyumun antioksidan sistemdeki bilinen belirgin rolü sayesinde diyabette gözlenen patolojileri düzeltebilmesi olasıdır. Tip 1 diyabetik hastalarda kontrol grubuna göre eritrositlerdeki selenyum konsantrasyonunun belirgin olarak düştüğünün bildirilmesi de bu savı destekler niteliktedir (Kruse-Jarres ve Rukgauer, 2000).

1.10 Çalışmanın Amacı

Matriks metalloproteinazlar ve inhibitörleri arasındaki ilişki fizyolojik dengelerin sağlanması açısından oldukça önemlidir. Birçok hastalığın patogeneğinde bu dengenin MMP'ler lehine bozulmasının rol oynadığı gösterilmiştir. Orbe ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen hayvan ve insan deneyleri sonucunda aterosklerotik plak gelişiminde MMP-9 ve MMP-3' ün rolü olduğu gösterilmiştir (Orbe ve ark., 2003). Yine miyokardial enfarktüsden bir saat kadar sonra MMP'lerin oranlarının dramatik olarak arttığı, bunu takiben lokal sitokinlerin aktivasyonunun ve inflamasyon hücrelerinin infiltrasyonunun arttığı gözlenmiştir (Tyagi ve ark., 1996). Çeşitli deneysel kardiyovasküler sistem hastalıklarında MMP inhibitörlerinin kullanımıyla bozulan parametrelerde normale dönüş gözlenmiştir (Creemers ve ark., 2001). Rodhe ve arkadaşları yapmış oldukları deneysel miyokardiyal enfarktüs modeli üzerine farelerde yapmış oldukları deneylerde, MMP inhibitörü kullanımıyla sol ventrikül hacminde ve fonksiyonunda iyileşme olduğunu göstermişlerdir (Rodhe ve ark., 1999). Yine Courtman ve arkadaşları tavşan abdominal aortası üzerinde yaptıkları çalışmalarda doksisisiklinin, damar duvarında kollajen fiberlerinin re-organizasyonunu engelleyerek yeniden yapılanmayı engellediğini göstermişlerdir (Courtman ve ark., 2004). Doksisisiklinin etkisini direk metalloproteinazlar üzerine göstermesinin yanı sıra (Golub ve ark., 1998) antienflamatuar özelliğiyle de gözlenen patolojilerde iyileşmeye neden olduğu bilinmektedir. Hoyt ve arkadaşları kültüre akciğer epitelyum hücreleri üzerine yaptıkları araştırmalarda doksisisiklin kullanımıyla artmış iNOS ekspresyonunun, p38MAPK ekspresyonu

seviyesinin azalması yoluyla kontrol altına alındığını ve bu sayede NO üretiminin yavaşladığını göstermişlerdir (Hoyt ve ark., 2006).

MMP aktivasyonunu sağlayan etkenler arasında oksidan stres de yer almaktadır. Hao ve arkadaşları agonist etkili MMP aktivasyonu ile oksidatif stres gelişimi, vasküler tonusun artması ve hipertrofi gelişimi arasında bağlantı olabileceğini önermişlerdir (Hao ve ark., 2006). Uemura ve arkadaşları ise diyabetik sıçanlarla yaptıkları deneyler sonucunda MMP-9 aktivitesinin diyabetik damarlarda arttığını göstermiş ve bu artışın hiperglisemi tarafından tetiklenen oksidatif stresin, enzimin ekspresyon aşamasına etkisi sonucunda gözlemlendiğini göstermişlerdir (Uemura ve ark., 2001). Rajagopalan ve arkadaşları MMP-2'nin ve MMP-9'un ROS tarafından aktive edildiğini göstermiş ve ekspresyonlarının oksidan stres tarafından düzenlendiğini önermişlerdir (Rajagopalan ve ark., 1996).

Hücrede oksidatif strese neden olan hiperglisemi ile ilişkili çalışmalar incelendiğinde, süperoksit anyonlarının artması ve NADPH'nin kullanımındaki artışın hiperglisemideki polyol yolağını aktive ettiği görülmektedir (Douillet ve ark., 1998). Serbest radikallerin oluşması, proteinlerin enzimatik olmayan glikozilasyonu, prostanooid metabolizması ve şekerin otooksidasyonu yüksek glikoz seviyesine bağlıdır. Doymamış yağ asitlerinden daha aktif olarak serbest radikaller, lipid peroksidasyonlarının başlatıcılarıdır. Bu sayede membran ve hücre fonksiyonlarda anormallikler gözlenebilir. Bu açıdan bakıldığında diyabetik komplikasyonların patolojik oluşumlarının merkezinde oksidatif stresin varlığı görülmektedir. Bir antioksidan olarak kabul gören selenyum bileşiklerinin diyabetle indüklenmiş oksidatif stres mekanizmasında pozitif bir role sahip olduğu daha önceki yapılan araştırmalarla da gösterilmiştir (Ayaz ve ark., 2004). Fakat damar dokusunda MMP' lar ve oksidan stres ilişkisini açıklamada mevcut çalışmalar yetersizdir.

Metalloproteinazların vasküler tonus üzerine tartışmalı deney sonuçları bulunmaktadır. Sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmada MMP-2' nin endotelden salınan Endotelin-1' in parçalaması sonucunda yeni bir

vazokonstriktör ajanın oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir (Fernandez-Patron ve ark., 1999). Buna karşılık Rafetto ve arkadaşları sıçan inferior vena kavası üzerinde yaptıkları araştırmalar sonucunda endotel yokluğunda veya endotel kaynaklı gevşetici ajanların inhibisyonu durumunda MMP-2' nin vazodilatör etkisini gözlemişlerdir (Rafetto ve ark., 2007).

Çalışmamızda diyabetik sıçanların damar kasılma-gevşeme fonksiyonlarının incelenmesi ayrıca bir MMP inhibitörü olan doksisisiklin ile bir antioksidan olarak bilinen sodyum selenatın bu fonksiyonlar üzerindeki etkileri değerlendirilmesi ve diyabetin neden olduğu komplikasyonların oluşumunda MMP' ların olası rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Sıçanlarda Diyabet Oluşturulması

Deneylede ağırlıkları 200-250 g arasında olan yaklaşık 3 aylık 102 adet Wistar albino türü erkek sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar, deney süresince her kafeste 3-4 sıçan olacak şekilde, su ve yem kısıtlaması olmaksızın muhafaza edilmişlerdir. Tüm hayvanların açlık kan şekeri düzeyleri ve vücut ağırlıkları deneyin başlangıcında ölçülmüştür. Diyabetli hayvan oluşturmak için tek doz streptozotosin (STZ; 50 mg/kg vücut ağırlığı) intraperitonel (*i.p.*) olarak enjekte edilmiştir. STZ enjeksiyonundan 1 hafta sonra hayvanların açlık kan şekeri düzeyleri ölçülerek 300 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir. Bu diyabetli grup üç alt gruba ayrılmış, ilk grup, 4 hafta daha muhafaza edilerek 5. hafta sonunda tekrar açlık kan şekeri düzeyleri ve vücut ağırlıkları ölçüldükten sonra diyabet grubu (DM) olarak deneye alınmıştır. Diğer diyabetli olan grup, birinci haftanın sonunda hayvanlara 15 mg/kg doksisisiklinin oral yolla 4 hafta boyunca verilmesi ile doksisisiklin tedavisi uygulanmış ikinci diyabet grubu oluşturulmuştur (DM+DOXY). Son grup ise birinci haftanın sonunda hayvanlara 300 µg/kg/gün sodyum selenatın (Na_2SeO_4) oral yolla 4 hafta boyunca verilmesi ile selenyum tedavisi uygulanmış ikinci diyabet grubu oluşturulmuştur (DM+SEL).

2.2 Vasküler Aktivitenin İncelenmesi

Sıçanlar pentalsodyum (50 mg/kg) ile anestezi etkisi oluşturulduktan sonra torasik aortanın diyaframının üzerinden kalp çıkışına kadar olan bölümü izole edildikten sonra Krebs-Hanseleit çözeltisi (mM olarak: NaCl 112, KCl 5, NaHCO_3 25, NaH_2PO_4 1, MgCl_2 0,5, CaCl_2 2,5, glukoz 11,5) içerisinde bağ dokusundan temizlenerek deneye hazır hale getirildi. Damar her bir parça 3 mm kalınlığında

olacak şekilde halkalar halinde kesildikten sonra şerit formunda banyo hacmi 5 ml olan organ banyosuna dikey olarak yerleştirildi. Damar şeritleri özel kısıkaçlar yardımıyla dikey doğrultuda düzeneğe yerleştirilerek izometrik-gerim ölçer çevirece (Grass FT 03) bağlandı. Gerim, yükseltici aracılığıyla (May Com, Ankara) bir analog/dijital çevirici ile online bilgisayara kaydedildi. Kasılma yanıtlarına geçmeden önce damarların pasif kuvvetlerinin etkisiyle kararlı bir gerime ulaşmaları amacıyla yaklaşık 1 saat kadar spontan aktivite göstermeleri sağlandı. Ölçümlerin bilgisayardaki kayıtları 20 Hz' lik frekans uygulamasına göre yapıldı. Deney protokolü şu şekilde uygulandı; damar şeritleri 37 °C sıcaklıkta % 95 O₂ ve % 5 CO₂ karışımıyla gazlanan Krebs-Hanseleit çözeltisi bulunan organ banyosu sistemine yerleştirilip ortalama 1250 mg gerim değerine ulaştıktan sonra yaklaşık 1 saat boyunca kendi haline bırakıldı ve stabil bir gerime ulaşması beklendi. Daha sonra, ilk olarak 80 mM KCl uygulayarak tek doz kasılma yanıtı elde edilerek damarların canlı olup olmadıkları test edildikten sonra deneye alınmasına karar verilen şeritler her 15 dakikada bir banyo hacmi değiştirilerek yaklaşık 1 saat süre yıkılarak KCl nin banyodan uzaklaştırılması sağlandı. İkinci olarak 10⁻⁶ M konsantrasyonunda tek doz α_1 -adrenerjik reseptör agonisti fenilefrin uygulanarak kasılma yanıtları elde edilmiş ve bunu takiben bu kasılma yanıtları üzerinden kümülatif gevşeme yanıtları ölçüldü. Vazodilatör ajan olarak 10⁻⁹-10⁻⁴ M konsantrasyonları arasında bir β_2 -adrenerjik reseptör agonisti olan izoproterenol (ISO), 10⁻⁹-10⁻⁴ M konsantrasyonları arasında muskarinik reseptör agonisti olan asetilkolin (ACh), 10⁻⁹-10⁻³ M konsantrasyonları arasında nitrik oksit donörü olarak sodyum nitrite (NaNO₂) ve 10⁻¹⁰-10⁻⁵ M konsantrasyonları arasında adenilat siklaz aktivatörü olarak bilinen forskolin (FORS) uygulanmıştır (Furchgott ve Zawadzki, 1980).

2.3 Adenilat siklaz aktivitesi ölçümü

Deneyde kullanılan grupların torasik aorta örnekleri adenilil siklaz aktivitesi ölçümü için şerit formunda 200 µl Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içine alındı ve üzerlerine fosfodiesteraz inhibitörü olan IBMX (10⁻³ M)

eklendikten sonra 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra örnekler dört gruba ayrılarak, birinci gruba adenilil siklaz aktivatörü olan forskolin (10^{-6} M), ikinci gruba izoproterenol (10^{-5} M), üçüncü gruba asetilkolin (10^{-5} M) ve son gruba da sodyum nitrite (10^{-4} M), uygulanarak 10 dakika inkübe edildi. Son olarak 200 µl soğuk 0,2 N HCl eklenmesiyle reaksiyon durduruldu (Gurdal ve ark., 1998).

2.4 cAMP derişimi ölçümü

Deneyde kullanılan grupların torasik aorta örneklerinde cAMP derişimi RIA yöntemiyle ölçüldü. Bu ölçüm yapılırken 96'lık well plateler 100 µl' de 200 ng olacak şekilde cAMP antikor çözeltisiyle kaplandı. Sodyum asetat tamponu; 500 mM, 1 mM CaCl_2 , pH 6,2 (AB1) ve 500 mM, 2 mM CaCl_2 , pH 5,8 (AB2) olacak şekilde iki farklı şekilde asetik asitte hazırlandı. 24 saat' lik inkübasyonun sonunda örneklerden ve oluşturulan standartlardan 25 µl alınarak 96'lık well plate koyuldu. Üzerlerine 200 µl asetat tamponu (AB1) eklendikten sonra kuyular yıkandı. Yıkama işleminden sonra 10 µl asetilasyon solüsyonu (1:2 oranında asetikanhidrit:triethylamin) kuyulara eklendi. Daha sonra bu kuyulardan 50 µl alınıp antikorla kaplanmış platlere konuldu. Üzerlerine 50 µl AB2 tamponu ilave edildi. Bununda üzerine 20 µl radyoaktif işaretli cAMP antikor eklenerek bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kuyular yıkandı. Üzerine 25 µl sintilasyon sıvısı eklendikten sonra sintilasyon sayacında kuyulardaki radyoaktif aktivite dedekte edildi. Standart asetil-cAMP bağlanma eğrisi 4 parametrelili regresyon modeli uygulanarak oluşturuldu. Oluşan bu değerler her bir damarın ağırlıklarına oranlanarak değerlendirildi (Gürdal ve ark., 1998).

2.5 MMP-2, MMP-9 ve TIMP-4 protein seviyelerinin ölçümü

Dondurulmuş örnekler pulverize edildikten sonra lysis tamponu (0,05 mol/L HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl mol/L, 1 % Nonidet P-40, 1 mmol MgCl_2 /L, 1 mmol/L CaCl_2 ve 1 tablet proteaz inhibitör kompleksi) eklenerek örneklerin

homojenizasyonu gerçekleştirildi. Homojenizasyon işlemi için; örnekler ultraturaks yardımıyla mekanik olarak parçalandıktan sonra 8000 RPM' de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantların protein miktarları Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi. %10' luk SDS-PAGE de elektroforez edilen örnekler, 25 V' da 2 saat süresince PVDF membrana transfer edildi. Membranlar 1 gece boyunca %5' lik süt tozu içeren blok solüsyonunda inkübe edildikten sonra TTBS solüsyonuyla yıkanan membranlar MMP-2, MMP-9 ve TIMP-4 antikorları ile (Chemicon) ayrı ayrı 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar yıkandı daha sonra 1 saat spesifik sekonder antikorları ile tekrar inkübe edildikten sonra ECL kiti kullanılarak membranlarda oluşan sinyal filme aktarıldı. Filmlerde beliren bantların densitometrik analiz yapan program yardımıyla analizi sonucunda hedef proteinlerin dokudaki miktarları elde edildi (Koksoy ve ark., 2007).

2.6 MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin ölçümü

Dondurulmuş örnekler bir önceki bölümde (2.5) anlatıldığı şekilde hazırlanıp süpernatantların protein miktarları Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi. Latent ve aktif durumdaki jelatinaz aktivitesi SDS-PAGE jelatin zymografi tekniğiyle belirlendi. Bu teknik, enzimlerin jelin yapısına katılan kollajeni parçalamalarının ardından Coommasie Brilliant Blue boyası ile jelin boyanması ve enzimatik sindirime maruz kalmış bölgelerin ise boyanmayarak tarayıcı yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldığında şeffaf bantlar oluşturması ve bu bantların densite analizi uygulayan programlar kullanılarak analiz edilmesi temeline dayanmaktadır (Koksoy ve ark., 2007).

2.7 Tiyol Oksidasyon Ölçümü

Deneyde kullanılan grupların torasik aorta örneklerinin homojenizasyonu 50 mM Tris-HCl (pH 7,4, 4⁰C), 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,5 mM dithiothreitol, 1

μM pepstatin A, 2 μM leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride içeren tamponda ultraturaks ve teflon homojenizatörü aracılığıyla gerçekleştirildi. Total SH grubu ölçümü için, örneklerden 12,5 μl alınarak, 200 μl saf su ve 25 μl 2 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ile muamele edildikten sonra 20 dakika inkübe edildi ve 412 nm dalga boyunda absorbansları spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Asit soluble SH grupları belirlemek amacıyla 43,75 μl damar homojenatıyla 21,87 μl %20' lik trichloroasetik asit (TCA) karıştırılarak 10 dakika inkübe edildi. Bu karışımdan alınan 25 μl örneğimize 62,5 μl DTNB ekleyerek 412 nm'de absorbansları spektrofotometrik olarak okutuldu. Örnek ve ayıraç körleri yardımıyla elde edilen düzeltmeden sonra SH grup konsantrasyonları eksitasyon katsayısı olarak $1,31 \text{ mM}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ değeri kullanılarak hesaplandı.

2.8 Nitrik Oksit Türevlerinin Ölçümü

Ölçüm metodu toplam nitrit ölçümü prensibine dayanmaktadır. Damar dokularını homojenize etmek amacıyla 100 μl PBS (phosphate buffer saline, pH 7,4) eklenerek ultraturaks ve teflon homojenizatörleri aracılığıyla homojenizasyon gerçekleştirildikten sonra homojenatlar 60 dakika boyunca 4°C 'de $14000\times g$ 'de santrifuj edildi ve nitrit ölçümü deneyi için 100 μl örnek üzerine 50 μl sülfonamid ve 50 μl NED eklenerek 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra spektrofotometrede 542 nm dalgaboyunda ölçüm yapılarak kullanılan sodyum nitrit standartına göre kuyulardaki nitrit dansitesi belirlendi.

2.9 İstatistiksel Analizler

Organ banyosu için deney sonuçları ortalama $\pm$ SEM olarak belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda agonist uygulamasına karşı elde edilen yanıtlar GraphPad Prism4 kullanılarak tüm parametreler one-way ANOVA testi kullanılarak hesaplandı. Her grubun birbiriyle karşılaştırılmasında TUKEY testi kullanılarak

sonuca gidildi. Tiýol oksidasyonu ve nitrik oksit türevleri ölçümünde ise spektrofotometrede okunan değerler protein miktarlarına göre oranlanarak dokudaki miktarları belirlendi.

2.10 Kullanılan Kimyasallar

KCl, NaCl, NaHCO₃, NaH₂PO₄, MgCl₂, CaCl₂, glukoz, isoproterenol (I- 6504), IBMX, sodyum selenat, doksisisiklin, forskolin, fenilefrin, Griess Reagent, Sodyum Nitrit, K₂HPO₄, KH₂PO₄ (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany), MMP-2, MMP-9, TIMP-4 antikorları (Chemicon), ECL plus kit (Amersham).

3.BULGULAR

3.1 Deney Hayvanlarının Genel Bulguları

Deneylerde kullanılan sıçanlara ilişkin ortalama değerler Tablo 3.1’ de özetlenmiştir. Görüldüğü gibi başlangıçta tüm deney gruplarının ağırlıkları ve kan şekeri düzeyleri birbirlerine yakın iken, STZ enjeksiyonunu takiben bu grubun kan şekerinin yükseldiği ve enjeksiyondan bir hafta sonra diyabetik kabul edilen sıçanların kilo artışının durduğu ve ilerleyen haftalarda kilo kaybetmeye başladıkları gözlenmiştir. Bu grubun kan şekerinin kontrol grubuna göre yaklaşık 4-kat yüksek olduğu gözlenmiştir. Deney sürecinin sonunda diyabetik grubun ağırlıklarının ve kan şekerlerindeki yükselmenin kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0,05$) düşük ve yüksek olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.1 Deney grubunda bulunan hayvanların ağırlık ve kan şekeri değerleri

Grupların Parametreleri	Vücut Ağırlığı (g)		Kan Şekeri (mg/dl)	
	Başlangıç	Bitiş	Başlangıç	Bitiş
K (n=30)	265±7	267±12	112±7	113±12
DM (n=35)	259±6	189±13* [#]	447±15	441±11*
DM+DOXY(n=37)	253±6	261±10	412±11	420±10*
DM+SEL (n=30)	250±8	268±9	400±12	418±14*

Kısaltmalar; Kontrol grubu (K), diyabet grubu (DM), doksisiklin (DM+DOXY) ve sodyum selenat verilmiş diyabetli grup (DM+SEL) olarak kullanılmıştır. Grupların deneyin başlangıcında (başlangıç) ve 4. haftanın sonunda ölçülen değerleri (bitiş) arı sütunlarda verilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. n = hayvan sayısını; *p<0,05 kontrol grubuna ve #p<0,05 ise bitiş değerlerinin başlangıç ile karşılaştırılmasını göstermektedir.

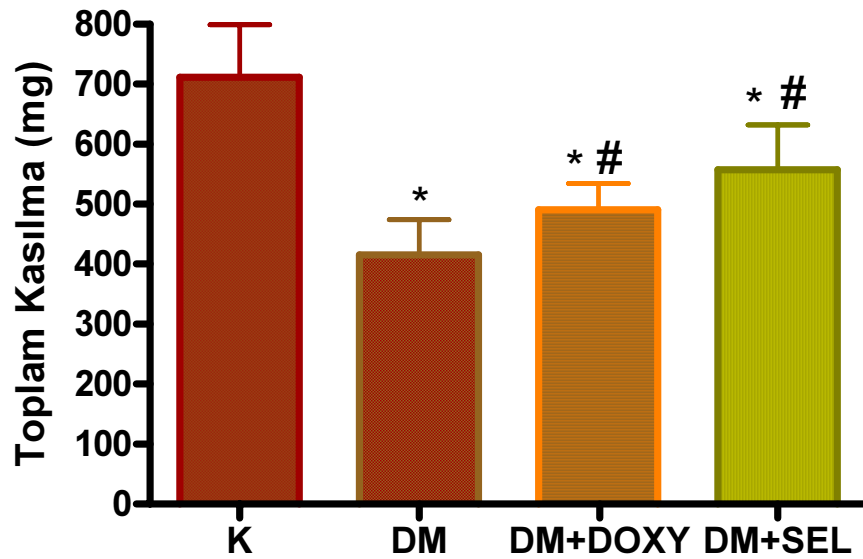
Veriler değerlendirildiğinde; doksisiklin veya selenyum tedavisinin diyabete bağlı olarak görülen kilo kaybını engellediği ve kontrol grubunun değerlerine yaklaştırdığı gözlenmiştir. Bununla beraber kan şekeri ölçümlerine baktığımızda doksisiklin veya selenyum ile tedavi edilmiş grupta diyabete bağlı olarak yükselen kan şekeri değerlerinde kontrol grubuna göre bir değişme gözlenmemiştir.

3.2 Doksisiklin veya Selenyum Uygulamasının Diyabetik Sıçanlarda Alfa-1 Adrenerjik Reseptör Agonisti Yanıtlarına Etkisi

Alfa-1 adrenerjik yanıtlar üzerine doksisiklinin etkisini araştırmak üzere, KCl ile kastırılarak kasılma yetenekleri test edilen damar şeritleri, elde edilen bu yanıtın yıkanarak uzaklaştırılmasının ardından kendi iç kuvvetlerinin etkisiyle stabil bir gerime ulaşması beklenmiştir. İstenen stabillığe ulaşan endotelli damar şeritlerine tek konsantrasyonda (10^{-6} M) fenilefrin (alfa-1 adrenerjik reseptör agonisti) uygulanarak kasılma yanıtları gözlenmiştir. Gruplar arasında 10^{-6} M fenilefrin uygulandığı andaki bazal aktivitelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (p<0,05) bir fark olmamasına karşın, kasılma yanıtlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabetli grupta azaldığı ve doksisiklin veya selenyum uygulanmış diyabetli sıçanların bu parametreyi kontrol grubunun değerlerine yaklaştırdığı gözlenmiştir (Şekil 3.1). Veriler incelendiğinde tek konsantrasyon fenilefrine karşı kaydedilen kasılma yanıtında diyabetin kontrole göre 42% oranında azalma gösterdiği, doksisiklinin bu yanıtı 27% selenyumun ise 36% oranında arttırdığı gözlenmektedir.

3.3 Doksisiklinin veya Selenyumun Diyabetik Sıçanlarda Endotel Varlığında Gerçekleşen Gevşeme Yanıtlarına Etkisi

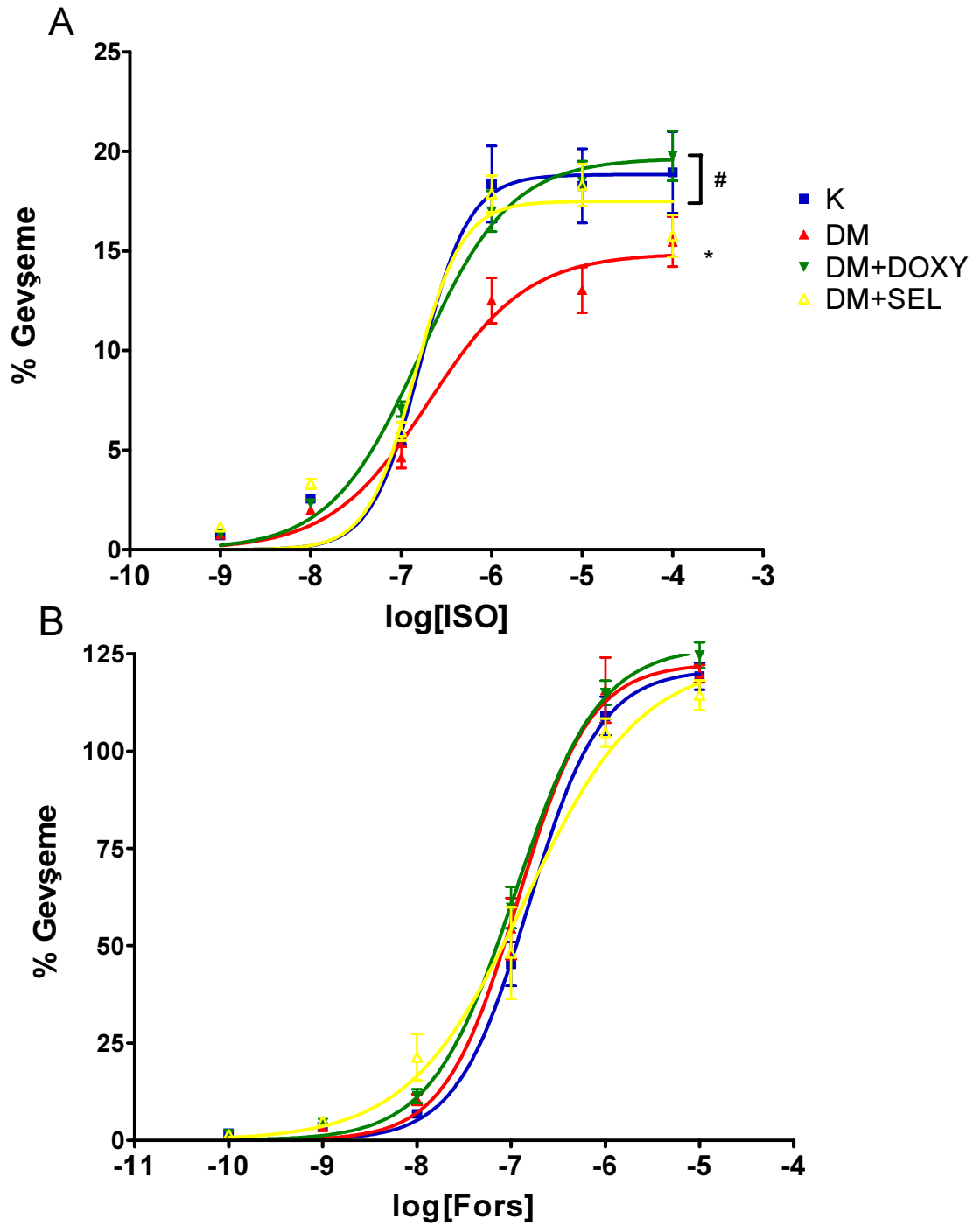
Tek konsantrasyon fenilefrin kasılma yanıtlarının elde edilmesinden sonra bu yanıtlar üzerinden endotelli damar şeritlerinde farklı yolaklar üzerinden gerçekleşen gevşeme yanıtları incelenmiştir. Bunun için şeritlere ayrı ayrı kümülatif konsantrasyonlarda muskarinik reseptör agonisti olan asetilkolin (10^{-9} - 10^{-4} M), beta adrenerjik reseptör agonisti olan isoproterenol (10^{-9} - 10^{-4} M), adenilat siklaz aktivatörü olan forskolin (10^{-10} - 10^{-5} M) ve nitrik oksit donörü olarak bilinen sodyum nitrit (10^{-9} - 10^{-3} M) kümülatif olarak uygulanmıştır. Sonuç olarak asetilkolin ve izoproterenol uyarımına karşı elde edilen gevşeme yanıtlarında diyabetik grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken, doksisiklin veya selenyum uygulanmasının bu azalmayı kontrol değerlerine yaklaştıracak şekilde arttırdığı gözlenmiştir.



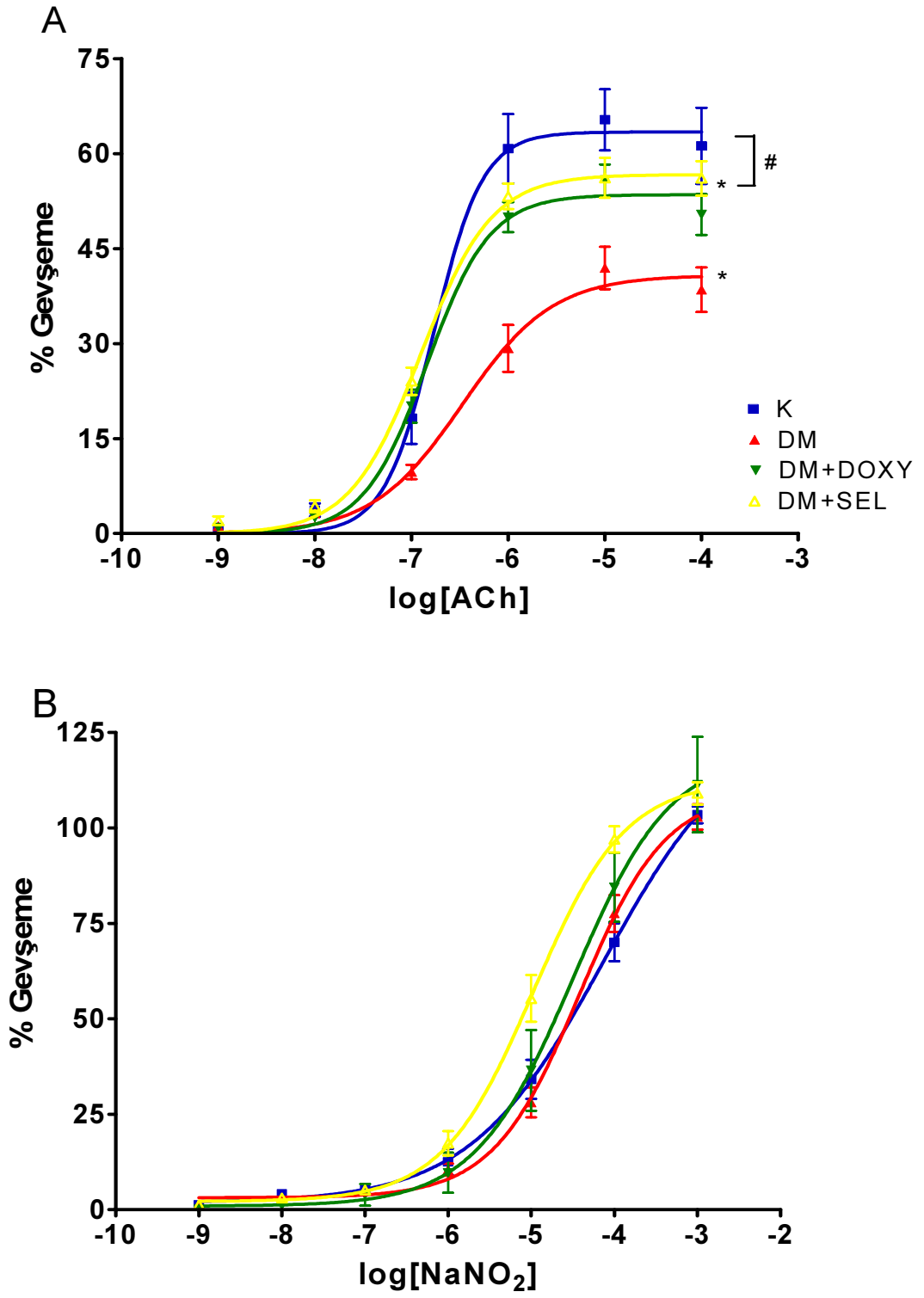
Şekil 3.1 Endotelli damar şeritlerinde Fenilefrin ile elde edilen kasılma yanıtları. Kısaltmalar; K kontrol grubunu, DM diyabetik grubu, DM+DOXY doksisiklinle tedavi edilmiş diyabetik grup, DM+SEL ise selenyum verilmiş diyabetik grubu simgeleyecek şekilde kullanılmıştır. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, # $p < 0,05$ ise diyabetik gruba göre istatistiksel olarak anlamlılık düzeyini göstermektedir.

Forskolin ve sodyum nitrit uyarımı sonrasında elde edilen gevşeme yanıtları değerlendirildiğinde ise grupların her iki uyarıya da cevaplarının aynı olduğu,

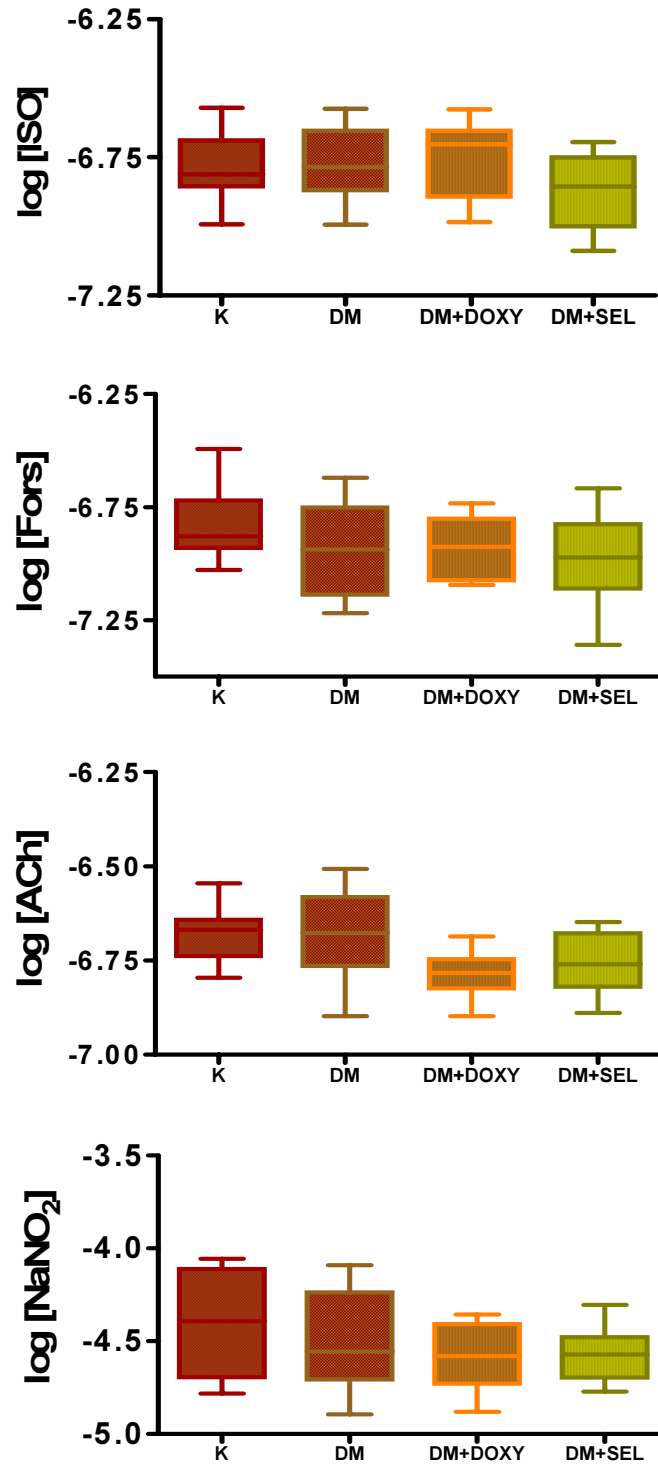
aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedikleri gözlenmiştir. Ayrıca her ajan için EC_{50} değerleri hesaplandığında bu parametrenin kontrol, diyabet, doksisiklin veya selenyum uygulanmış gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği ortaya çıkmıştır (Şekil 3-2, 3-3, ve 3-4). Isoproterenol gevşeme yanıtları incelendiğinde diyabetik grubun yanıtı kontrole göre 27% azalırken; doksisiklin tedavisi ile 46%, selenyum uygulaması ile ise 30% oranında arttığı gözlenmektedir. Asetilkolin yanıtlarında ise kontrole göre diyabetik grubun asetilkolin uyarımına karşı gösterdiği gevşeme cevabı 35% azalırken, doksisiklin tedavisi gevşeme yanıtındaki bu azalmayı 32% oranında arttırdığı yine selenyum uygulamasıyla ise bu azalmanın 40% oranında arttığı gözlenmiştir.



Şekil 3.2 Endotelli damar şeritlerinden elde edilen yüzde gevşeme yanıtları. Kısaltmalar; K kontrol grubunu, DM diyabetik grubu, DM+DOXY doksisiklinle tedavi edilmiş diyabetik grup, DM+SEL ise selenyum verilmiş diyabetik grubu simgeleyecek şekilde kullanılmıştır. A) Isoproterenol uyarımı sonucunda elde edilen yanıt B) Forskolin uyarımı sonrasında elde edilen yanıtlar. * $p < 0,05$ kontrole göre, # $p < 0,05$ diyabetik gruba göre istatistiksel olarak anlamlılık düzeyini göstermektedir.



Şekil 3.3 Endotelli damar şeritlerinden elde edilen yüzde gevşeme yanıtları. A) Asetilkolin uyarımı sonucunda elde edilen yanıt **B)** Sodyum nitrit uyarımı sonrasında elde edilen yanıtlar. * $p < 0,05$ kontrole göre, # $p < 0,05$ diyabetik gruba göre istatistiksel olarak anlamlılık düzeyini göstermektedir.

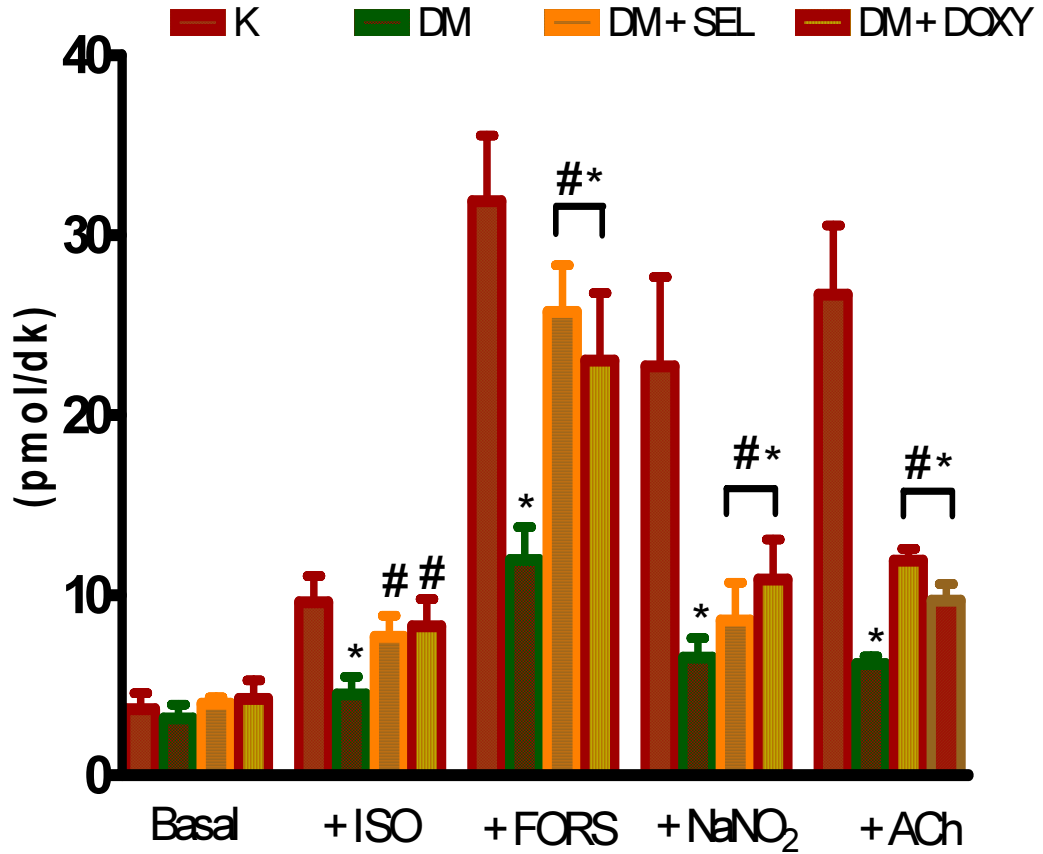


Şekil 3.4 Endotelli damar şeritlerine kümülatif olarak uygulanan gevşetici ajanların EC₅₀ değerlerini göstermektedir. Kısaltmalar; K kontrol grubunu, DM diyabetik grubu, DM+DOXY doksisisiklinle tedavi edilmiş diyabetik grup, DM+SEL ise selenyum verilmiş diyabetik grubu simgeleyecek şekilde kullanılmıştır. Bu değerler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir.

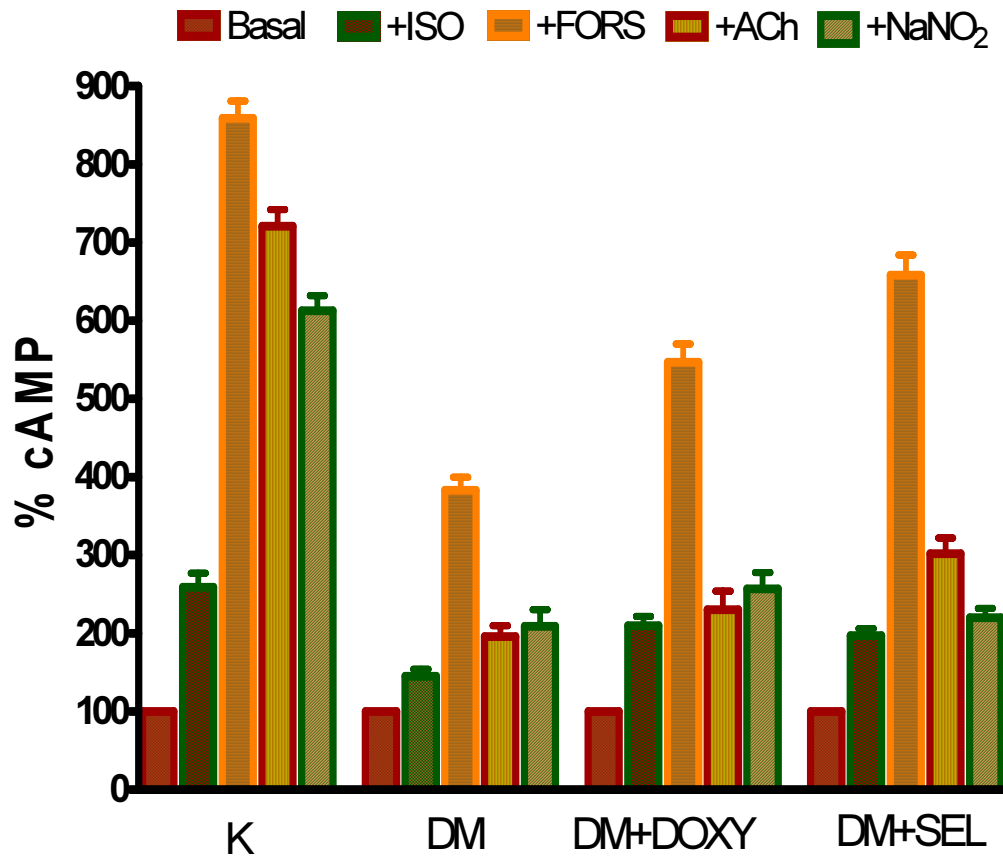
3.4 Doksisiklinin veya Selenyumun Diyabetik Sıçanlarda Uyarılmış cAMP Seviyeleri Üzerine Etkisi

Mekanik aktiviteyi ölçtüğümüz organ banyosu deneylerinde alfa adrenerjik reseptör yanıtlarında kontrol ve diyabetli grup arasında anlamlı bir farklılık gözledik ve diyabette azalan cevabın doksisiklin veya selenyum uygulamasıyla kontrol değerlerine yaklaştığını gözlemledik yine beta adrenerjik ve muskarinik reseptör aracılı gevşeme yanıtlarını incelediğimizde aynı tabloyla karşılaştık ve diyabette azalan gevşeme yanıtlarının doksisiklin veya selenyum uygulamasıyla kontrol değerlerine çekildiğini gözlemledik. Yanıtlarda gözlenen bu değişikliklerin olası mekanizmaları hakkında fikir edinebilmek amacıyla önemli bir ikinci haberci olan cAMP nin dokuda bazal durumdaki (herhangibir uyarana maruz kalmadığı durum), beta adrenerjik reseptör agonisti isoproterenol, muskarinik reseptör agonisti asetilkolin, adenilat siklaz aktivatörü forskolin ve nitrik oksit donörü sodyum nitrit uyarımı durumundaki cAMP miktarları ölçülmüştür. Bu ölçümler incelendiğinde gruplar arasında bazal durumda ölçülen cAMP miktarları istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermezken isoproterenol, forskolin, asetilkolin ve sodyum nitrite uyarımlarına karşın verilen cevapta diyabetli grup damar örneklerinde diğer gruplara nazaran istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3-5). Şekil 3-6 da bu değerler kendi bazallarına göre normalize edilerek yüzde cinsinden yanıtlar hesaplanmıştır. Kontrol grubunda isoproterenol uyarımında yaklaşık 2,5-katlık bir artış gözlenirken diyabette bu değer yaklaşık 1,5-kat seviyesine düşmüş ve doksisiklin ya da selenyum uygulamasıyla bu değerler yaklaşık 2-kat ve 2-katlık artış oranına ulaşmıştır. Forskolin uyarımında kontrol grubu 8.5-katlık bir yanıt gösterirken diyabet gruplarında bu yanıt 0,4-kat seviyelerine düşmüş yine doksisiklin veya selenyum uygulamasıyla damarlar 5,5-kat ve 6,5-kat yanıt verir düzeye gelmişlerdir. Asetilkolin uyarımında kontrol grubu 7,2-kat oranında yanıt verirken diyabetli grupta bu değer yaklaşık 2-kat seviyelerine düşmüştür, doksisiklin ve selenyum uygulaması ile bu değer 2,3-kat ve 3-kat seviyelerine çıktığı gözlenmiştir. Son olarak sodyum nitrit uyarımının yanıtlarını incelediğimizde kontrol grubunda yaklaşık 6-kat düzeyinde bir yanıtla karşılaşırken diyabette aynı

yanıtın 2-kat seviyelerine düştüğünü yine doksisiklin veya selenyum uygulamasının bu değeri yaklaşık 2,5-kat ve 2,2-kat seviyelerine taşıdığı gözlenmektedir.



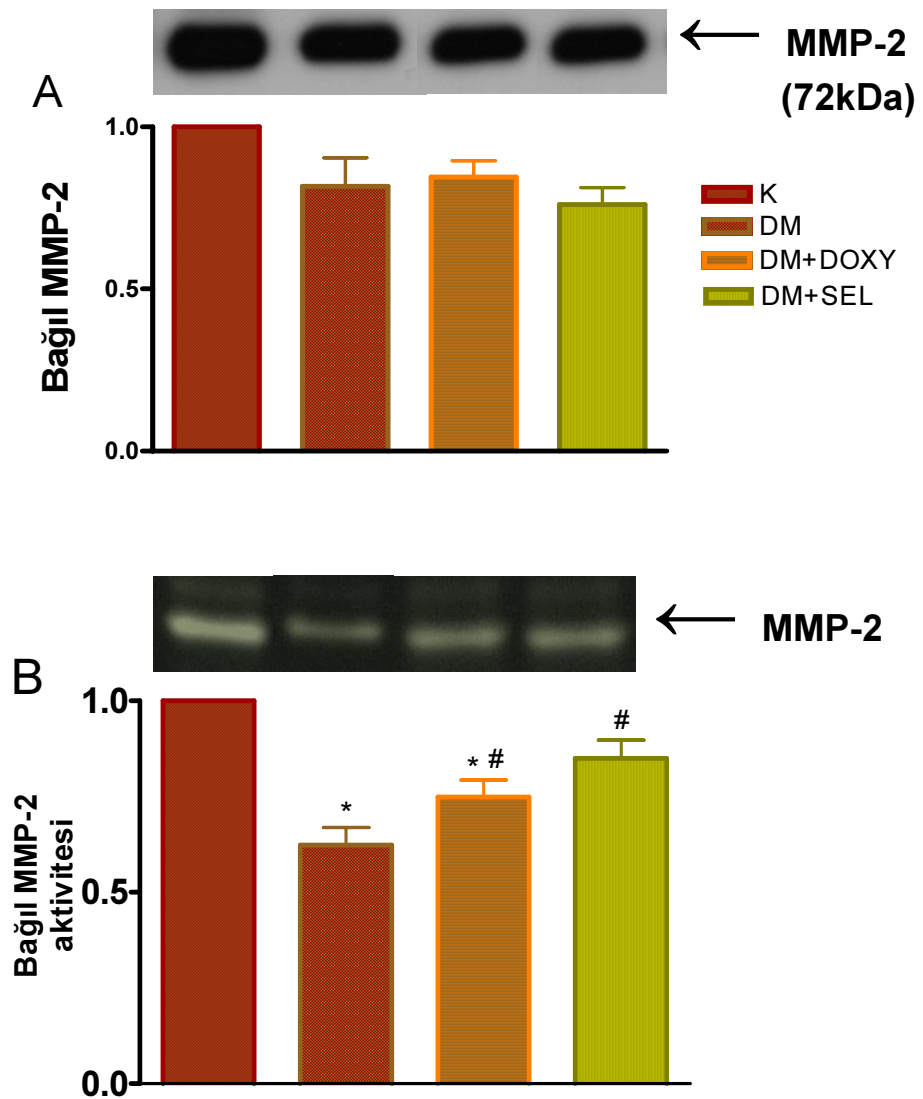
Şekil 3-5 Damar şeritlerinde ölçülen cAMP değerleri. Kısaltmalar; K kontrol grubunu, DM diyabetik grubu, DM+DOXY doksisiklinle tedavi edilmiş diyabetik grup, DM+SEL ise selenyum verilmiş diyabetik grubu simgeleyecek şekilde kullanılmıştır. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, # $p < 0,05$ diyabetik gruba göre istatistiksel olarak anlamlılık düzeyini göstermektedir.



Şekil 3-6 Damar şeritlerinde ölçülen yüzde cAMP değerleri. Kısaltmalar; Basal uyarımın olmadığı durumu, +ISO isoproterenol uyarımını, + FORS forskolin uyarımını, +ACh asetilkolin uyarımını, +NaNO₂ sodyum nitrit uyarımını simgeleyecek şekilde kullanılmıştır. *p<0,05 kontrol grubuna göre, #p<0,05 diyabetik gruba göre istatistiksel olarak anlamlılık düzeyini göstermektedir.

3.5 Doksisiklinin veya Selenyumun Diyabetik Sıçanlarda Damar MMP-2 Protein Seviyeleri ve Aktiviteleri Üzerine Etkisi

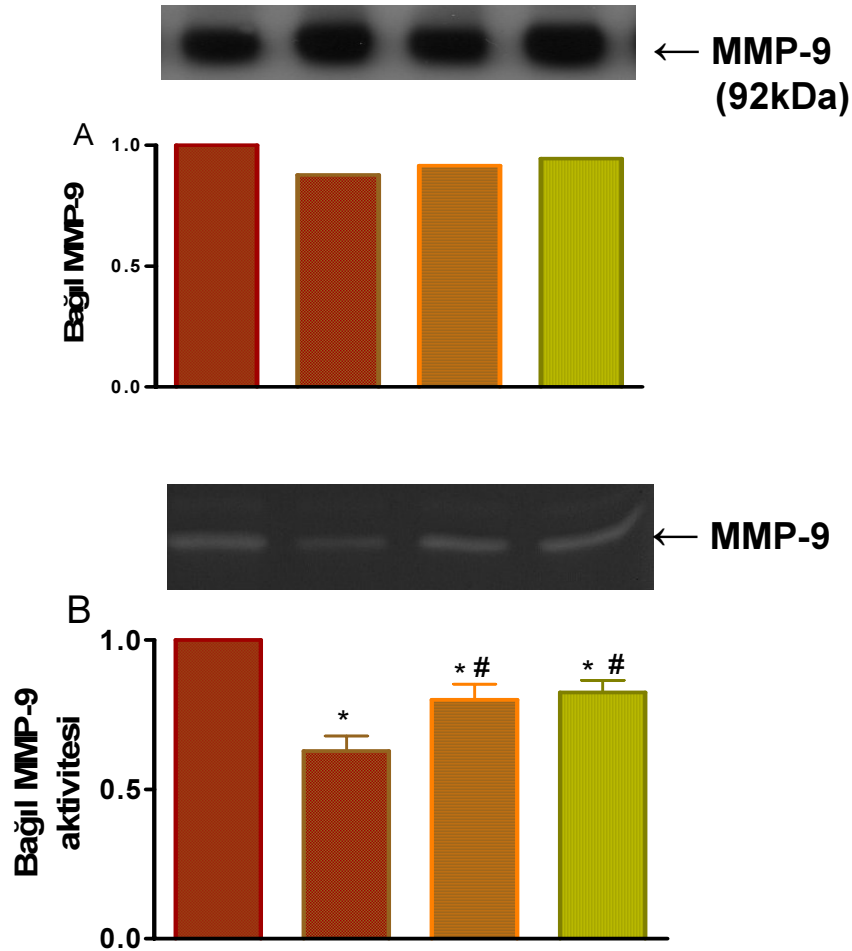
Homojenize edilen örneklerde Western blot yöntemi kullanılarak ölçülen MMP-2 protein seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmezken, zymografi yöntemiyle ölçülen MMP-2 aktivitelerinde diyabetin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0,05$) azaldığı doksisiklin veya selenyum uygulamasının diyabetin neden olduğu bu azalmayı geri çevirdiği ve kontrol değerlerine yaklaştırdığı gözlenmiştir (Şekil 3-7).



Şekil 3.7 Damar homojenatlarında ölçülen MMP-2 protein seviyesi ve aktivitesi. A) Endotelli damar MMP-2 protein seviyelerinin ölçümü. B) Damar MMP-2 aktiviteleri. Zymografi tekniğiyle, endotelyumu sağlam damarlardan ölçülmüş MMP-2 aktivite değerleri. * $p<0,05$ kontrol grubuna göre, # $p<0,05$ diyabetik gruba göre istatistiksel olarak anlamlılık düzeyini göstermektedir.

3.6 Doksisiklinin ve Selenyumun Diyabetik Sıçanlarda Damar MMP-9 Protein Seviyeleri ve Aktiviteleri Üzerine Etkisi

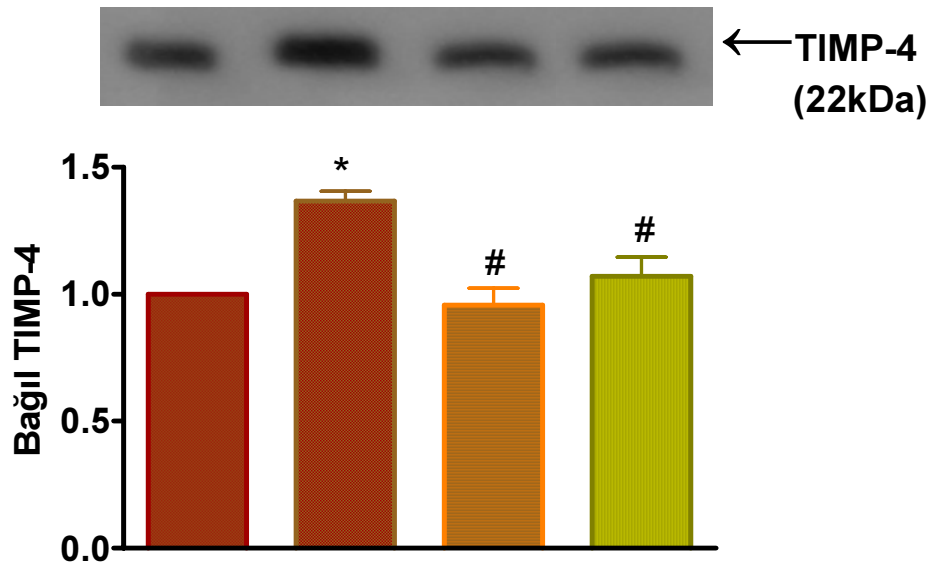
Homojenize edilen örneklerde western blot yöntemi kullanılarak ölçülen MMP-9 protein seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmezken, zymografi yöntemiyle ölçülen MMP-9 aktivitelerinde diyabetin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı doksisiklin veya selenyum uygulamasının diyabetin neden olduğu bu azalmayı geri çevirdiği ve kontrol değerlerine yaklaştırdığı gözlenmiştir (Şekil 3-8).



Şekil 3.8 Damar homojenatlarında ölçülen MMP-9 protein seviyesi ve aktivitesi. A) Endotelli damarlarda ölçülen MMP-9 protein seviyeleri. B) Zymografi tekniğiyle, endotelyumu sağlam damarlarda ölçülen MMP-9 aktivitesi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, # $p < 0,05$ diyabetik gruba göre istatistiksel olarak anlamlılık düzeyini göstermektedir.

3.7 Doksisiklinin ve Selenyum Diyabetik Sıçanlarda Damar TIMP-4 Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi

Homojenize edilen örneklerde western blot yöntemi kullanılarak ölçülen TIMP-4 protein seviyeleri incelendiğinde diyabetik grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmektedir. Doksisiklin ve selenyum uygulaması ise bu artışı kontrol seviyelerine geri çekmektedir (Şekil 3-9).

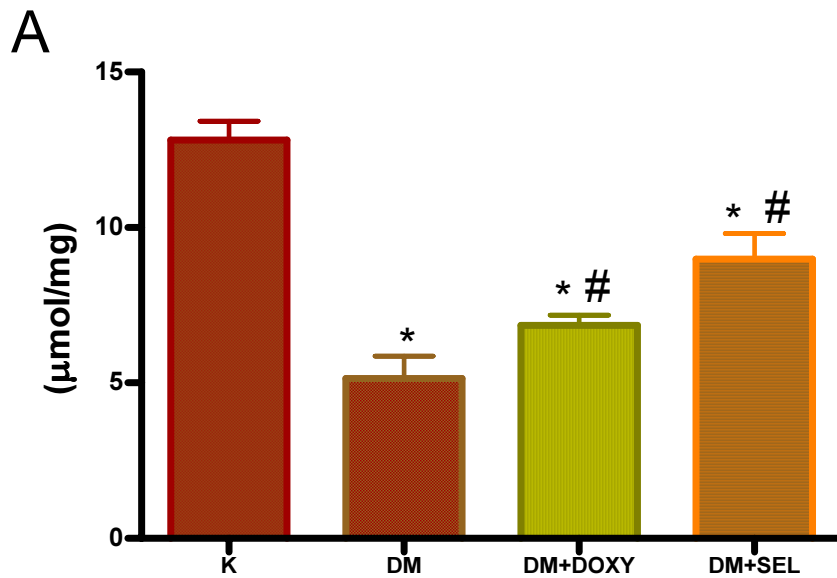


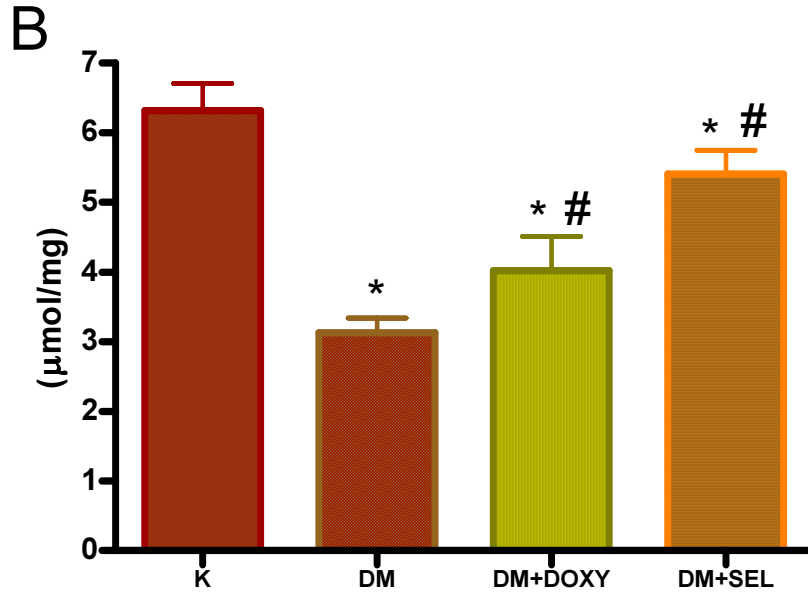
Şekil 3.9 Damar homojenatlarında ölçülen TIMP-4 protein seviyeleri. Western blot tekniğiyle, endoteliumu sağlam damarlarda TIMP-4 protein seviyeleri * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, # $p < 0,05$ diyabetik gruba göre istatistiksel olarak anlamlılık düzeyini göstermektedir.

Damar homojenatlarında ölçülen MMP-2 aktiviteleri değerlendirildiğinde kontrole göre diyabetli grupta 38% değerinde bir aktivite kaybı gözlenirken, doksisiklin tedavisi ile 19% oranında artış gözlenmiştir. Yine diyabetli gruptaki bu aktivite kaybında selenyum uygulamasıyla 38% oranında düzelme gözlenmiştir. MMP-9 aktivitelerine baktığımızda ise diyabette gözlenen 40% azalmanın, doksisiklin uygulamasıyla 33% oranında ve selenyum uygulamasıyla 36% oranında arttığı gözlenmektedir. Gruplar arasında TIMP-4 protein seviyeleri incelendiğinde ise diyabette bu proteinin miktarında kontrole göre 36% oranında artış gözlenirken; doksisiklin bu artışı 33% oranında, selenyum ise 30% oranında azaltarak kontrol değerine yaklaştırdığı gözlenmiştir.

3.8 Doksisiklinin veya Selenyumun Diyabetik Sıçanlarda Doku Tiyol Oksidasyon Seviyeleri Üzerine Etkisi

Homojenize edilen damar örneklerinden ölçülen serbest ve toplam tiyol grup (SH) seviyeleri değerlendirildiğinde; toplam SH seviyeleri kontrol grubunda 12,81 $\mu\text{mol/mg}$ ölçülürken, diyabette 5,14 $\mu\text{mol/mg}$, doksisiklin uygulanmış grupta 7,8 $\mu\text{mol/mg}$ ve selenyum uygulanmış grupta 8,98 $\mu\text{mol/mg}$ olarak ölçülmüştür. Görüldüğü gibi diyabetle birlikte toplam SH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenirken, doksisiklin veya selenyum uygulaması bu düşüşü istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kontrol değerine yaklaştırmıştır. Serbest SH seviyelerinin gruplara göre dağılımı şöyledir; kontrol grubu 6,32 $\mu\text{mol/mg}$, diyabetli grup 3,13 $\mu\text{mol/mg}$, doksisiklin uygulanmış diyabetli grup 4,1 $\mu\text{mol/mg}$ ve sodyum selenat uygulanmış grup 5,41 $\mu\text{mol/mg}$ dir. Veriler istatistiksel olarak analiz edildiğinde kontrol grubuna kıyasla diyabetli grubun serbest SH seviyelerinde anlamlı bir azalmanın gözlemlendiği ve doksisiklin ya da selenyum uygulamasıyla bu değerin kontrol değerlerine anlamlı ölçüde yaklaştığı gözlenmiştir

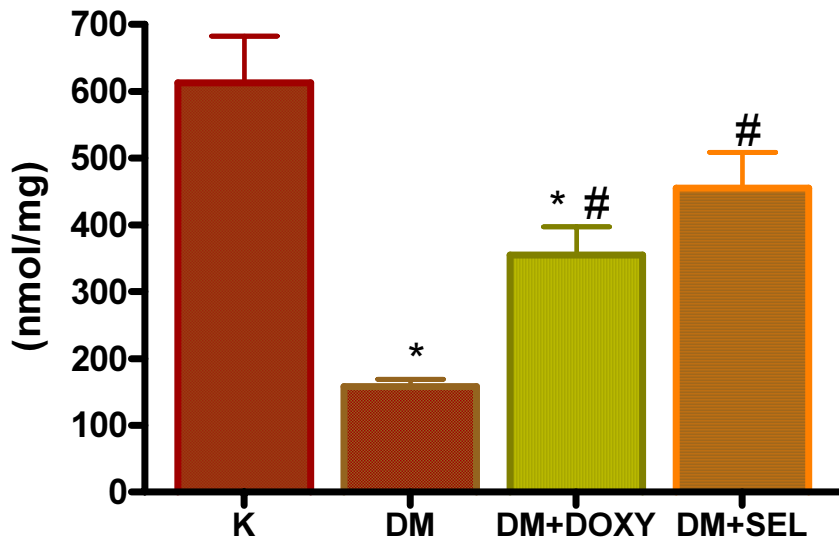




Şekil 3-10 Toplam ve serbest SH seviyeleri. A) Endotelli damar homojenatlarında ölçülen toplam SH seviyeleri B) Endotelli damar homojenatlarında ölçülen serbest SH seviyeleri. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, # $p < 0,05$ diyabetik gruba göre istatistiksel olarak anlamlılık düzeyini göstermektedir.

3.9 Doksisklinin ve Selenyumun Diyabetik Sıçanlarda Doku Nitrik Oksit Seviyeleri Üzerine Etkisi

Homojenize edilen örneklerde nitrit seviyeleri ölçülmüş ve kontrol grubunda 613 nmol/mg ölçülen değerlerin diyabetik grupta 158 nmol/mg seviyesine düştüğü gözlenmiştir. Doksisiklin veya selenyum verilmiş grupların homojenatlarında ise sırasıyla 355 nmol/mg ve 455 nmol/mg değerleri ölçülmüştür. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde diyabetik grupta ölçülen doku nitrit seviyesinin kontrole kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı, doksisiklin veya selenyum uygulamasının ise bu değerde anlamlı bir artışa neden olduğu ortaya çıkmaktadır. Özellikle selenyum uygulaması grup ve kontrol grubu verilerinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemesi bu ajanın etkisine dikkat çekmektedir.



Şekil 3.11 Doku nitrit seviyelerinin gruplara göre dağılımı. Endotelli damar homojenatlarında ölçülen nitrite miktarı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, # $p < 0,05$ diyabetik gruba göre istatistiksel olarak anlamlılık düzeyini göstermektedir.

4.TARTIŞMA

Matriks metalloproteinazlar ve inhibitörleri arasındaki ilişki çeşitli hücrelerde fizyolojik dengelerin sağlanması açısından oldukça önemlidir. Birçok hastalığın patogeneze bakıldığında bu dengenin MMP'ler lehine bozulduğu gözlenmektedir. Orbe ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen hayvan ve insan deneyleri sonucunda, aterosklerotik plak gelişiminde MMP-9 ve MMP-3' ün rolü olduğu gösterilmiştir (Orbe ve ark., 2003). Yine miyokard enfarktüsden bir saat kadar sonra MMP' lerin oranlarının dramatik olarak arttığı, bunu takiben lokal sitokinlerin aktivasyonunun ve inflamasyon hücrelerinin infiltrasyonunun arttığı gözlenmiştir (Tyagi ve ark., 1996). Pek çok kardiyovasküler sistem hastalıklarında MMP inhibitörlerinin kullanımıyla bozulan parametrelerde normale dönüş gözlenmiştir (Creemers ve ark., 2001). Rodhe ve arkadaşları yapmış oldukları deneylerde MMP inhibitörü kullanımıyla sol ventrikül hacminde ve fonksiyonunda iyileşme olduğunu göstermişlerdir (Rodhe ve ark., 1999). Yine Courtman ve arkadaşları tavşan abdominal aortası üzerinde yaptıkları çalışmalarda doksisisiklinin, damar duvarında kollajen liflerinin re-organizasyonunu engelleyerek yeniden yapılanmayı engellediğini göstermişlerdir (Courtman ve ark., 2004).

MMP aktivasyonunu sağlayan etkenler arasında oksidan stres de yer almaktadır. Hao ve arkadaşları agonist etkili MMP aktivasyonu ile oksidatif stres gelişimi, vasküler tonusun artması ve hipertrofi gelişimi arasında ilişki olabileceğini önermişlerdir (Hao ve ark., 2006). Uemura ve arkadaşları ise diyabetik sıçanlarla yaptıkları deneyler sonucunda MMP-9 aktivitesinin diyabetik damarlarda arttığını göstermiş ve bu artışın hiperglisemi tarafından tetiklenen oksidatif stresin, enzimin ekspresyon aşamasına etkisi sonucunda gözlendiğini göstermişlerdir (Uemura ve ark., 2001). Rajagopalan ve arkadaşları MMP-2'nin ve MMP-9'un ROS tarafından aktive edildiğini göstermiş ve ekspresyonlarının oksidan stres tarafından düzenlendiğini önermişlerdir (Rajagopalan ve ark., 1996).

Bu çalışma, diyabetle birlikte bozulan damar kasılma- gevşeme fonksiyonlarında matriks metalloproteinazların katkısını ortaya koymaktadır.

Deney hayvanlarının genel özellikleri ve fiziksel durumlarına bakıldığında; deney protokolünün başlangıcında gruptaki sıçanların ağırlık ve kan şekeri parametrelerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Fakat STZ ile diyabet yapılan hayvanların deney süresince kilo kaybettikleri tespit edilmiştir. Bu da, kan şekerinin artışına paralel olarak diyabetle gözlenmesi beklenen bir sonuçtur ve literatürdeki bulgularla uyumludur (McNeill ve ark., 1991; Ayaz ve ark., 2004; Tuncay ve ark., 2007). Üç aylık hayvanlara oral yoldan 4 hafta boyunca doksisisiklin veya sodyum selenat verilmesi sonucunda diyabetik hayvan grubunda diyabet süresince meydana gelen kilo kayıplarının önlediği ve hatta kilo artışına neden olduğu görülmüştür. Bu ajanların verilmesi hem yaşlanmaya hem de diyabete bağlı olarak artış gösteren kan şekerleri değerleri üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Tablo 1). Bu durum doksisisiklin veya selenyumun göstermiş oldukları restore edici etkilerini, kan glikoz düzeyini etkilemeden diğer yollar üzerinden gerçekleştirmiş olduklarını göstermektedir. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda da diyabetik sıçan vücut ağırlığı ve kan şekeri üzerine doksisisiklin ve sodyum selenatın bu yönde etkileri gözlenmiştir ve elde ettiğimiz bulgular literatürle de uyumludur (Köksoy ve ark., 2007).

Diabetes Mellitus' daki morbitide ve mortalitenin temel nedeni hipertansiyon ve koroner kalp hastalıkları gibi kardiyovasküler bozukluklardır (Garcia ve ark., 1974). Gözlenen bu fonksiyonel bozukluklarda en önemli etmenlerden biri diyabetle gelişen endotel hasarıdır. Yapılan bir araştırmada endotelyuma bağlı gevşemelerin aort dokusunun altı saat boyunca yüksek glukoz içeren ortamda bekletilmesiyle bozulduğu, bu bozulmanın ise süperoksitdismutaz (SOD) ve katalaz gibi antioksidan bileşiklerin ortama katılmasıyla önlediği gösterilmiştir (Tasmafariam ve Cohen, 1992). Bu ve benzeri çalışmalar diyabetle ortaya çıkan kardiyovasküler komplikasyonların oluşumunda oksidatif stresin ne derece önemli olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda diyabetik grupta azalmış alfa, beta adrenerjik reseptör agonistlerine ve muskarinik reseptör agonistlerine karşı

azalmış kasılma ve gevşeme yanıtlarımızın literatürdeki pek çok çalışma tarafından desteklendiği görülmektedir (Farhangkhoe ve ark., 2006; Calles-Escandon ve Cipolla, 2001; Son ve ark., 2007). Bu çalışmalarda azalan gevşeme yanıtından endotel nitrik oksit sentaz enziminin aktivitesindeki diyabete bağlı azalmanın büyük ölçüde sorumlu olduğunu göstermişlerdir (Hattori ve ark., 1991; Cipolla ve ark., 1999). Paralel olarak biz de bu çalışmada, damar homojenatlarında ölçülen nitrit düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığını ve bu azalmanın doksisisiklin veya selenyum uygulamasıyla kontrol değerlerine yaklaştığını gözlemledik ve böylece bu iki ajanın diyabet indüklü damar fonksiyonundaki bozulmaya karşı koruyucu etki gösterdiklerini ortaya koymuş olduk (Şekil 3.11).

Bizim diyabet modelimizde, oksidatif stresin artışı ve kardiyovasküler hasara neden oluşu bu ve önceki çalışmalarımızda gösterilmiştir (Ayaz ve ark., 2006; Ayaz ve ark., 2004). Homojenize damar preparatlarından yapmış olduğumuz ölçümlerde doku serbest ve toplam tiyol grubu miktarının diyabetli grupta kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde ($p<0,05$) azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Doksisisiklin veya selenyum uygulaması ile ise bu azalmanın düzeldiği gözlenmiştir.

Çalışmamızda kronik doksisisiklin veya selenyum uygulamasının diyabetle bozulmuş vasküler fonksiyon üzerine etkileri çalışılmış, ve bu sürece MMP-2, MMP-9 ve TIMP-4' ün katkıları araştırılmıştır. Alfa adrenerjik reseptör agonisti olan fenilefrin uyarımıyla elde edilen yanıtlar değerlendirildiğinde diyabetik grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma görülmektedir ($p<0,05$) ve bu azalma doksisisiklin veya selenyum uygulanmasıyla geri çevirilmiştir. Bu sonuç bize, MMP inhibitörü olan doksisisiklinin diyabet etkisiyle azalmış kasılma yanıtını kontrol değerlerine yaklaştırması, MMP' lerin bir şekilde diyabet indüklü bozulmuş damar kasılma mekanizmasında rol aldıklarını göstermektedir (Şekil 3.1). Literatüre baktığımızda son yapılan çalışmalar genellikle hücre dışı matriks çevriminde rol aldığı düşünülen MMP' lerin hücre içinde de bazı düzenleyici görevler üstlendiklerini göstermektedir

(Wang ve ark., 2002). Kardiyomiyositlerde MMP'lerin aktin ve miyozinlerle birlikte-lokalize olduğu ve özellikle iskemi gibi patolojik durumlarda bu kasılma elemanlarının degradasyonu yoluyla organ fonksiyonuna etki ettikleri gösterilmiştir (Chow ve ark., 2007). Bu bağlamda literatürde henüz MMP'lerin damar düz kas yada endotel hücresinde lokalizasyonun gösteren bir çalışma mevcut olmasa da bulgularımızı değerlendirdiğimizde MMP'lerin diyabetle artan aktivasyonları sonucunda fenilefrin uyarımına verdikleri kasılma yanıtında azalmanın gözlemlendiği ve bu azalmanın bir MMP inhibitörü olan doksisisiklin uygulamasıyla geri çevrildiği ortaya çıkmaktadır. Bu sonuç bize diyabetik damar şeritinde azalan kasılma yanıtında yani damar kasılma komponentleri üzerine MMP'lerin önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda fenilefrinle kastırılmış damar örneklerinden elde edilen beta adrenerjik veya muskarinik reseptör agonistlerine karşı elde edilen gevşeme yanıtları incelendiğinde, diyabetik grupta gözlenen azalmış gevşeme yanıtının doksisisiklin veya selenyum uygulamasıyla kontrol grubunun seviyelerine yaklaştığı gözlenmiştir. Bu veriler literatürle de uyumludur. Örneğin, Miike ve arkadaşları asetilkolin uyarımıyla gerçekleşen gevşeme yanıtının diyabetik sıçanlarda azaldığını göstermişler ve bu etkinin ACh reseptörü ve/veya G proteinin kenetlenme durumundaki bozulmadan kaynaklanmış olabileceğini öne sürmüşlerdir (Miike ve ark., 2008). Çalışmalarında tromboksan A2 ve siklooksijenaz inhibitörü kullanmaları durumunda elde edilen yanıtta herhangi bir değişiklik gözlememelerinden ötürü bu yolların ilgililenilen duruma katkı sağlamadığı kanısına varmışlardır. Bir beta adrenerjik reseptör agonisti olan izoproterenol uyarımına karşı diyabetik grupta gözlenen azalmış gevşeme yanıtı da literatürden destek bulmaktadır. Cardilla ve arkadaşları, insan ön kol kan akımını incelemişler ve NO inhibisyonun sağlandığı durumun beta adrenerjik agonistlerin vazodilatör etkisini maskeleyebildiğini göstermişlerdir (Cardilla ve ark., 1997). Porcine aortik endotel hücreleri üzerinde yapılan in vitro çalışmalarda hiperglisemik koşulların NO salınmasında bozukluğa neden olduğunu bu sayede gelişen endotel fonksiyon bozukluğunun ise beta 2 adrenoreseptör stimülasyonu ile önlenemediğini göstermişlerdir (Kabat ve ark., 2004). Ferro ve arkadaşları kültüre insan umbilikal ven endotel hücreleri üzerine yaptıkları çalışmalarda beta 2

adrenoreseptör uyarımı ile NO salınımının arttığını ve bunun cAMP/PKA yolağının aktivasyonu ile gerçekleştiğini göstermişlerdir (Ferro ve ark., 1999). Tüm bu bulgular değerlendirildiğinde; diyabetle birlikte adrenerjik ve muskarinik reseptör agonisti uyarımına karşın elde edilen bozulmuş gevşeme yanıtında, azalan NO salınmasının çok önemli olduğunu göstermektedir. Diyabetin direkt olarak NO sentaz enziminin üzerine gösterdiği inhibitör etkinin yanı sıra beta adrenerjik yolak üzerine göstermiş olduğu negatif etkilerde bu sürece katkı sağlamaktadır. Özellikle izoproterenol uyarımıyla kontrol grubuna göre diyabetik grupta gözlenen azalmış cAMP artış seviyesinininde gevşeme yanıtında görülen azalmanın önemli bir nedeni olduğu sonucuna varılabilir. Çalışmamızda bazal ve uyarılmış durum cAMP miktar ölçümleri de bu hipotezi destekler niteliktedir (Şekil 3.5). Kontrol grubuna göre diyabetik grupta izoproterenol uyarımına istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0,05$) bir azalmayla yanıt elde edilirken, doksisklin veya selenyum uygulamasıyla bu azalma düzelebilmektedir. Bu çalışmanın sonuçları, mekanik aktivite sonuçları ile de uyumludur. Genel literatür verilerinden, azalmış cAMP miktarı ve dolayısıyla azalmış PKA aktivitesiyle kasılma gevşeme elemanları üzerindeki fosforilasyon-defosforilasyon dengesindeki bozulmaya bağlı olarak gevşeme yanıtında gözlenen azalmalar açıklanabilmektedir. Buna karşın, yukarıda birkaç makaleden örneklerini verdiğimiz son yıllarda önem kazanan ve “cross talk” olarak adlandırılan bir mekanizmayla cAMP/PKA ile cGMP/PKG yolları arasında gerçekleşen etkileşim ortaya konmaktadır. RIA ölçümlerinde baskın olarak cGMP yolağını kullanarak etkilerini gösteren ajanlardan bir NO donörü olan sodyum nitrit ve asetilkolin uyarımına karşın gözlemllediğimiz cAMP miktarındaki artış bu etkileşimi göstermektedir.

Gevşeme yanıtlarında, asetilkolin ve izoproterenol uyarımına karşı diyabetik grupta kontrol grubuna göre gözlenen istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0,05$) azalmanın doksisklin veya selenyum uygulamasıyla kontrol değerlerine çekilmesine rağmen, sodyum nitrit veya forskolin uyarımına karşı elde edilen yanıtlarda gruplar arasında farklılık gözlenmemektedir. Bu veri bize diyabete bağlı gözlenen fonksiyon bozukluğunun reseptör düzeyinde meydana gelen bir hasardan kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca damarın gevşeme

yanıtı oluşturma mekanizmalarının diyabetin yıkıcı etkilerinden etkilenmediğini göstermektedir. Doksisiklinin azalmış yanıt üzerine restore edici etkisi MMP'lerin vasküler ton üzerindeki önemli etkilerini göstermektedir. MMP'lerin hücre içi proteinler ve sinyal yollarıyla olan ilişkisi yeni yeni çalışılmaya başlanmış bir konu olmasına rağmen literatürde bu etkilerini gösteren önemli makaleleri bulmak ve bulgularımızı yorumlayabilmek için referans göstermek mümkündür. Şöyle ki; proteolitik olarak aktifleşmiş MMP'ler çeşitli substratları parçalayarak bazı vazodilatör maddelerin oluşumuna neden olurlar. Örneğin MMP-2 büyük (big) Endotelin-1 mediatörünü parçalayarak vazokonstriktör bir peptid olan orta (medium) Endotelin-1' in oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Fernandez-Patron ve ark., 1999). Yine aynı araştırma grubu MMP-2' nin kalsitonin-genilişkili-peptidi parçalayarak onun vazodilatör etkisini ortadan kaldırdığını göstermişlerdir (Fernandez-Parton ve ark., 2000). Ayrıca Martinez ve ark. MMP-2' nin vazodilatör bir peptid olan adrenomedullini parçalayarak vazodilatör ya da vazokonstriktör etkiye sahip farklı ürünler oluşturduğunu göstermişlerdir (Martinez ve ark., 2004). Tüm bu veriler ışığında, MMP-2' nin proteolitik aktivitesi sonucunda dolaylı yoldan vasküler tonunun düzenlenmesinde rol aldığı anlaşılmaktadır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada da MMP-2 ve -9' un Ca^{2+} hücre içine girişini engelleyerek vazodilatasyona neden olduğu rapor edilmiştir (Chew ve ark., 2004). Bu deneyde fenilefrin ya da KCl ile kastırılmış damar şeritleri üzerine rekombinant MMP-2 ve -9 eklenerek gevşeme yanıtı gözlenmiştir. Buna ek olarak, gevşeme etkisinin matriks yapısına yönelik bir enzimatik işlem ile ilişkili olup olmadığını test etmek amacıyla elektron mikroskobu yardımıyla ekstraselüler matriks incelenmiş fakat herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Gözlenen bu cevabın endotelde bulunan ve proteazlar tarafından aktive edilen bir reseptörün uyarımı sonucunda NO üzerinden gerçekleşen gevşeme yolağını kullanarak ortaya çıkmış olabileceği ileri sürülmüştür. Paralel olarak, başka bir çalışmada MMP-2' nin pulmoner düz kas hücresi plazma membranında bulunan Ca^{+2} -ATPaz aktivitesini upregüle ettiği gösterilmiştir ve bu sayede $[Ca^{2+}]_i$ ayarlanmasını regüle ettiği öne sürülmektedir (Mandal ve ark., 2003). Tüm bu çalışmalardan yararlanarak doksisiklin uygulamasıyla gözlenen restorasyonda; diyabetik etkilerin neden olduğu hasar sonucu artmış MMP-2 ve MMP-9 düzeyinin veya azalmış TIMP-4 seviyesinin

geri çevrilmesiyle, bu değişimlerin tetiklediği hücre içi kalsiyum hemostazından sorumlu mekanizmalarda meydana gelmiş olabilecek olası defektlerin önüne geçilmesinin yada vazoaaktif maddelerin fizyolojik etkilerini gösterebilecek formda kalmalarının sağlanmasının rolü olduğu düşünülebilir.

İlginç bir bulgu olarak MMP-2' nin yukarıdaki etkilerinin okside edici ajanlarla sinerjistik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Das ve ark., 2002). Sıçan mezenterik arterlerinde yapılan çalışmalarda da farklı G-protein kenetli agonistlerin MMP aktivasyonu aracılığıyla kasılma yanıtına neden oldukları bu etkinin ise epidermal büyüme faktörü reseptörünün aktivasyonu ve/veya mitokondriyel ROS artışı sonucunda oluştuğu düşünülmektedir (Hao ve ark., 2004; 2006). Uemura ve arkadaşları diyabetik sıçanlarla yaptıkları deneyler sonucunda MMP-9 aktivitesinin diyabetik damarlarda arttığını göstermiş ve bu artışın hiperglisemi tarafından tetiklenen oksidatif stresin, enzimin ekspresyon aşamasına etkisi sonucunda gözlemlendiğini göstermişlerdir (Uemura ve ark., 2001). Okamoto ve ark. MMP-1, 8 ve 9' un propeptid domainin ayrılması gerçekleşmeksizin peroksinitrit tarafından aktive edilebildiklerini göstermişlerdir (Okamoto ve ark., 1997; 2001). Buna karşın Owens ve ark. yüksek doz peroksinitrit varlığında (>100 μ M) MMP aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir (Owens ve ark., 1997). Son yıllarda gerçekleştirilen paralel çalışmalarda 72 kDa' luk full length insan rekombinant MMP-2'sinin 0,3 - 10 μ M konsantrasyonlarında peroksinitrit uygulamasıyla aktive olduğunu ancak 100 μ M konsantrasyonunda bu aktivasyonun yerini inhibisyona bıraktığı gösterilmiştir (Viappianni ve ark., 2006). Ayrıca MMP' lerin doku inhibitörlerinden olan TIMP-4' ün özellikle oksidatif hasara karşı koruyucu cevap olarak, ekspresyon düzeyinde artış gösterdiği düşünülmektedir (Schulze ve ark., 2003; Cox ve ark., 2004). Literatür verilerine paralel olarak bizde çalışmamızda diyabetik damarlarda azalmış MMP-2 ve -9 aktivitesi buna karşın değişmeyen protein seviyesi ölçümleri elde ettik (Şekil 3.7, Şekil 3.8). Yine MMP' lerin doku inhibitörü olan TIMP-4 miktarında da diyabetik grupta kontrole göre anlamlı bir artış gözlerken, doksisisiklin veya selenyum uygulamasının bu etkiyi geri çevirdiğini gözlemledik (Şekil 3.9). MMP aktivasyonunda ölçtüğümüz azalmanın nedeni; diyabet kalma süresinin uzunluğuna bağlı olarak kronik etki

altında enzimlerin artmış aktivitelerinin devamı sonucunda aktivitelerinde gözlenen azalma ya da Owens ve arkadaşlarının önerdiği gibi aşırı derecede artmış oksidanların etkisi sonucu gerçekleşmiş olabilir.

Sonuç olarak tüm bu kaskad reaksiyonlar içinde matriks metallopoteinazların fizyolojik durumlarda sinyal yollarıyla etkileşimi ve diyabet gibi patofizyolojik durumlardaki davranışları hakkında bilgi edinebilmek için daha kapsamlı deneyler yapılması ve bu sayede terapötik stratejiler geliştirilmesi konusunda daha sağlam adımlar atılması gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma matriks metalloproteinazların diyabetle birlikte gelişen vasküler disfonksiyonlardaki rolünü değerlendirmektedir. Ayrıca bir MMP inhibitörü olan doksisisiklinin ve bilinen bir antioksidan olan selenyumun gelişen bu patogenezi geri çevirme kapasitelerini ortaya koymaktadır.

Diyabetle birlikte damarın mekanik aktivitesinde azalmalar meydana gelmektedir. Bir ay diyabet kalan ratlarda tek doz fenilefrine uyarımına karşı gösterilen cevap, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte doksisisiklin veya selenyum uygulaması bu disfonksiyonu kontrol seviyelerine geri çevirmiştir.

Elde edilen fenilefrin kasılma cevapları üzerinden kaydedilen gevşeme cevapları değerlendirildiğinde diyabetik grupta asetilkolin ve izoproterenol uyarımına karşı verilen gevşeme cevabı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalırken, doksisisiklin veya selenyum uygulamasının bu etkiyi restore ettiği gözlenmiştir. Ekzojen nitrik oksit donörü olan sodyum nitrit veya adenilat siklaz aktivatörü olan forskolin uyarımına karşı elde edilen gevşeme yanıtı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir.

Damar homojenatlarında ölçülen toplam ve serbest tiyol seviyeleri değerlendirildiğinde diyabetik grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma gözlenirken doksisisiklin veya selenyum uygulamasının bu azalmayı restore ettiği gözlenmiştir. Yine homojenatlardan ölçülen nitrit seviyelerine bakılığında diyabetik grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma gözlenirken doksisisiklin veya selenyum uygulamasının bu azalmayı restore ettiği gözlenmiştir. Diyabetle azalan tiyol grup

seviyeleri artmış oksidan stresin bir sonucu olarak görülürken, azalan nitrit seviyeleri endotelial NO sentaz inaktivasyonuna bağlanabilir.

Damar şeritlerinde ölçülen, bazal ve uyarılmış durumdaki cAMP miktarları değerlendirildiğinde diyabetik grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde izoproterenol, forskolin, asetilkolin ve sodyum nitrit uyarılarına karşı elde edilen artış miktarında anlamlı düzeyde azalma olduğu ve bu azalmanın doksisiklin veya selenyum uygulamasıyla istatistiksel olarak anlamlı bir restorasyonun gerçekleştiği gözlenmektedir.

Beş hafta boyunca diyabet kalmış sıçanların damar homojenatları incelendiğinde MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinde azalma gözlenirken, TIMP-4 protein seviyesinde artış gözlenmiştir ve tüm bu etkiler doksisiklin veya selenyum uygulamasıyla kontrol değerlerine istatistiksel olarak anlamlı düzeyde geri çekilmiştir.

Görüldüğü gibi uzun yıllar ekstrasellüler etkileriyle gündemde olan metalloproteinaz enzim ailesi, aslında organ fonksiyonunu etkileyen pek çok mekanizmayla ilişkili ve sinyal yollarıyla etkileşim içindedir. Bu enzimlerin fizyolojik koşullarda hangi yollar üzerinde düzenleyici etki gösterdiği ve patofizyolojik durumlarda patolojik süreçlere nasıl katkı sağladığını tam olarak aydınlatılabilmek tedavi açısından büyük öneme sahiptir. Bu bakımdan ileri ki çalışmalarda bu enzimler üzerine daha yoğunlaşmış olarak daha çok moleküler düzeyde gerçekleştirilen çalışmalarla etkileşimleri hakkında bilgi sahibi olunabilir. Literatürde özellikle in vitro çalışmalarla MMP'lerin akut etkileri çalışılmış fakat kronik etkileri ya da zamana ve uyarıcı durumun devamlılığına bağlı olarak aktivite değişimleri araştırılmamıştır. İleri ki çalışmalarda MMP'lerin kronik etki altındaki davranışları ve bu süreçte değişen hücre içi dinamikler incelenmesi bu konunun aydınlatılması bakımından büyük önem taşımaktadır.

ÖZET

Matriks Metalloproteazların Diyabetik Sıçanların Endotel Bağımlı Damar Fonksiyonlarındaki Rolü

Diyabetin neden olduğu komplikasyonlarda hücrelerde reaktif oksijen türlerinin artmasının ve antioksidan savunma sisteminin zayıflamasının önemli rolü olduğuna ilişkin önemli kanıtlar mevcuttur. Hücrelerde oksidan strese bağlı olarak ekstrasellüler matriks metalloproteinazların çeşitli patolojik durumlarda arttığı ve özellikle kardiyovasküler sistem fonksiyonlarında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında, streptozotosin ile diyabet yapılmış sıçanların endotelli torasik aortalarında azalan alfa adrenerjik, beta adrenerjik ve muskarinik yanıtlarına MMP inhibitörü doksisiklinin ve antioksidan selenyumun diyabetin oluşturduğu etkilere karşı olası koruyucu etkileri araştırılmıştır. Diyabetli sıçanlara normal beslenmelerine ek olarak doksisiklin (15 mg/kg/day) veya selenyum tuzu (300 µg/kg/day) 4 hafta boyunca verilmiştir. Diyabet, damar örneklerinde fenilefrin kasılma yanıtlarının inhibe olmasına neden olurken, doksisiklin veya selenyum verilmiş diyabetli sıçan örneklerinde bu yanıtların kontrol değerlerine yaklaştığı gözlenmiştir. Damar homojenatlarında zymografi ve western blot teknikleri kullanılarak MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi ve protein seviyesi ölçülmüş, aktivitenin diyabetik sıçanlarda azaldığı, protein seviyelerinin ise değişmediği görülmüştür. Doksisiklin veya selenyum verilen diyabetik sıçanlarda aktivitenin kontrol grubu düzeylerinde olduğu görülmüştür. Hem selenyum hem de doksisiklinin benzer şekilde etkinlik göstermesi bu maddelerin inhibitör ve/veya antioksidan özelliklerinin diyabette artan oksidan stresi azaltabileceği ve gözlenen patolojileri düzeltebileceği hipotezini öne çıkarmıştır. Bu hipotezi doğrulamak için damar örneklerinde serbest ve total SH seviyeleri ölçülmüş, diyabetli grupta özellikle serbest SH seviyesinin azaldığı gözlenmiştir. Doksisiklin veya selenyum uygulaması bu azalmayı benzer şekilde engellemiştir. Bu çalışmanın sonuçları, diyabet kaynaklı azalan damar alfa, beta-adrenerjik ve muskarinik reseptör yanıtlarında oksidan strese bağlı MMP aktivasyonunun rolü olabileceğini, doksisiklinin bir MMP inhibitörü olarak ve selenyumun antioksidan etkisi ile diyabet bağımlı kardiyovasküler bozukluklarda önemli bir koruyucu ajan olabileceklerini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Matriks Metalloproteinaz, Doksisiklin, Diyabet, Selenyum, Endotel, Vazodilatasyon

SUMMARY

Investigation of Matrix Metalloproteinases' Roles on Vessel Function in Diabetic Rats

The long term morbidity of diabetes mellitus is characterized by increased oxidative stress and involves the increased activity of matrix metalloproteinases (MMPs) in different tissues. The activities of matrix metalloproteinases can increase, and their endogenous inhibitors (TIMPs) decrease, in response to enhanced oxidative stress. This imbalance may contribute to the functional changes in the vasculature in diabetes. We therefore investigated the effect of the MMP inhibitor doxycycline (15 mg/kg/day) and sodium selenate (300 μ mol/kg/day) treatment on the contractile function of aorta from streptozotocin-induced (50 mg/kg) diabetic rats. Selenium compounds can restore some metabolic parameters and structural alterations of diabetic rat tissues which appeared with oxidative stress, we tempted to investigate whether these beneficial effects extend to the diabetic rat isolated thoracic aorta dysfunctions. Doxycycline treatment of diabetic rats improved the aortic depressed contraction or relaxation response to alpha adrenergic, beta adrenergic and muscarinic receptors caused by diabetes. MMP-2 and MMP-9 protein levels were unchanged in diabetic aorta with respect to controls. But activity of these enzymes reduced with diabetes. Doxycycline or selenium treatment of diabetic rats significantly attenuated these changes. The protective effect of an MMP inhibitor or an antioxidant on the contractile and vasodilator activities and MMP-2, -9 level in the aorta from the diabetic rat implies a role for MMPs in diabetes-induced vascular dysfunction. Our data suggest that inhibitors of MMP activity may be potentially of therapeutic benefit in reducing the severity of vascular injury associated with diabetes and their activity may related strongly with oxidative stress.

Key Words: Matriks Metalloproteinases, Doxycycline, Diabetes, Selenium, Endothelium, Vasodilatation

KAYNAKLAR

- ABEBE, B., MACLEOD, K.M.(1991). Enhance arterial contractility to noradrenaline in diabetic rats is associated with increased phosphoinositide metabolism. *Can. J. Phramacol.*, 69:355-361.
- ABEBE, W., HARRIS, K.H., MACLEOD, K.M.(1990). Enhance contractile responses of arteries from diabetic rats to alpha-1 adrenoreceptor stimulation in the absence and presence of extracellular calcium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16:239-248.
- ALLAN, J.A., DOCHERTY, A.J.P., BARKER, P.J., HUSKISSON, N.S., REYNOLDS, JJ, MURPHY, G.(1995). Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J*, 309:299- 306.
- ARTEEL, G.E., SIES, H.(2001). The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*.10: 153- 158.
- AYAZ, M., CAN, B., OZDEMIR, S., TURAN, B. (2002). Protective effect of selenium treatment on diabetes-induced myocardial structural alterations. *Biol Trace Elem Res.* 89(3):215- 26.
- AYAZ M., OZDEMIR S., UGUR M., VASSORT G., TURAN B.(2004). Effects of Selenium on altered mechanical and electrical cardiac activities of diabetic rat. *Arch. Biochem. Biophy.*, 426: 83-90
- AYAZ M, TURAN B. (2006). Selenium Prevents Diabetes-Induced Alterations in $[Zn^{2+}]_i$ and Metallothionein Level of Rat Heart via Restoration of Cell Redox Cycle. *Am. J. Physiol.*, (Heart and Circ. Physiol.), 290: H1071-80
- BARCEOLUX , D.G.(1993). Selenium. *Clinical Toxicology*. 37(2):145 -172.
- BAZERRA, M.M., BRITO, G.A., RIBEIRO, R.A., ROCHA, F.A.(2002). Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res*; 35(5): 613- 6.
- BENDECK, M.P., CONTE M., ZHANG, M., NİLİ, N., STRAUSS, B.H., FARWLL, SM.(2002). Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration and matrix remodelling after arterial injury. *Am J Pathol*; 160(3): 1089-95.
- BENDECK, M.P., IRVİN, C., REİDY, M.A.(1996). Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ Res*; 78: 38- 43.
- BOLTON, T.B. (1979). Mechanisims of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.*, 3: 606-718.
- BRODY, J.C., DICKSON, R.L.(1964). Vascular reactivity in experimental diabetes mellitus. *Circ. Res.*, 14:495-501.

- BUCALA, R., TRACEY, K.J., CERAMI, A.(1991). Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 87: 432- 438.
- BURK, R.F., HILL, K.E., MOTLEY, A.K.(2003). Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *J Nutr.* 2003;133(5 Suppl):1517- 1520.
- CARDILLA C., KILCOYNE C:M, QUYYUMI A., CANNON R., PANZA J.(1997). Decreased vasodilator response to isoproterenol during nitric oxide inhibition in humans. *Surg Clin North Am.* 30:918-921.
- CARRICO, T.J., MEHRHOF, A.I., COHEN, I.K.(1984) Biology of wound healing. *Surg Clin North Am.* 64: 721- 733.
- CHAKRABORTI, S., MANDAL, M., DAS, S., MANDAL, A., CHAKRABORTI, T.(2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253: 269- 285.
- CHAMPBELL, R.K. (1984). Diabetes in clinical pharmacy and therapeutics. Ed: Herfindal, E.T., Hirsman, J.L., Baltimore.
- CHEW, D.K., CONTE, M.S., KHALIL, R.A. (2004). Matrix metalloproteinasespecific activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 98: 2572–2579.
- CHOW A.K., CENA J., SCHULZ R.(2007) Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *British Journal of Pharmacology* 152: 189-205.
- CHRISTLIEB, A.R., JANKA, H.U.(1976). Vascular reactivity to angiotensin II and to norepinephrine in diabetic subjects. *Diabetes*, 25:268-274.
- CHROSTLIEB, A.R., JANKA, H.U. (1976). Vascular reactivity to angiotensin II and to norepinephrine in diabetic subjects. *Diabetes*, 25:268-274.
- CIPOLLA m., CALLES-ESCANDON J.(2001) Diabetes and Endothelial Dysfunction: A Clinical Perspective. *Endocrine Reviews* 22(1): 36-52
- CONLEY, M.S., BRUHN, R., MORGAN, P. (2004). Selenium's Effects on MMP-2 and TIMP-1 secretion by Human Trabecular Meshwork Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*: 45:473- 479.
- COURTMAN, D.W., FRANCO, C.D., MENG, Q., BENDECK, M.P.(2004). Inward remodelling of the rabbit abdominal aorta is blocked by the MMP inhibitor doxycycline. *J. Vasc. Res.*;41:157.
- CREEMERS E.E., CLEUTJENS, J.P., SMITHS J.F., DAEMEN M.J.(2001). Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: A new approach to prevent heart failure? *Circ.Res.*;89:201.
- CURCI, J.A., MAO, D., BOHNER, D.G., ALLEN, B.T., RUBIN, B.G., REILLY, J.M. (2000). Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and

activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*; 31: 325- 42.

- DAS, S., CHAKRABORTI, T., MANDAL, M., MANDAL, A., CHAKRABORTI, S. (2002). Role of membrane-associated Ca²⁺ dependent matrix metalloproteinase-2 in the oxidant activation of Ca-ATPase by tertiary butylhydroperoxide. *Mol Cell Biochem* 237: 85–93.
- DAS, U.N. (2002). Is insulin an endogenous cardioprotector? *Crit Care*. 6(5): 389- 393.
- DE FRONZO, R.A., FERRANNINNI, E. (1982). The pathogenesis of noninsulin-dependent diabetes on update. *MEDICINE*, 61:125-127.
- De VRIESE, S., VAN de VOORDE, J., BLOM, H.J., VANHOUTTE, P.M.(2000). The impaired renal vasodilator response attributed to endothelium derived hyperpolarizing factor in streptozotocin- induced diabetic rats is stored by 5-methyltetrahydrofolate. *Diabetologia* 43: 1116- 1125.
- DOLLERY, C.M., McEWAN, J.R., HENNEY, A.M.(1995). Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. *Circ Res* ; 77: 863- 9.
- DOUILLET, C., BOST, M., ACCOMINOTTI, M., BORSON-CHAZOT, F., CIAVATTI M.(1998).Selenium In Diabetes: Effects of Selenium on Nephropathy in Type1 Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biol Trace Elem Res*. Dec;65(3):221- 228.
- DÖKMECİ İ.(2000). Farmakoloji, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd,: 981- 6.
- EZAKI, O. (1990). The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 265(2):1124- 8.
- FABUNMI, R., BAKER, A., MURRAY, E.(1996). Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J*. 315: 335-342.
- FARHANGKHOEE H., KHAN A.Z., KAUR H., XIN X., CHEN S., CHAKRABARTI S.(2006). Vascular endothelial dysfunction in diabetic cardiomyopathy: Pathogenesis and potential treatment targets. *Pharm.&Therapeutics*.111:384-399.
- FELETOU, M., VANHOUTTE, P.M.(2000). Endothelium dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin* 21:1-18.
- FERNANDEZ-PATRON, C., RADOMSKI, M.W., DAVIDGE, S.T.(1999). Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ. Res.*;85:906- 911.
- FERNANDEZ-PATRON, C., STEWART, K.G., ZHANG, Y., KOIVUNEN, E., RADOMSKI, M.W., DAVIDGE, S.T. (2000). Vascular matrix metalloproteinase-2- dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* 87: 670–676.
- FERRO A., QUEEN L.R., Priest R.M., Xu B., Ritter J.M., Word J.P.(1999). Activation of nitric oxide synthase by beta2 adrenoreceptors in human umbilical vein endothelium in vitro *Br. J. Pharmacol*. 126:1872-1880.

- FINLEY, J.W., KINCAID, R.L.(1991). Effect of sex and time of sampling on selenium and glutathione peroxidase activity in tissues of mature rats. *Biol Trace Elem Res.* Jun; 29(3):181- 91.
- FOX, M. J.(1992). Selenium: Nutritional implications and prospects for medicine. *Meth Find Exp Clin Pharmacol.* 14(4): 275- 287.
- FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V.(1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 88: 373- 376.
- GABBAY, K.H.(1973). The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N Engl J Med* 288: 831- 836.
- GARCIA, M.J., McNAMARA, P.M.(1974). Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population: sixteen year follow-up study. *Diabetes* 23: 104-111.
- GARCIA, S.F., VIRAG, L., JAGTAB, P., SZABO, E., MABLEY, J.G., LIANDET, L., MARTON, A., HOYT, D.G., MURTHY, N.G., SALZMAN, A.L., SOUTHAN, G.J.(2001). Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med* 7: 108- 113.
- GHOSH, R., MUKHERJEE, B., CHATTERJEE, M. (1994). A novel effect of selenium on streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes Res.* 25(4):165- 71.
- GIUGLIANO, D., CERIELLO, A., PAOLISSO, G.(1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19: 257- 267.
- GOLUB, L.M., GOODSON, J.M., LEE, H.M., VIDAL, A.M., McNAMARA, T.F.(1988) Tetracyclines inhibit tissue collagenases. Effects of ingested low-dose and local delivery systems. *J Periodontol.* 56: 93- 97.
- GOLUB, L.M., LEE H.M., RYAN, M.E.(1998). Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res;* 12: 12- 26.
- GOLUB, L.M., LEE, H.M., LEHRER, G., NEMIROFF, A., McNAMARA, T.F., KAPLAN, R., RAMAMURTHY, N.S.(1983). Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. *J Periodont Res.* 18: 516- 526.
- GUPTA, R., SINGH, M., SHARMA, A.(2003). Neuroprotective effect of antioxidants on HAO, L., NISHIMURA, T., WO, H., FERNANDEZ-PATRON, C.(2006). *Arterioscler.Thromb. Vasc.Biol.*;26:819- 825.
- GURDAL H., FRIEDMAN E., JOHNSON M.D. (1998). Decrease in apparent alpha-1 adrenoceptor G protein coupling during maturation in rat aorta. *J Gerontology Biol. Sci Med Sci.* Jul; 53(4):B268-73.
- HIGDON, J. (2001) Linus Pauling Institute [http: // lpi. Oregon state. Edu/infocenter/minerals/selenium/](http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/selenium/)
- HINK, U., LI H., MOLLNAN, H., OELZE, M., MATHEIS E.(2001). Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 88: E14- E22.

- HO, F.M., LIU, S.H., LIN, W.W., LIAU, C.S. (2007). Opposite effects of high glucose on MMP-2 and TIMP-2 in human endothelial cells. *J Cell Biochem* 101: 442–450.
- HOYT, J.C., BALLERING, J., NUMANAMI, H., HAYDEN, J., ROBBINS, R.A. (2006). *The Journal of Immunology*; 176:567- 572.
- INSERTE, J., GARCÍA-DORADO, D., RUIZ-MEANA, M., AGULLO, L., PÍNA, P., SOLER-SOLER, J. (2004). Ischemic preconditioning attenuates calpain mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 64: 105–114.
- ITEGİN, M.(2002). ARSIV.11: 305- 320. inhibition of Ca entry mechanisms of vascular contraction. *J Vasc Surg* 40: 1001–1010. ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Pharmacol Res.* 48(2):209- 215.
- JEYABALAN, A., NOVAK, J., DOTY, K.D., MATTHEWS, J., FISHER, M.C., KERCHNER, L.J. (2007). Vascular matrix metalloproteinase-9 mediates the inhibition of myogenic reactivity in small arteries isolated from rats after short-term administration of relaxin. *Endocrinology* 148: 189–197.
- JUHASZOVA, M., ZOROV, D.B., KİM, S.H., PEPE, S., FU, Q., FISHBEIN, K.W. (2004). Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 113: 1535–1549.
- KABAT A., PONICKE K., SALAMEH A., MOHR F., DHEIN S.(2004). Effect of a beta 2 adrenoreceptor stimulation on hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *J Clin Invest* 308:564-573.
- KATUSIC, Z.S.(2001). Vascular endothelial dysfunction : does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H981- H986.
- KLATT, P., SCHMIDT, K., URAY, G., MAYER, B.(1993). Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterisation, co factor requirement and the role of N omega-hydroxyl-L-arginine as an intermediate. *J Biol Chem* 268: 14781- 14787.
- KOKSOY A.A., SARI AHMETOĞLU M., ONAY-BEŞİKÇİ A., SCHULZ R., TURAN B.(2007). Inhibition of Matrix Metalloproteinase activity by Selenium and Doxycyclin in Heart and Aorta of Diabetic Rats. *FASEB J.* Mar;21:LB100
- KOYA, D., KING, G.L.(1998). Protein kinase-C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47: 859- 866.
- KRUSE-JARRES, J.D., RUKGAUER, M. (2000). Trace elements in diabetes mellitus. Peculiarities and clinical validity of determinations in blood cells. *J Trace Elem Med Biol.* 14(1): 21- 7.
- LAIGHT, D.W., CARNER, M.J., ANGGARD, E.E.(2000). Antioxidants diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Resc* 47: 457- 464.
- LARNER, J. (1985). Insulin and oral hypoglycemic drugs, glucagon. Goodman and Gilman's the pharmacological basis therapeutics. 7th Eds: Gilman A.G., Goodman L.S., Rall T.W., Murad F., *MacMillan Publ. Comp., New York*, p: 1490-1516.

- LECO, K.J., APTE, S.S., TANIGUCHI, G.T., HAWKES, S.P., KHOKHA, R., SCHULTZ, G.A. (1997). Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett* 401: 213–217.
- LEE, M.H., MURPHY, G.(2004). Matrix metalloproteinases at a glance. *J Cell Science*; 117:4015- 6.
- LEGAN, E., CHENAUS, B. (1985). Activation of phosphotylinositol turnover in rat aorta by alpha-1 adrenergic receptor stimulation. *Eur. J. Pharmacol.*, 110:389-390.
- LEGAN, E., CHENAUS, B.(1985). Activation of phosphotylinositol turnover in rat aorta by alpha-1 adrenergic receptor stimulation. *Eur. J. Pharmacol.*, 110: 389-390.
- LEGAN, E.(1989). Effect of STZ-induced hyperglycemia on agonist-stimulated phosphatidylinositol turnover in rat aorta. *Life Science*, 45:371- 378.
- LOFTUS, I.M., PORTER, K., PETERSON, M., BOYLE, J., LONDON, N.J.M., BELL P.R.F.(1999). MMP inhibition reduces intimal hyperplasia in a human vein graft stenosis model. *Ann N Y Acad Sci*; 30(878): 547- 50.
- LU, X., LIU, S.Y.(2004) Enhancement of endothelium dependent relaxation in the rat aortic ring by selenium supplement. *Cardiovasc. Res.* 28(3):345- 8.
- LUCCHESI, B.R.(1989). Role of calcium on excitation-contraction coupling in cardiac and vascular smooth muscle. *Circulation*, 80(suppl.4):1-13.
- LUKENS, F.D.W. (1938). Pancreatotomy in the goat. *Am. J. Physiol.*, 122:729-733.
- LUKENS, F.D.W. (1963). Pancreatotomy in the pig. *Am. J. Physiol.*, 118: 312.
- LUTTUN A., CARMELIET, P.(2004). Angiogenesis and lymphangiogenesis: highlights of the past year. *Curr Opin Hematol* 11: 262- 271.
- MADSBAD, S. (1983). Prevalence of residual beta-cell function and its metabolic consequences in type I diabetes. *Diabetologia*, 24:141-148.
- MALEMUD, C.J.(2006). Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 11: 1696- 1701.
- MANCINI, A., Di BATTISTA, J.A.(2006). Transcriptional regulation of matrix metalloproteinase gene expression in health and disease. *Front Biosci* 11: 423- 446.
- MANDAL, M., DAS, S., CHAKRABORTI, T., MANDAL, A., CHAKRABORTI, S. (2003). Role of matrix metalloproteinase-2 in oxidant activation of Ca²⁺ ATPase by hydrogen peroxide in pulmonary vascular smooth muscle plasma membrane. *J Biosci* 28: 205–213.
- McDONALD, L.J., MURAD, F.(1995). Nitric oxide and cGMP signaling. *Adv Pharmacol* 34: 263-275.
- MCNEILL, J.H., DELGATTY, H.L., BATTELL, M.L. (1991). Insulinlike effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 40(12): 1675- 8.

- MICHEL, T., FERON, O.(1997). Nitric oxide synthases: which, where, how and why? *J Clin Invest* 100: 2146- 2152.
- MIIE T., KUNISHIRO K., KANDA M., AZUKIZOWA S., KURAHASHI K.,SHIRAHASE H.(2008). Impairment of endothelium dependent ACh- induced relaxation in aorta of diabetic db/db mice possible dysfunction of receptor and/or receptor-G protein coupling. *J Clin Invest* 377:401-410.
- MOEHLER, T.M., HO, A.D., GOLDSCHMIDT, H., BARLOGIE, B.(2003). Angiogenesis in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 45: 227- 244.
- MONCADA, S., VANE, J.R.(1978). Pharmacology and endogenous roles of prostoglandins endoperoxidase, thromboxane A2 and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30: 293-331.
- MURPHY, S., FRISHMAN, W.H .(2005). Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target. *Cardiol Rev* 13: 3–12.
- NAGASE, H, WOESSNER, JF.(1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*; 274(31): 21491- 4.
- ORBE, J., FERNANDEZ, L., RODRIGUEZ, J.A.(2003). Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed. *Atherosclerosis*;170:269- 76.
- OWEN, M.P., CARRIER, G.O.(1979). Alteration in vascular smooth muscle sensitivity to vasoconstrictor agonists by STZ-induced diabetes. *Proc. Wset. Pharmacol. Soc.*, 22:363-366.
- OWENS, M.W., MILLIGAN, S.A., JOURD'HEUIL, D., GRISHAM, M.B. (1997). Effects of reactive metabolites of oxygen and nitrogen on gelatinase A activity. *Am J Physiol* 273: L445–L450.
- PALMER, R.M., FERRIGE, A.G., MONCADA, S.(1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- PENPARGKUL, S., SCHEUER, J.(1980). The effect of diabetes on performance and metabolism of rat hearts. *Circ Res.* 47(6): 911- 21.
- PORTE, D., HALTER, J.B. (1981). The endocrine pancreas and diabetes mellitus. In: Textbook of endocrinology, Ed: Williams, R.H., Philadelphia p: 715-717.
- RAJAGOPALAN, S., MENG, X.P., RAMASAMY, S., HARRISON, D.G., GALIS, Z.S.(1996).Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest.*;98: 2572-2579.
- RAJAGOPALAN, S., MENG, X.P., RAMASAMY, S., HARRISON, D.G., GALIS, Z.S. (1996). Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foamcells regulate the vasoactive tone. *J Clin Invest.*;98: 2572-2579.
- RAKIETEN, N., RAKIETEN, W.L., NAOLKAMI, M.V.(1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemotherapy Rept.*, 29: 91-98.

- RAPAPORT, R.M.(1987). Effect of norepinephrine on contraction and hydrolysis of phosphatidylinositols in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242: 88-194.
- REUSCH, J.E. (2003). Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose?. *J Clin Invest.* 112(7): 986- 988.
- RODHE, L.E., DUCHARME, A., ARROYO, L.H.(1999). Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* ;99:3063-70.
- ROTRUCK J.T., POPE A.L., GANTHER H.E., SWANSON A.B., HAFEMAN D.G., HOEKSTRA W.G. (1973). Selenium, Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. *Science* 179: 588-590.
- RUBANYI, G.M.(1993). The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 22(Suppl 4): S1-14.
- RUNDHAUG, J.E.(2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9: 267- 285.
- RUNDHAUG, JE.(2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*; 9(2):267- 85.
- SCARBOROUGH, N.L., CARRIER, G.O.(1982). Streptozotocin-induced diabetic changes in the rat cardiovascular system. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 25:125-127.
- SCARBOROUGH, N.L., CARRIER, G.O.(1983). Increased alpha-2 adrenoreceptor mediated vascular contraction in diabetic rats. *J. Auton. Pharmacol.*, 3:177-183.
- SCARBOROUGH, N.L., CARRIER, G.O.(1984). Nifedipine and alpha-adrenoreceptors in rat aorta. Role of extracellular calcium in alpha-1 and alpha-2 adrenoreceptor mediated contraction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 231: 597-602.
- SCHMID, A.M, HORI, O., BRETT, J., YAN, S.D., WAUTIER, J.L.(1994). Cellular receptors for advanced glycation end products: implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler. Thromb.* 14:1521- 1528.
- SCHWEIZER, U., BRAUER, A.U., KÖHRLE, J.(2004). Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Research Reviews.* 45: 164– 178.
- SEFTOR, R.E., SEFTOR, E.A., De, L.J., KLEINER, D.E., LEFERSON, J., STETLER-STEVENSON, W.G.(1998). Chemically modified tetracyclines inhibit human melanoma cell invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis*; 16: 217- 25.
- SELZER, M.G., ZHU, B., BLOCK, N.L., LOKESHWAR, B.L.(1999). CMT-3 a chemically modified tetracycline, inhibits bony metastases and delays the development of paraplegia in a rat model of prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci*; 30(878): 678- 82.
- SON S.M.(2007). Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. *Diabetes Res. And Clinical Practice.* 77S:S65-S70.

- STAMENKOVIC, I.(2003). Extracellular matrix remodelling: The role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200:448- 464.
- STEINMEYER, J., DEAFELDT, S., TAIWO, Y.O.(1998). Pharmacological effect of tetracyclines on proteoglycanases from interleukin-1 treated articular cartilage. *Biochem Pharmacol* ; 55: 93- 100.
- STERNLICHT, M.D., WERB, Z.(2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463- 516.
- SULLIVAN, S., SPARKS, H.V.(1979). Diminished contractile response of aortas from diabetic rabbits. *Am. J. Physiol.*, 236: H301-H306.
- SUSAN, TURNER.(1997). Selenium to prevent and treat cancer.Volume II, Issue I 635
www. hmscrown. com/selenium. htm-14k
- TAHILIANI, A.G, MCNEIL, J.H. (1986). Diabetes-induced abnormalities in the myocardium. *Life Sci.* 38(11): 959- 74.
- TAMARGO, R.J., BOK, R.A., BREM, H.(1991). Angiogenesis inhibition by minocycline. *Cancer Res*; 16: 217- 25.
- TESFAMARIAM, B., PALACINO, J.J., WEISBROD, R.M., COHEN, R.A.(1993). Aldose reductase inhibition restores endothelial cell function in diabetic rabbit aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 21:205- 211.
- TESFAMARIAN, B., COHEN, R.A.(1992). Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *AMJ Physiol* 263:H321-H326.
- THOMAS, J.P., GEIPER, P.G., GIROTH, A.W. (2003). Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein; role of selenoperoxides in cytoprotection against lipid hydroperoxide and iron-mediated reactions. *J Lipid Res.*34(3):479- 90.
- THOMPSON, R.W., BAXTER, B.T.(1999). MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci*; 30(878): 159- 78.
- TOI, M., ISHIGAKI, S., TOMINAGA, T.(1998). Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Breast Cancer Res Treat* 52: 113-124.
- TUNCAY E, SEYMEN AA, TANRİVERDİ E, YARAS N, TANDOĞAN B, ULUSUNN, TURAN B. (2007). Gender related differential effects of Omega-3E treatment on diabetes-induced left ventricular dysfunction. *Mol Cell Biochem.* 304(1-2):255-63
- TYAGI, S.C., CAMPBELL, S.E., REDDY, H.K., TJAHJA, E., VOELKER, D.J.(1996).Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol. Cell. Biochem.*;155:13-21.
- UEMURA, S., MATSUSHITO, H., LI, W., GLASSFORD, A.J., ASAGAMI, T., TSAO, S.P.(2001). *Circ. Res.*;88:1291- 1298.
- VERSPAGET-HEIN W.(1998).Proteases as prognostic markers in cancer. *BMJ.* 316:790-794.

- VISSE, R., NAGASE, H.(2003). Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Circ Res*; 92: 827- 39.
- VISSE, R., NAGASE, H.(2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 92:827- 839.
- VIAPPIANI, S., SAWICKI, G., CRAWFORD, B., LEON, H., SCHULZ, R. (2006). Peroxynitrite modulates 72 Kda matrix metalloproteinase-2 activity through S-nitrosylation of critical cysteines. *J Mol Cell Cardiol* 40: 907 (Abstract).
- VLASSARA, H., FUH, H., MAKITA, Z., KRUNGKRAI, S., CERAMI, A., BUCALA, R.(1992). Exogenous advanced glycation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 12043- 12047.
- WALOKOVITS, L.A., MOORE, V.L., BHARDWASH, N.(1992). Detection of Stremolysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. *Arthritis Rheum*. 35: 35- 42.
- WANG, W., SCHULZE, C.J., SUAREZ-PINZON, W.L., DYCK, J.R., SAWICKI, G., SCHULZ, R.(2002). Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* ;106:1543-9.
- WEIDMANN, P., BERETTA-PICOLLI, C. (1979). Sodium-volume factor cardiovascular reactivity and hypotensive mechanism of diuratic therapy in mild hypertension associated with diabetes mellitus. *Am. J. MED.*, 67:779-784.
- WEIR, G. (1982). Non-insulin dependent diabetes mellitus interplay btween beta cell inadequacy and insulin resistance. *Am. J. Med.*, 73: 461-467.
- WERNER-FELMAYER, G., WERNER, E.R., FUCHS, D., HANSEN, A., REIBNEGGER, G., SCHMIDT, K., WEISS, G., WACHTER, H.(1993). Pteridine biosynthesis in human endothelial cells. Impact on nitric oxide-mediated formation of cyclic GMP. *J Biol Chem* 268: 1842- 1846.
- WILLIAMS, B., GALLACHER, B., PATEL, H., ORME, C.(1997). Glucose-induce protein kinase-C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cell in vitro. *Diabetes* 46: 1497- 1503.
- WITKO-SARSAT, V., FRIEDLANDER, M., CAPEILLÈRE-BLANDIN, C., NGUYEN-KHOA, T., NGUYEN, A.T., ZINGRAFF, J., JUNGERS, P.(1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* ; 49: 1304- 1313.
- WU, Q., HUANG, K.(2006). Effect of Selenium compounds on the damage induced by oxysterol on rat arterial walls. *Biol Trace Elem Res*.112(3):273- 282.
- YU, Z., RAMAMURTHY, N.S., LEUNG, M., CHANG, K.M., McNAMARA, T.F., GOLUB L.M.(1993). Chemically-modified tetracycline normalizes collagen metabolism in diabetic rats: a dose-response study. *J Periodont Res*. 28: 420- 428.

ÖZGEÇMİŞ

I- KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: Esmâ Nur
Soyadı: Zeydanlı
Doğum yeri ve tarihi: Ankara – 25.12.1984
Uyruğu: T.C.
Medeni durumu: Bekar
İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik A.B.D. – 0312 3103010/337

II – EĞİTİMİ

Fevzi Atlıoğlu İlköğretim Okulu (1990-1995)
Kalaba İlköğretim Okulu (1995-1998)
Fatih Sultan Mehmet Lisesi (1998-2002)
Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2002-2006)
Yabancı dili: İngilizce

III – ÜNVANI

Biyolog

IV - ÜYE OLDUĞU BİLİMSEL KURULUŞLAR

International Society for Heart Research

V – BİLİMSEL ETKİNLİKLERİ

Katılmış olduğu kongreler ve Posterler

- Selenium in Health and Disease (Tübitak, 2006)
- Beneficial effect of sodium selenate on vascular dysfunction in diabetic rats. (ISHR Dünya Kongresi İtalya, Joint Meeting of The Slovak Physiological Society Slovakya, 2007)
- Doxycycline Ameliorates Diabetes-induced Vascular Dysfunction. (ISHR Dünya Kongresi İtalya, 2007)
- Diyabetli Sıçan Damar Düz Kası α 1-Adrenerjik Yanıtlarında Matriks Metalloproteinazlar ve Oksidatif Stresin Rolü. (Ulusal Farmakoloji Kongresi Trabzon, 2007)
- Role of Oxidant Stress and Matrix Metalloproteinases in Endothelium Dependent Relaxation of Diabetic Rats (NATO ARW Workshop İstanbul, 2008)

Destekler

- Son sınıflar için Yurtiçi Yüksek Lisans Bursu-2228 (TÜBİTAK)
- Kongre katılımı için burs desteği (ISHR)
- Yaz okuluna katılım için burs desteği (The Baltic Summer School, Marie Curie Programı Kapsamında)