



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**HİPERTANSİYONDA DAMARLARDA GELİŞEN
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN İNCELENMESİ**

SEVTAP HAN

FARMAKOLOJİ (Ecz.) ANABİLİM DALI

KASIM 2016



**HİPERTANSİYONDA DAMARLARDA GELİŞEN ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİNİN İNCELENMESİ**

Sevtap HAN

**DOKTORA TEZİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2016

Sevta Han tarafından hazırlanan “Hipertansiyonda damarlarda gelişen endoplazmik retikulum stresinin incelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. M. Orhan ULUDAĞ
Farmakoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



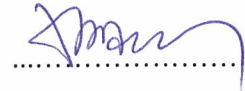
İkinci Danışman: Prof. Dr. Emine DEMİREL-YILMAZ
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



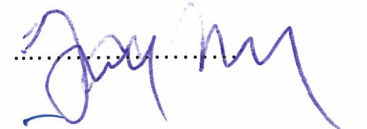
Başkan: Prof. Dr. Nurettin ABACIOĞLU
Farmakoloji Anabilim Dalı, Yakın Doğu Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



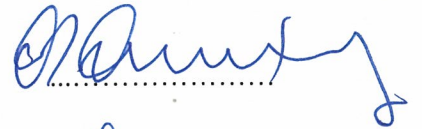
Üye: Prof. Dr. Fatma AKAR
Farmakoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye: Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY
Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



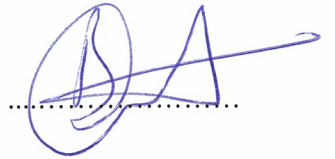
Üye: Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN
Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye: Doç. Dr. Bilgen BAŞGUT
Farmakoloji Anabilim Dalı, Yakın Doğu Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma Tarihi: 24/11/2016

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Sevtap HAN

24/11/2016

HİPERTANSİYONDA DAMARLARDA GELİŞEN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Sevtap HAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2016

ÖZET

Hipertansiyon oldukça karmaşık bir patogeneze sahiptir ve moleküler etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Katlanmamış/yanlış katlanmış proteinlerin endoplazmik retikulumda birikmesi durumu olan endoplazmik retikulum stresi (ERS) oldukça çeşitli sayıda hücrel strese cevaben oluşabilir. ERS yolağı kardiyovasküler hastalıklar için potansiyel bir hedef olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada ERS inhibisyonunun, damarlarda hipertansiyonda oluşan değişimler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hipertansiyon unilateral nefrektomi, deoksikortikosteron asetat (DOCA) enjeksiyonu (20 mg/kg, haftada iki kez) ve içme sularına % 1 NaCl ile % 0,2 KCl eklenmesi yoluyla erkek Wistar albino sıçanlarda (8 haftalık) oluşturulmuştur. Hayvanlar 12 hafta boyunca kan basınçları ölçülerek takip edilmiştir. Bir ERS inhibitörü olan tauroursodeoksikolik asit (TUDCA) (150 mg/kg/gün, ip), sıçanlara son dört hafta boyunca uygulanmıştır. Deney sonunda, hayvanlardan izole edilen torasik aortlarda kasılma ve gevşeme cevapları kaydedilmiştir. Total antioksidan kapasite ve bir nitrik oksit (NO) göstergesi olan nitrit seviyeleri spektrofotometrik olarak plazma örneklerinde ölçülmüştür. SERCA2, IP3R, PERK, p-PERK, Bax ve Bcl2 ekspresyon seviyeleri Western blot analizi ile torasik aort örneklerinde incelenmiştir. Bu çalışmada DOCA-tuz hipertansiyon modelinde ERS inhibisyonunun, sistolik kan basıncını azalttığı; endotel işlevlerinde iyileşme sağladığı; kasılma cevaplarını değiştirdiği; plazma NO seviyelerini artırdığı; aort SERCA2 ve IP3R ekspresyonlarını geri çevirdiği; aortta Bcl2 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Elde edilen bulgular, ERS inhibisyonunun hipertansiyondaki iyileştirici etkisinde, NO seviyelerini artırması, SERCA2 ve IP3R ekspresyonlarını düzeltmesi ve antiapoptotik etkileri ile birlikte damar işlevlerini düzeltici etkisinin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, ERS inhibisyonunun hipertansiyon üzerindeki olumlu etkisinin moleküler mekanizmalarına ışık tutmakta ve yeni tedaviler için potansiyel bir hedef öne sürmektedir.

Bilim Kodu : 1018.1

Anahtar Kelimeler : Hipertansiyon, endoplazmik retikulum stresi, endotel işlev bozukluğu, TUDCA.

Sayfa Adedi : 91

Danışman : Doç. Dr. M. Orhan ULUDAĞ

İkinci Danışman : Prof. Dr. Emine DEMİREL-YILMAZ

INVESTIGATION OF HYPERTENSION INDUCED ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN VESSELS

(Ph. D. Thesis)

Sevtap HAN

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

November 2016

ABSTRACT

Hypertension has complex pathogenesis therefore the molecular etiology remains poorly elucidated. Endoplasmic reticulum stress (ERS) which is a condition of the unfolded/misfolded protein accumulation in endoplasmic reticulum, may occur in response to a wide variety of cellular stress. ERS pathway has been defined as a potential target for cardiovascular disease. In the present study, effects of ERS inhibition on hypertension-induced alterations in vessel were investigated. Hypertension was induced through unilateral nephrectomy, deoxycorticosterone acetate (DOCA) injection (20 mg/kg, twice a week) and 1 % NaCl with 0,2 % KCl by adding to drinking water in male Wistar albino rats (8 weeks old). Animals were monitored by measuring blood pressures for 12 weeks. An ERS inhibitor tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) (150 mg/kg/day, i.p.), was administrated to animals for last four weeks. At the end of the experiment, contraction and relaxation responses of isolated thoracic aortas were recorded. Total antioxidant capacity and “nitrite” levels, as an indicator of nitric oxide (NO), were measured spectrophotometrically in plasma samples. The expression levels of SERCA2, IP3R, PERK, p-PERK, Bax and Bcl2 were examined by Western blot analysis in thoracic aorta. In the present study, it has been shown that ERS inhibition in DOCA-salt induced hypertension, reduced systolic blood pressure; improved endothelial dysfunction; changed vascular contractions; enhanced plasma NO levels; restored aortic expressions of SERCA2 and IP3R; increased aortic Bcl2 expression. These obtained data suggest that the beneficial effects of ERS inhibition on hypertension may be related to the protection of vessel functions together with increasing NO levels, restoring of SERCA2 and IP3R expressions and antiapoptotic effects. These results provide a new insight into the molecular mechanisms of the beneficial effects of ERS inhibition on hypertension and suggest a potential target for novel therapies.

Science Code : 1018.1

Key Words : Hypertension, endoplasmic reticulum stress, endothelial dysfunction, TUDCA.

Page Number : 91

Advisor : Doç. Dr. M. Orhan ULUDAĞ

Co-Advisor : Prof. Dr. Emine DEMİREL-YILMAZ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve deney çalışmalarım süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanlarım Prof. Dr. Emine Demirel-Yılmaz'a ve Doç. Dr. M. Orhan Uludağ'a,

Doktora eğitimimdeki emekleri için Prof. Dr. Nurettin Abacıoğlu'ya, Prof. Dr. Fatma Akar'a, Prof. Dr. Mustafa Ark'a, Prof. Dr. Nilüfer Turan'a ve Doç. Dr. Bilgen Başgut'a,

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımları ve emeği için Yrd. Doç. Dr. Gökhan Sadi'ye,

Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji A.b. dalı; Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji A.b. dalı ve Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, K.Ö. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde deneylerim sırasında katkıları olan tüm arkadaşlarıma ve yardımcı personele,

Eğitim hayatım boyunca eksilmeyen destekleri için sevgili aileme,

Saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Hipertansiyon	5
2.1.1. Tanım	5
2.1.2. Etiyolojisi ve patogenezi	5
2.1.3. Hipertansiyonda endotel işlev bozukluğu	6
2.1.4. Hipertansiyonda vasküler düz kas işlevi	9
2.2. DOCA-tuz Hipertansiyon Modeli	12
2.2.1. Tanım	12
2.2.2. DOCA-tuz hipertansiyonun patogenezi	13
2.3. Endoplazmik Retikulum Yapısı ve İşlevleri	14
2.4. Endoplazmik Retikulumda Ca^{+2} Homeostazı	19
2.4.1. Ca^{+2} tamponları ve Ca^{+2} sensörleri	19
2.4.2. Ca^{+2} kanalları	21

	Sayfa
2.4.3. Sarko/endoplasmik retikulum kalsiyum ATPaz.....	22
2.5. Endoplasmik Retikulum Stresi	24
2.5.1. Endoplasmik retikulum stres yolağı	24
2.5.2. Endoplasmik retikulum stresine bağı hücre ölümü	28
2.5.3. Hipertansiyonda endoplasmik retikulum stresi.....	30
2.5.4. Endoplasmik retikulum stresi inhibisyonu	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.2. Kullanılan aletler	34
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışları	35
3.4. Deney Hayvanı Grupları	37
3.5. DOCA-tuz Hipertansiyon Modelinin Oluşturulması	38
3.6. Kan Basıncı Ölçümü	38
3.7. İzole Aort Deneyleri	39
3.8. Biyokimyasal Analizler	40
3.8.1.Plazmada NO ölçümü	40
3.8.2.Plazmada TAK ölçümü	40
3.9. Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi	41
3.9.1. Doku homojenizasyonu	41
3.9.2. Protein miktar tayini	41
3.9.3.Western blot analizi	41
3.10.İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
5. TARTIŞMA.....	57

	Sayfa
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	71
EKLER.....	85
EK-1. Etik kurul onayı.....	86
EK-2. Deney hayvanı kullanım sertifikası.....	88
ÖZGEÇMİŞ	89



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Hayvanların vücut ağırlıklarının deney süresince değişimleri.....	44
Şekil 4.2. TUDCA ile ERS inhibisyonunun sistolik kan basıncı üzerindeki etkisi	45
Şekil 4.3. TUDCA ile ERS inhibisyonunun PERK ve pPERK protein ekspresyonları üzerindeki etkisi ve örnek bantlar	46
Şekil 4.4. TUDCA ile ERS inhibisyonunun endotel-bağımlı gevşeme cevapları üzerindeki etkisi	47
Şekil 4.5. TUDCA ile ERS inhibisyonunun endotel-bağımsız gevşeme cevapları üzerindeki etkisi	49
Şekil 4.6. TUDCA ile ERS inhibisyonunun plazma NO ve TAK derişimlerine etkisi	50
Şekil 4.7. TUDCA ile ERS inhibisyonunun KCl kasılma cevaplarına etkisi	51
Şekil 4.8. TUDCA ile ERS inhibisyonunun FE kasılma cevaplarına etkisi	52
Şekil 4.9. TUDCA ile ERS inhibisyonunun IP3R ve SERCA2 protein ekspresyonları üzerindeki etkisi ve örnek bantlar	54
Şekil 4.10. TUDCA ile ERS inhibisyonunun Bax ve Bcl2 protein ekspresyonları üzerindeki etkisi ve örnek bantlar	56
Şekil 5.1. Hipertansiyonun incelenen parametreler üzerindeki etkisi	65
Şekil 5.2. TUDCA ile ERS inhibisyonunun incelenen parametreler üzerindeki etkisi	66

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Hipertansiyonun patofizyolojik mekanizmaları	6
Resim 2.2. Endotel hücrelerinde NO regülasyonunun olası mekanizmaları	8
Resim 2.3. Arteriyel duvar yapısı	10
Resim 2.4. Vasküler düz kasta hücre içi kalsiyum artışı ve kasılma	10
Resim 2.5. Vasküler tonusun düzenlenmesinde NO'nun rolü	11
Resim 2.6. DOCA-tuz hipertansiyonun farklı fazlarında nöral ve hümorale katkıları	13
Resim 2.7. Endoplazmik retikulum yapısı ve genel işlevleri	16
Resim 2.8. Bir proteinin dinamik yaşam döngüsü	18
Resim 2.9. Ca^{+2} homeostazında rol alan sistemlerin şematik gösterimi	20
Resim 2.10. UPR'nin üç esas yolağının şematik gösterimi	25
Resim 2.11. ERS-aracılı hücre ölümü	29
Resim 3.1. Unilateral nefrektomi operasyonu	38
Resim 3.2. Kan basıncı ölçümünden örnek trase	39

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
-----------------	--------------------

A	Amper
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
mmHg	Milimetre civa
nm	Nanometre
V	Volt

Kısaltmalar	Açıklamalar
--------------------	--------------------

ADMA	Asimetrik dimetil arjinin
AngII	Anjiotensin II
ASK1	Apoptoz sinyali düzenleyici kinaz 1
ATF6	Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
Bax	Bcl-2-bağılantılı X protein
Bcl2	B-cell lenfoma 2
BiP	Bağlayıcı immunoglobulin protein
cADPR	Siklik ADP riboz
CaCl₂	Kalsiyum klorür
cGMP	Siklik guanozin monofosfat

Kısaltmalar**Açıklamalar**

CHOP	C/EBP homolog protein
CNX	Kalneksin
CNX	Kalneksin
CuCl₂.2NH₄Cl.2H₂O	Amonyum bakır(II) klorid dihidrat
CRT	Kalretikulin
CSQ	Kalsekuestrin
DOCA	Deoksikortikosteron asetat
EDRF	Endotel-kaynaklı gevşetici faktör
EGTA	Etilen glikol tetraasetik asid
eIF2α	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör-2
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
ER	Endoplazmik retikulum
ERAD	ER-bağımlı protein degradasyonu
ERK	Ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinaz
ERS	Endoplazmik retikulum stresi
ET-1	Endotelin-1
HSP-90	Isı şok (heat-shock) protein 90
IRE1	İnositol bağımlı kinaz 1
IP3	İnositol-1,4,5-trisfosfat
IP3R	İnositol-1,4,5-trisfosfat reseptörü
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
K₂HPO₄	Potasyum hidrojen fosfat
KCl	Potasyum klorür
MAMs	Mitokondri-bağımlı ER membranları
MAP3K	Mitojen-aktivasyonlu protein 3 kinaz
MLC	Miyozin hafif zincir
MLCK	Miyozin hafif zincir kinazı
MgCl₂	Magnezyum klorür
MnSOD	Manganez süperoksit dismutaz
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
NaH₂PO₄	Monosodyum fosfat

Kısaltmalar**Açıklamalar**

NaCl	Sodyum klorür
Na₂HPO₄	Sodyum hidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NED	N-1-naptiletilendiamin dihidroklorid
NCX	Sodyum/kalsiyum değiştirici
NMDA	N-metil-D-aspartat reseptör
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NP40	4-Nonilfenil poli(etilen glikol)
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2–ilişkili faktör 2
OST	Oligosakkariltransferaz
PBA	4-fenil bütirik asit
PDIA6	Protein disülfid izomeraz A6
PERK	PKR-benzeri endoplasmik retikulum kinaz
PKR	Çift-sarmal RNA-aktif edici protein kinaz
PLC	Fosfolipaz C
PMCA	Plazma membran kalsiyum ATPaz
PMSF	Fenilmetilsülfonil florid
PPIaz	Peptidilprolil izomeraz
ROS	Reaktif oksijen türleri
RYR	Ryanodin reseptörü
sGC	Soluble guanilil siklaz
SARAF	SOCE aracılıklı regülatör faktör
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SERCA	Sarko/endoplasmik retikulum kalsiyum ATPaz
SOCE	Store operated kalsiyum girişi
SSA	Sempatik sinir aktivitesi
STIM	Stromal etkileşen molekül
TAK	Total antioksidan kapasite
TEMED	Tetrametiletildiamin
TUDCA	Tauroursodeoksikolik asid

Kısaltmalar**Açıklamalar****TRPC**

Transient reseptör potansiyel kanalı

UDCA

Ursodeoksikolik asit

UGGT1

UDP-glikoz glikoprotein glikoziltransferaz 1

UPR

Katlanmamış protein cevabı

VOC

Voltaj kapılı kalsiyum kanalı

ZnSO₄

Çinko sülfat



1. GİRİŞ

Hipertansiyon sistemik kan basıncının yükselmesi ile karakterize bir kalp damar hastalığıdır. Dünya çapında bir milyardan fazla insanı etkileyen ve en yaygın görülen kronik hastalıklardan biridir. İnme, kalp yetmezliği ve böbrek hastalıkları gibi komplikasyonlar hipertansiyonda morbidite ve mortalitenin esas nedenlerini oluşturur (Coffman, 2011). Hipertansiyon patogenezi çok faktörlü olup henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Endotel işlev bozukluğunun hipertansiyon patogenezinde yer aldığı bilinmektedir. Endotel hücreleri vazokonstriktör ve vazodilatör maddeler salgılayarak kan basıncının kontrolünde önemli rol oynar. Çeşitli hayvan hipertansiyon modellerinde bu hastalığa bağlı gelişen endotel işlev bozukluğu gösterilmiştir (Nakano ve diğerleri, 2003; Galisteo ve diğerleri, 2004a; Vera ve diğerleri, 2007; Gumanova ve diğerleri, 2007). Endotelial işlevlerinin esas göstergesi endotel kaynaklı nitrik oksit (NO)'dur. Reaktif oksijen türlerinin (reactive oxygen species, ROS) artmış üretimi ve/veya bozulmuş inaktivasyonu yani oksidatif stres NO biyoyararlanımında azalmaya neden olur (Förstermann, 2010). Oksidatif stresin hipertansiyon patofizyolojisinde rolü olduğu bilinmektedir (Binda ve diğerleri, 2001; Nicod ve diğerleri, 2000). Total antioksidan kapasite (TAK) ölçümü, oksidan stresin bir göstergesi olarak, kullanılmaktadır. Kan NO ve TAK düzeyleri; hipertansiyondaki endotel işlev bozukluğunu yansıtabilecek, olası biyobelirteçler gibi görünmektedir.

Endoplazmik retikulum (ER) ökaryotlarda protein katlanmasının düzenlendiği en önemli organelidir. ER, protein sentezi için kalite kontrol merkezi olarak tanımlanabilir. Sadece doğru katlanmış proteinler ER'dan çıkabilirler, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler tutulur ve degrade edilir (Shen, Zhang ve Kaufman, 2004). Bir hücrenin stresi algılama, cevap verme ve engelleme yeteneği homeostazın devamı için gereklidir. Stres ister endojen isterse ekzojen olsun, hücrede patojenik enfeksiyon, kimyasal hasar, genetik mutasyon ve hatta normal farklılaşma gibi pek çok farklı yolla oluşabilir. Protein katlanma işlemi bu durumlara özellikle duyarlıdır (Rutkowski ve Kaufman, 2004). ER işlev kapasitesini aşan fizyolojik veya patolojik durumlarda lümende katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi meydana gelir ve bu durum ER stresi (ERS) olarak adlandırılmaktadır (Kaufman, 2004; Düzgün, Alaçam ve Okuyucu, 2012). ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikimi katlanmamış protein cevabı (unfolded protein response; UPR) adı verilen adaptif bir programı uyarır. UPR, ER'de protein sentezini inhibe ederek

stresi azaltmaya çalışır (Rutkowski ve Kaufman, 2004). Memeli hücrelerinde, UPR üç adet ER transmembran reseptörün aracılık ettiği karmaşık bir programdır. Bunlar reseptörler: aktive edici transkripsiyon faktör 6 (activating transcription factor 6; ATF6), inositol bağımlı kinaz (inositol requiring kinase 1; IRE1) ve çift sarmal RNA-aktivasyonlu protein kinaz (PKR)-benzeri endoplazmik retikulum kinaz (double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase; PERK). UPR'nin bu üç yolağın aktivasyonu, luminal şaperon Grp78 (diğer adıyla Bağlayıcı immunoglobulin protein; BiP)'den proksimal sinyalleme molekülünün ayrılmasına bağlıdır (Rutkowski ve Kaufman, 2004). UPR adaptasyon, alarm ve apoptoz olmak üzere üç işlevi gerçekleştirir (Chakrabarti, Chen ve Varner, 2011).

ER'nin çeşitli hücresel işlemlerin düzenlenmesinde önemli rolleri vardır. ER homeostazını bozan patolojik durumlar, ERS'ye dolayısıyla UPR'nin kronik aktivasyonuna neden olur (Ozcan ve Tabas, 2012). ERS kardiyovasküler hastalıklardan, nörodejenerasyon, kanser, diyabet ve kas dejenerasyonuna kadar pek çok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynar. Kronik endotelial ERS ve UPR aktivasyonu ile endoteliumun ateroskleroz oluşumuna yatkınlığı arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur (Civelek, Manduchi, Riley, Stoeckert ve Davies, 2009; Wang ve Kaufman, 2012). Endotel hücrelerinde ERS'in kronik aktivasyonu, artmış oksidatif stres ve inflamasyona sonuç olarak çoğunlukla hücre ölümüne neden olmaktadır (Lenna, Han ve Trojanowska, 2014). Ayrıca, diyabette oluşan endotel işlev bozukluğunda ER stresinin rolü olduğu düşünülmektedir (Basha, Samuel, Triggle ve Ding, 2012).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yeni bir potansiyel tedavi yaklaşımı olarak ERS inhibisyonuna odaklanılmıştır. Bir safra asidi olan tauroursodeoksikolik asid (TUDCA)'nın ER stresini engelleyici etkisi bilinmektedir (Ozcan ve diğerleri, 2006; Chen ve diğerleri, 2008). TUDCA ile ERS inhibisyonunun tip 2 diyabetik farelerde vasküler patolojide koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Amin ve diğerleri, 2012). Anjiotensin II ile oluşturulan hipertansiyonda ERS inhibisyonu kardiyak hasarı azaltırken damar işlevlerinde iyileşme sağlamaktadır (Kassan ve diğerleri, 2012). Spontan hipertansif sıçan modelinde (SHR), ERS inhibisyonunun SHR'de artmış olan sistolik kan basıncını düşürdüğü ayrıca artmış aort kasılmalarını düzelttiği gösterilmiştir (Spitler, Matsumoto ve Webb, 2013). Ayrıca ERS inhibisyonun, fare aortunda tunikamisin ile uyarılan endotel işlev bozukluğunu önlediği (Choy ve diğerleri, 2016); SHR'de mezenterik arterlerde endotel

bağımlı gevşemeleri artırdığı (Carlisle ve diğerleri, 2016) bildirilmiştir. ERS baskılanmasının çeşitli hastalıklar üzerindeki olumlu etkileri ortaya konmuştur fakat DOCA-tuz hipertansiyon modelinde damar işlevleri üzerindeki etkileri bilinmemektedir.

Endotel hücreleri oldukça dinamik ve yüksek miktarda protein sentezlenen hücrelerdir, bu durum ERS'ye ortam hazırlamaktadır. Endotel işlev bozukluğunun hipertansiyon ve diğer pek çok hastalığın patogenezinde yer aldığı bilinmektedir. Fakat hipertansiyonda oluşan endotel işlev değişiklikleri ile ERS arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu tez çalışmasının amacı; hipertansiyon nedeniyle damarlarda gelişen işlev bozukluğunun ERS ile ilişkisi ve ERS inhibisyonu ile nasıl etkilendiğinin; izole torasik aort cevapları ve kan-doku biyobelirteçleri incelenerek belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipertansiyon

2.1.1. Tanım

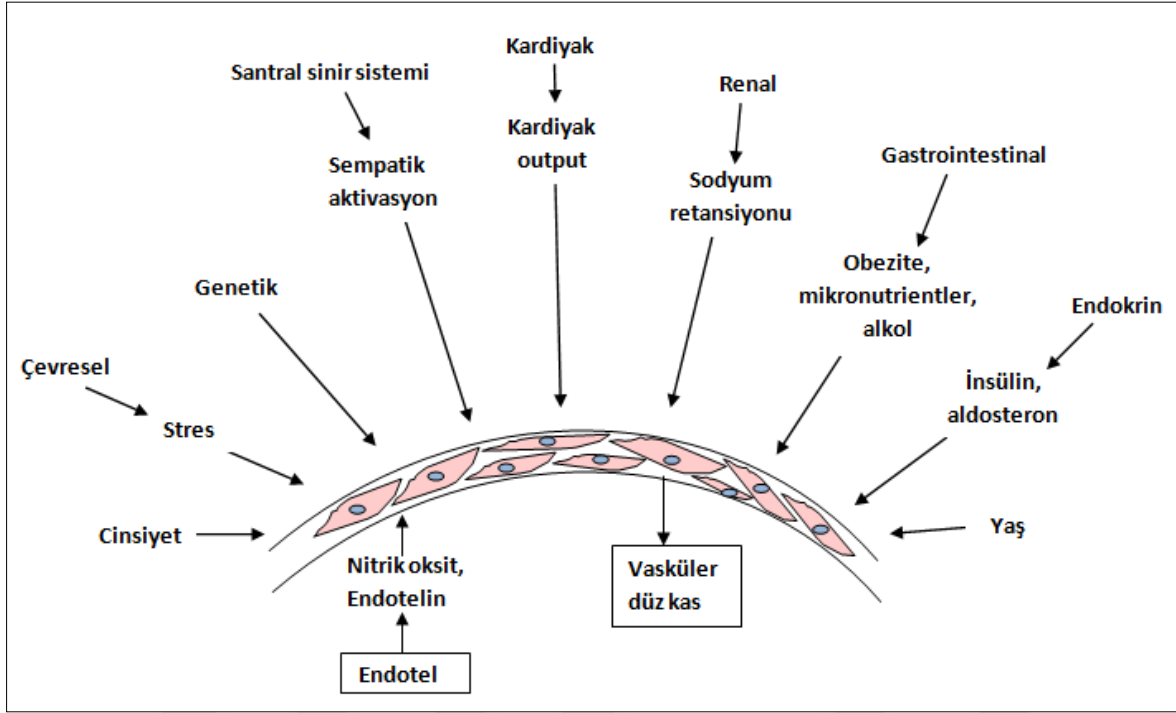
Hipertansiyon, sistemik arteriyel kan basıncının devamlı yükselmesi ile karakterize bir kalp damar hastalığıdır (Kayaalp, 2005: 357).

2.1.2. Etiyolojisi ve patogenezi

Hipertansiyon dünya çapında 1 milyardan fazla insanı etkileyen ve en yaygın görülen kronik hastalıklardan biridir. İnme, kalp yetmezliği ve böbrek hastalıkları gibi komplikasyonlar hipertansiyonda morbidite ve mortalitenin esas nedenlerini oluşturur (Coffman, 2011). Hipertansiyon esansiyel ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır. Esansiyel hipertansiyonda temel neden belli değildir ve olguların %95'ini oluşturur. Sekonder hipertansiyon ise böbrek hastalıkları, renovasküler, kardiyak ve endokrin hastalıklar gibi arteriyel kan basıncını yükselten birincil patolojik bozukluklar nedeniyle oluşur (Kayaalp, 2005: 357). Esansiyel hipertansiyonu olan bireylerin büyük çoğunluğunda artmış kan basıncının etiyolojisi belirlenemez. Ancak, esansiyel hipertansiyonun olası etiyolojisi için genetik yatkınlık, diyetle artmış tuz alımı ve adrenerejik tonus artışı gibi pek çok faktör öne sürülmektedir. Sonuç olarak esansiyel hipertansiyon tedavisinin seçimi deneyime dayalıdır ve yaş, ırk, eşlik eden başka hastalığın olması gibi epidemiyolojik kategorileri temel alır (Coffman, 2011). Bu açıdan, hipertansiyonun moleküler patogenezi aydınlatmaya yönelik çalışmalar önceliğini ve önemini korumaktadır.

Pek çok patofizyolojik faktör hipertansiyon oluşumunda rol oynamaktadır. Bunlar: artmış sempatik sinir sistemi aktivitesi; artmış psikososyal strese maruziyet; sodyum tutucu hormonların ve vazokonstriktör maddelerin aşırı üretimi; diyetle uzun dönem yüksek sodyum alımı; yetersiz potasyum ve kalsiyum alımı; anjiyotensin II artışı ve aldosteron üretimi ile aşırı renin sekresyonu; NO, protasiklin ve natriüretik peptidler gibi vazodilatör maddelerin eksiklikleri; vasküler tonusu ve renal tuz tutulumunu etkileyen kallikrein-kinin sisteminin ekspresyonunda değişim; renal mikrodamarlarda selektif lezyonlar gibi damar direncindeki anormallikler; diyabet; insülin rezistansı; obezite; vasküler büyüme

faktörlerinin aktivitesinde artış; kalp atım hızı, kalbin inotropik özellikleri ve damar direncini etkileyen adrenerjik reseptör değişimleri ve değişmiş hücresel iyon transportudur (Resim 2.1.) (Oparil, Zaman ve Calhoun, 2003).



Resim 2.1. Hipertansiyonun patofizyolojik mekanizmaları

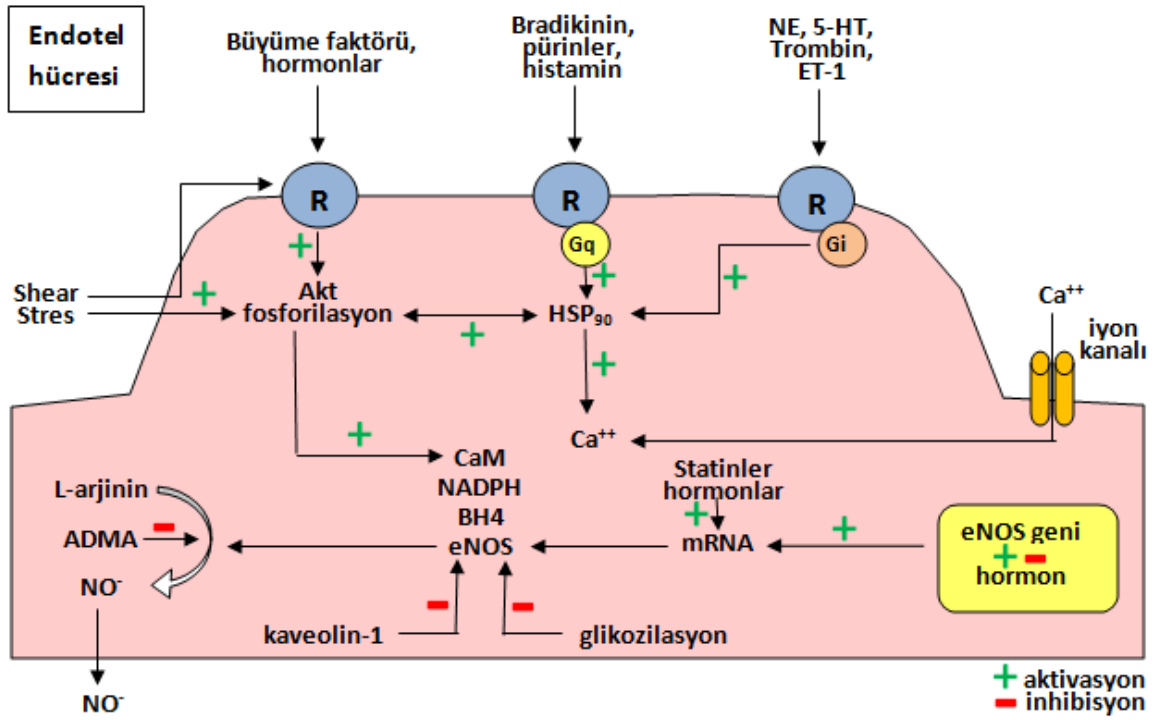
Damar endotel işlev bozukluğu, oksidatif stres artışı, vasküler remodeling ve damarların uyum sağlama yeteneğinin azalması hipertansiyon oluşumunu hızlandırabilmekte ve patogenezinde önemli rol oynamaktadır.

2.1.3. Hipertansiyonda endotel işlev bozukluğu

Endotel kan damarlarının en iç yüzeyini kaplayan, tek katlı ince bir hücre tabakasıdır (Giannotti ve Landmesser, 2007). Furchgott ve Zawadzki'nin 1980 yılında yaptıkları bir gözlem ile izole arterlerden endotel tabakası uzaklaştırıldığında, asetilkoline karşı gelişen gevşeme cevaplarının engellendiği ortaya konmuştur. Bu tarihi deney, vasküler tonusun lokal kontrolü ile ilgili düşünceleri kökten değiştirmiştir. Çeşitli çalışmalarda, endotel hücrelerinin endotel-kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) denilen güçlü vazodilatör maddeler aracılığıyla arterlerde gevşemeye neden olduğu gösterilmiştir (Furchgott ve Vanhoutte, 1989). Soluble guanilil siklazı (sGC) stimüle ederek, damar düz kasında siklik guanozin

monofosfat üretimini artıran; süperoksit anyonlarıyla yok edilen bu EDRF, yaklaşık otuz yıl önce NO olarak tanımlanmıştır (Furchgott ve Vanhoutte, 1989).

Damar endotel tabakası yapısal olarak basit fakat işlevsel olarak oldukça karmaşık bir sistemden oluşmaktadır. Bu tabaka hemostaz, fibrinolizis, inflamasyon, lipoprotein metabolizması, kan basıncı ve anjiyogenez gibi pek çok olayı düzenler. Bu nedenle damar tonusunun ve yapısının düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Endotel tabakası vazodilatör (NO, prostasiklin, prostaglandin E2 gibi) ve vazokonstriktif (anjiyotensin II, tromboksan A2 ve endotelin-1 gibi) özelliğe sahip bazı vazoaaktif maddeleri salgılayarak vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynar (Vane, Anggard ve Botting, 1990). Endotel kaynaklı NO ise endotelial işlevleri için en önemli belirteçtir. NO, prekürsörü olan L-arjinin'den nitrik oksit sentaz (NOS) enzim aktivitesiyle sentezlenir. Bu enzimin primer yapıları yüksek oranda homojen olan üç izoformu tanımlanmıştır. İndüklenebilir NOS (iNOS) sitokinler gibi proinflamatuvar stimülüs ile fagositik hücrelerde eksprese edilir. Diğer iki izoform nöronal NOS (nNOS) nöronal dokularda, endotelial NOS (eNOS) endotel hücrelerinde temel olarak eksprese edilir (Govers ve Rabelink, 2001). eNOS damar işlevini düzenleyen ana izoformdur. eNOS transkripsiyonu genomik olarak hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından kontrol edilir. Enzimin katalitik aktivitesi, akış stresi (shear stres) ve çeşitli nörohumoral faktörler gibi fiziksel ve kimyasal uyarı tarafından başlatılır veya artırılır. Aktivitesi için kalsiyum, kalmodulin, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ve 5, 6, 7, 8-tetrahidrobiopterin gereklidir. Isı şok (heat-shock) protein 90 (HSP-90)'nın bu protein kompleksi ile birleşmesi enzim aktivitesini artırır. Endotel yüzeyindeki spesifik reseptörlerin uyarılması, eNOS aktivitesini ayarlayan hücre içi yolları post-translasyonel olarak HSP-90 veya Akt-aracılıklı fosforilasyon yollarıyla aktive eder. eNOS'un kaveolin-1 ile birleşmesi, Thr495'ten fosforilasyonu veya enzimin glikozilasyonu aktiviteyi azaltır. L-arjinin metaboliti asimetrik dimetil arjinin (ADMA), eNOS'a yarışmalı bağlanma yoluyla NO üretimini düşürür. NO düzenlenmesindeki bazı yollar ise tam olarak aydınlatılamamıştır (Resim 2.2.) (Vanhoutte, Shimokawa, Feletou ve Tang, 2015). eNOS aktivasyonu ve böylece NO üretimi asetilkolin, bradikinin, histamin, 17 β -estradiol gibi çeşitli uyarıcılarla Ca^{+2} -bağımlı ve Ca^{+2} -bağımsız olarak başlatılabilir veya üretimi artırılabilir. Asetilkolin, bradikinin, histamin gibi agonistler endotel hücre zarındaki spesifik reseptörleriyle etkileşerek kalmoduline bağlanan hücre içi Ca^{+2} derişimini artırır ve eNOS'un kalmodulin-bağlanma alanının aktivasyonuna neden olurlar (Zhao, Vanhoutte ve Leung, 2015).



Resim 2.2. Endotel hücrelerinde NO regülasyonunun olası mekanizmaları. R: reseptör, NE: noradrenalin, 5-HT: serotonin, ET-1: endotelin 1, HSP₉₀: ısı şok protein 90, ADMA: asimetrik dimetilarginin, NO: nitrik oksit, CaM: kalmodulin, NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat, BH₄: tetrahidrobiyopterin, eNOS: endotelial nitrik oksit sentaz

Hipertansiyon endotel ilişkisinde üzerinde en çok yoğunlaşılan NO, vasküler tonusu ve kan basıncını düzenler, uyarılmış düz kasın gevşemesini sağlar, trombositlerin endotele adezyonu ve agregasyonunu inhibe eder ve düz kasın proliferasyonunu baskılar (Hu ve Manning, 1995; Cohen ve diğerleri, 1997). Endotel işlev bozukluğu durumunda vazoaktif maddeler arasındaki denge bozulur ve sonuç olarak vasküler yapı ve işlevde değişiklikler meydana gelir (Cohn, 2001). Çeşitli hayvan hipertansiyon modellerinde bu hastalığa bağlı olarak endotel işlevlerinin bozulduğu gösterilmiştir (Nakano ve diğerleri, 2003; Galisteo ve diğerleri, 2004a; Vera ve diğerleri, 2007; Gumanova ve diğerleri, 2007; Chapleau ve diğerleri, 2016).

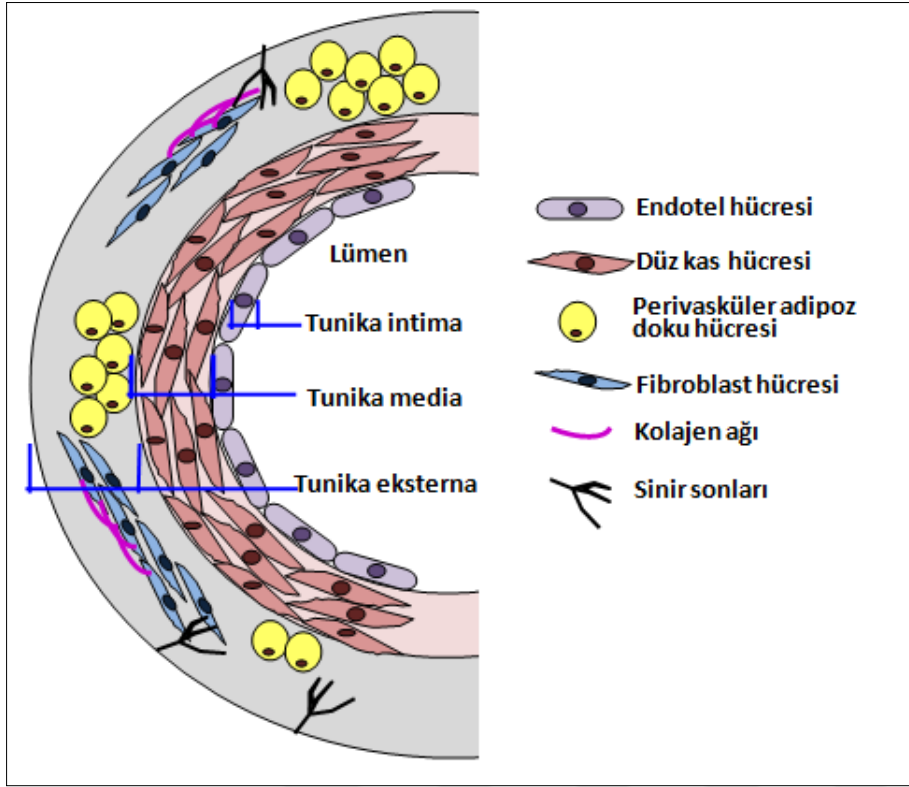
Hipertansiyon patofizyolojisinde rolü olduğu bilinen etkenlerden biri oksidatif stresin artışıdır (Nicod ve diğerleri, 2000; Binda ve diğerleri, 2001; Shirakura ve diğerleri, 2016). Oksidatif stres ilk olarak Seis tarafından 1985 yılında “Oksidan bileşiklerin fazlaca oluşumu ve serbest radikallerin artmış birikimi sonucu yetersiz kalan antioksidan mekanizmalar arasındaki dengesizlikten kaynaklanan doku hasarı” olarak tanımlanmıştır.

ROS'un artmış üretimi ve/veya bozulmuş inaktivasyonu yani oksidatif stres NO biyoyararlanımında azalmaya neden olur (Förstermann, 2010). NO biyoyararlanımındaki düşüşe bağlı olarak endotele bağımlı damar gevşemelerinde oluşan azalma, endotel işlev bozukluğunun en önemli belirtisi olarak kabul edilmektedir (Cai ve Harrison, 2000).

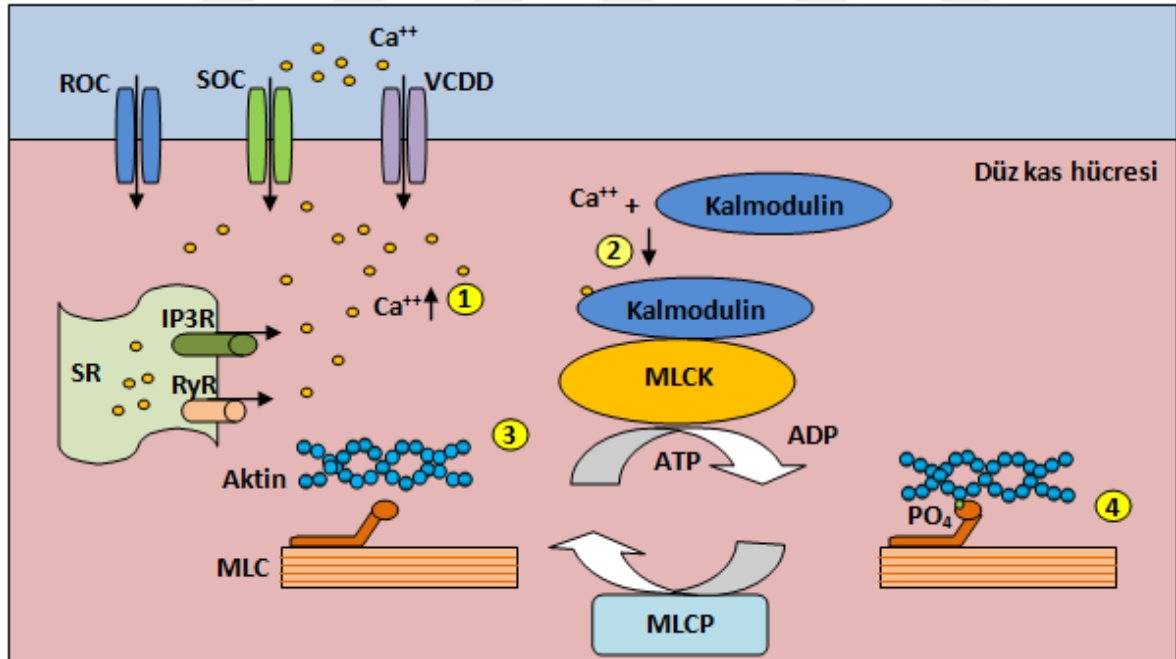
Endotel işlev bozukluğu ve daha spesifik olarak NO sentezi ve aktivitesindeki değişim, en yaygın kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde temel adımı oluşturur. NO'nun antiaterojenik, antitrombotik ve antiproliferatif ana işlevleri nedeniyle, biyoyararlanımının bozulması endotelial fizyolojide önemli değişimlere yol açar (Lee, Bae, Ma ve Kim, 2016; Bermúdez ve diğerleri, 2008). NO sentezi ve biyoyararlanımının azalması ile ilgili çoklu süreçler henüz tam olarak aydınlanmamıştır. Oldukça önemli ve fazlaca bilgi birikimi olmasına rağmen, endotel işlev bozukluğu konusunda daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.1.4. Hipertansiyonda vasküler düz kas işlevi

Kan damarları üç tabakadan oluşmaktadır: intimal tek katlı endotel hücreleri, mediyal vasküler düz kas (tunica media) ve adventisya (tunica eksterna) (Resim 2.3.) (Zhao, Vanhoutte ve Leung, 2015). Vasküler düz kas tabakası kan damarlarının kasılmasına ve gevşemesine aracılık eder. Vasküler düz kas hücrelerinin kasılması, mekanik (intraluminal basınç, germe) veya farmakolojik aktivasyon (ligandların hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanması gibi) ile başlatılabilir. Bu uyarılar ya hücre içi depolardan (sarko/endoplazmik retikulum) salıverilme ya da hücre zarındaki Ca^{+2} kanallarının açılması yoluyla hücre içi Ca^{+2} derişimini artırır. Hücre içi serbest kalsiyum iyonları kalmoduline bağlanır ve kalsiyum-kalmodulin kompleksi miyozin hafif zincir kinazı (MLCK) aktive eder (Hilgers ve Webb, 2005). MLCK, miyozin hafif zinciri (MLC) fosforile eder. Miyozin başları ve aktin filamentleri arasında çapraz köprü oluşur ve düz kas kasılması gerçekleşir (Resim 2.4.) (Zhao, Vanhoutte ve Leung, 2015).

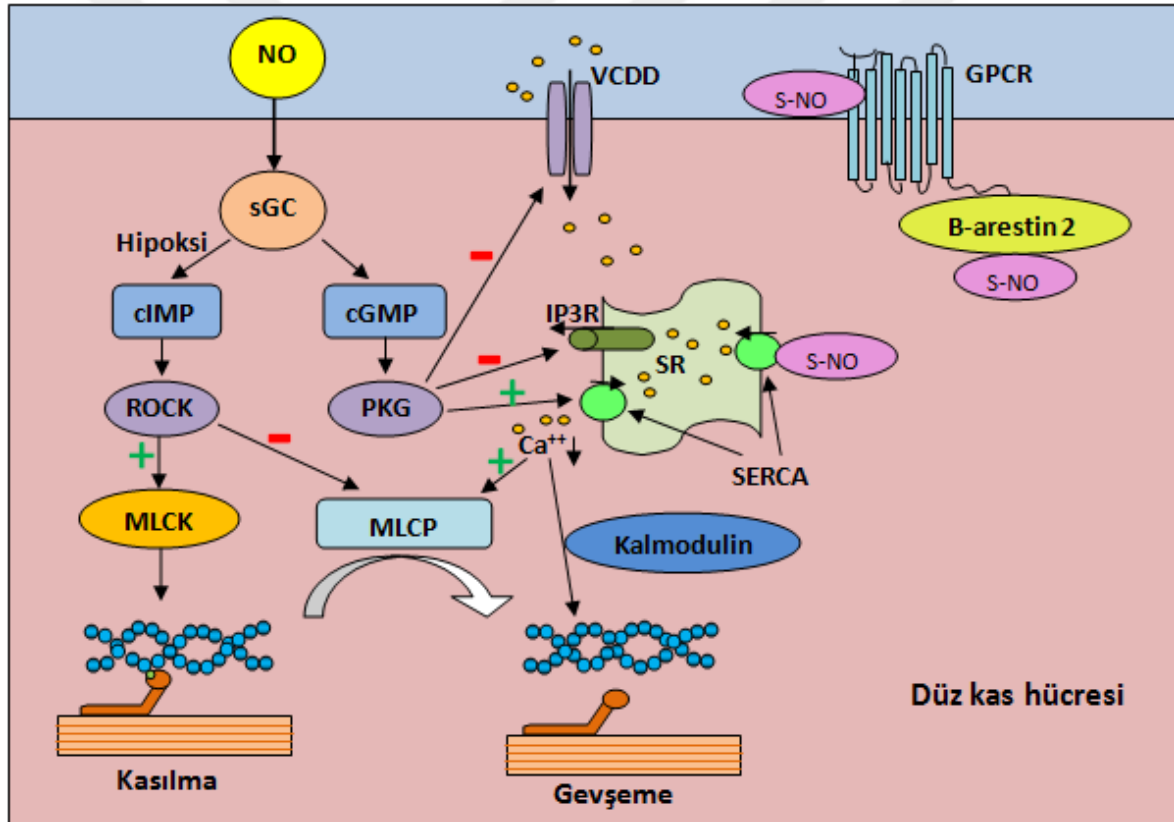


Resim 2.3. Arteriyel duvar yapısı



Resim 2.4. Vasküler düz kasta hücre içi kalsiyum artışı ve kasılma. ROC: reseptör-aracılı kanal, SOC: depo-aracılı kanal, VCDD: voltaj bağımlı kalsiyum kanalı, SR: sarkoplazmik retikulum, IP3R: inositol trifosfat reseptörü, RyR: ryanodin reseptörü, MLC: miyozin hafif zincir, MLCK: miyozin hafif zincir kinaz, MLCP: miyozin hafif zincir fosfataz, ATP: adenozin trifosfat, ADP: adenozin difosfat, PO₄: fosfat

Endotel kaynaklı NO oldukça güçlü bir vazodilatördür. sGC'yi stimüle ederek siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunu uyarır. cGMP protein kinaz G'yi aktive eder. Protein kinaz G, sitozolik kalsiyumun sarkoplazmik retikulum içine alımını, kalsiyumun hücre dışına çıkışını ve kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarının açılmasını sağlar. İntraselüler kalsiyum derişimi azalır ve MLCK artık miyozini fosforilleyemez. MLC fosfataz enzimi aktive olur ve MLC'den fosfatı ayırır. Sonuç olarak vasküler düz kas gevşemesi gerçekleşir (Carvajal, Germain, Huidobro-Toro ve Weiner, 2000). Hipertansiyon durumunda bu mekanizmalarda önemli değişimler gözlenmiştir. Hipertansiyon NOS/NO/cGMP kaskadının bozulmuş aktivitesiyle ilişkilendirilmiştir (Lee, Bae, Ma ve Kim, 2016) (Resim 2.5.).



Resim 2.5. Vasküler tonusun düzenlenmesinde NO'nun rolü. NO: nitrik oksit, sGC: siklik guanilat siklaz, cIMP: inozin siklik 3',5'-monofosfat, cGMP: siklik guanozin monofosfat, ROCK: Rho-ilişkili protein kinaz, PKG: protein kinaz G, MLCK: miyozin hafif zincir kinaz, MLCP: miyozin hafif zincir fosfataz, VCDD: voltaj bağımlı kalsiyum kanalı, SR: sarkoplazmik retikulum, IP3R: inositol trifosfat reseptörü, SERCA: sarko/endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz, S-NO: NO ile S-nitrozillenme, GPCR: G proteini bağı reseptör

Ayrıca NO, hücresel aktiviteyi sGC aktivasyonundan bağımsız olarak da etkileyebilir (Stamler ve diğerleri, 1992). NO, sarko/endoplasmik retikulum kalsiyum ATPaz (SERCA)'ı stimüle ederek hücre içi kalsiyum derişimini düşürerek düz kas gevşemesine neden olur. NO kaynaklı peroksinitrit de SERCA aktivitesini artırabilmektedir (Resim 2.5.) (Adachi ve diğerleri, 2004).

Yüksek kan basıncı kısmen, periferel damar direnci artışı ile belirlenmektedir. Artan periferik damar direncinin ana nedeni vasküler reaktivitedeki değışimlerdir. Vazomotor fonksiyon bozukluğu ve kan damarlarının yapısal yeniden yapılanması, bozulmuş vasküler işlevde rol oynayan ana etkenlerdir (Lee ve Griendling, 2008). Kalsiyum sinyalleme mekanizmaları vasküler düz kasın ana işlevlerini (kasılma, gevşeme ve büyüme) kontrol etmekte ve spesifik cevapları tetiklemektedir. Sitolitik kalsiyum seviyeleri sarkoplazmik retikulum, kalsiyum bağlayan proteinler ve plazma membranındaki kalsiyum geçirgen kanallar tarafından ayarlanır. Hipertansiyonda bu mekanizmalar önemli derecede değışmektedir. Kalsiyum düzenlenmesi, duyarlılığı ve sinyalindeki bozukluk, hipertansiyona bağlı gelişen vasküler işlev bozukluğunda önemli rol oynamaktadır. Arteriyel düz kasta bozulmuş kalsiyum yönetimi, değışen kalsiyum girişı, kalsiyum depolanmasında artış ve/veya kalsiyum çıkışında azalma ile ilişkili olabilmektedir (Gouloupoulou ve Webb, 2014).

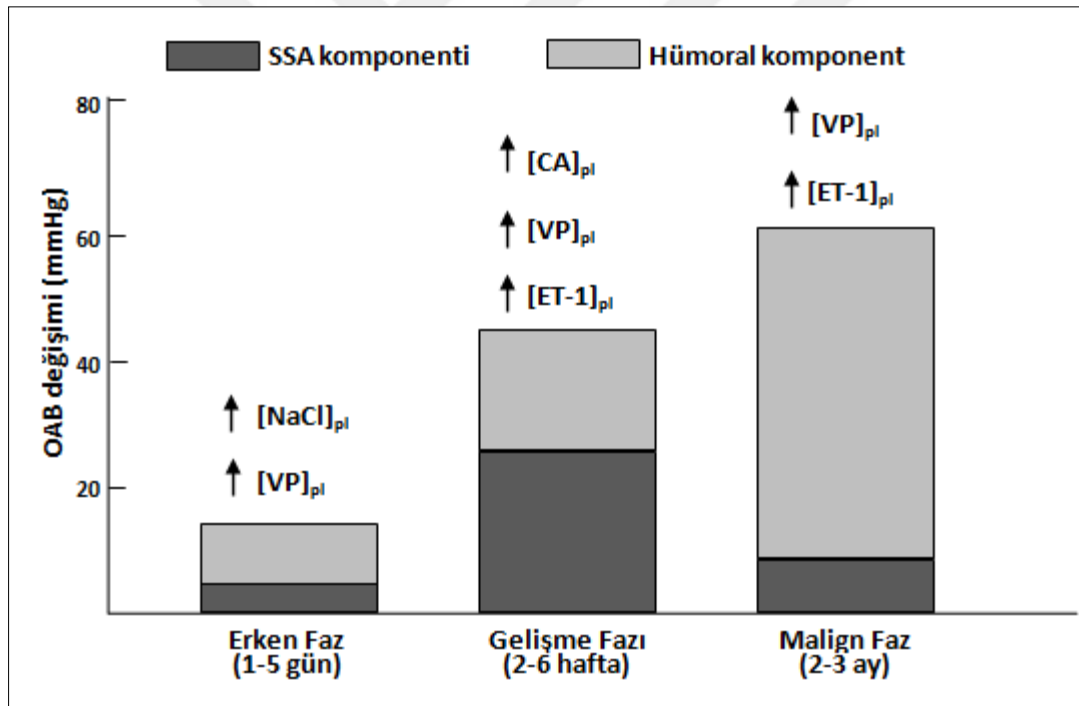
2.2. DOCA-tuz Hipertansiyon Modeli

2.2.1. Tanım

Kronik deoksikortikosteron asetat (DOCA) uygulaması, böbrek kitlesinin azaltılması ve yüksek tuz içerkli diyet ile karakterize deneysel bir hipertansiyon modelidir. Bu modelde tek taraflı nefrektomi uygulaması sonrası, iyileşme sürecinin ardından belli aralıklarla DOCA enjeksiyonu yapılması, bununla birlikte içme suyu olarak NaCl içeren su veya NaCl ve KCl içeren su verilmesi ile kan basıncı artışı gerçekleşir (Badyal, Dadhich ve Lata, 2003). İlk kez Selye ve Bois (1957) tarafından DOCA'nın sıçanlarda hipertansiyona neden olduğunu gösterilmiştir. Günümüzde DOCA-tuz hipertansiyon modeli, hipertansiyon patofizyolojisini oldukça çeşitli yönlerden araştırmaya elverişli ve sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

2.2.2. DOCA-tuz hipertansiyonun patogenezi

DOCA-tuz hipertansiyonun patogenezi aydınlatmaya yönelik pek çok çalışma yürütülmüştür. Bu uygulamanın kan basıncını nasıl artırdığı tamamen açıklanamamış fakat birçok özelliği açığa çıkarılmıştır. DOCA uygulamasının hormonal ve nöronal presör mekanizmaları değiştirdiği görülmektedir. İlgili prehipertansif değişimler arasında; nöral anjiotensin II (Ang II) ve vazopresin aktivitesinde değişim, sempatik etkide artış ve barorefleks cevapta bozulma sayılabilir. Ayrıca vasküler yapıdaki karakteristik değişimler de uyarılmaktadır (Schenk ve McNeill, 1992). DOCA-tuz modeli; hipertansiyon, hipertrofi, fibrozis, elektriksel iletim bozuklukları ve vasküler hipertrofi ve işlev bozukluğu gibi insanlardaki kronik kardiyovasküler yeniden yapılanmada (remodeling) görülen pek çok değişimi taklit eder (Iyer, Chan ve Brown, 2010).



Resim 2.6. DOCA-tuz hipertansiyonun farklı fazlarında nöral ve hümorale katkılar. OAB: ortalama arteriyel basınç, SSA: sempatik sistem aktivitesi, VP: vazopresin, CA: katekolamin, ET-1: endotelin-1

DOCA-tuz hipertansiyon gelişimi çeşitli basamaklardan oluşur. DOCA uygulamasını erken fazında (günler) potasyum yerine sodyum tutulur, ikinci faz (haftalar) sodyum dengesi ve kronik potasyum eksikliği ile karakterizedir. Başlangıçtaki sıvı ve sodyum alımındaki artışa genellikle, sodyum ve su atılımında artış eşlik eder (Abrams ve Osborn,

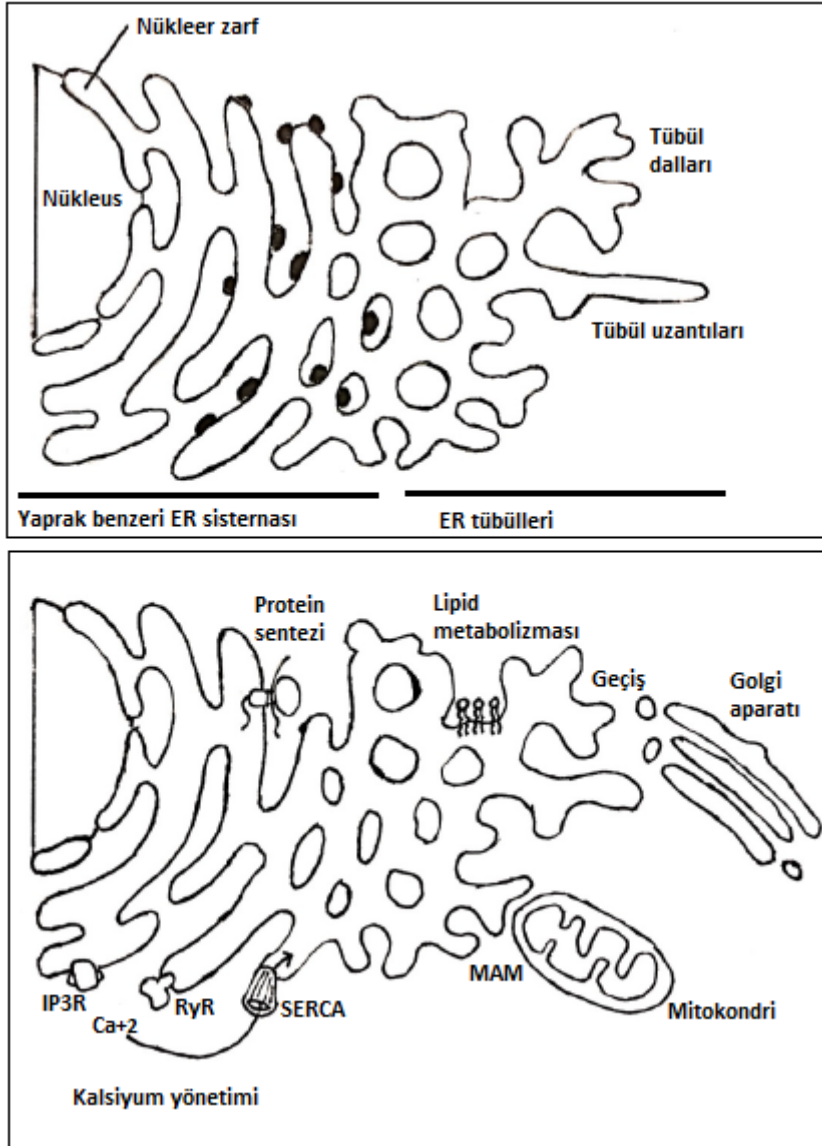
2008). İlk 48 saat sırasında, arteriyel kan basıncındaki ani artıştan sonra, birkaç haftalık daha yavaş bir artış vardır ve bu sürekli hipertansiyona yol açar (Jacob, Clark, Guzman ve Osborn, 2005; Brooks, Freeman ve Qi, 2006). Daha sonraki faz (malign faz) ise ciddi hipertansiyonun gözlendiği 8-12 hafta sonrasıdır. Resim 2.6.'da bu hipertansiyon modelinin farklı fazlarında, sempatik ve hümorale faktörlerin rolleri yaklaşık olarak gösterilmiştir (Yemane, Busauskas, Burris ve Knuepfer, 2010). Erken fazda, plazma sodyumundaki artışa hem sempatik sinir aktivitesi (SSA) artışı hem de vazopresin salıverilmesindeki artış eşlik eder. Sonrasındaki hipertansiyonun gelişmiş olduğu fazda, vazopresin katılımı devam eder, yükselmiş plazma katekolamin seviyesini yansıtan damar yataklarında artmış SSA rolü hümorale komponente eşit derecededir. Malign faz sırasında, vasküler yeniden yapılandırma ve hipertrofi de rol oynamaktadır. Üç faz boyunca, endotelin-1 (ET-1) seviyeleri sürekli artmıştır ve malign fazdaki katılımı daha fazladır. Bu durum, vazopresinin doğrudan etkilerinin ET-1 salımına neden olmasına buna ek olarak büyük çaplı endotel hasarının da ET-1 salımına neden olmasına bağlı olabilir. Geç fazlarda, vazopresin artışı devam eder fakat doğrudan vazokonstriktör etkilerinden ziyade antidiüretik etkisine bağlı olarak hipertansiyonu destekler (Yemane, Busauskas, Burris ve Knuepfer, 2010).

Ek olarak, DOCA-tuz hipertansiyon modeli ile ilgili çalışmalarda bazı faktörler nedeniyle uyumsuzluk olabilmektedir. İlk olarak, hipertansiyonun fazı önemlidir çünkü farklı zamanlarda farklı etkenler belirleyicidir. İkinci olarak, hiperosmolariteye bağlı merkezi sempatik uyarı ve vazopresin etkisinin ET-1 salımına neden olması gibi bağlantılı cevaplar, spesifik yanıtlara yol açan multifaktöriyel sebepler arasında sayılabilir. Son olarak, doğrudan sempatik sinir kayıtlarında farklı sonuçlar elde edilebilir çünkü spesifik sinir çalışmaları tüm sempatik tonusu yansıtmayabilir ve sirkadiyan ritmin sadece belli bir süresinde alınan kayıtlardır. Bu durum, hipertansiyonun farklı fazlarında belli aralıklarla yapılacak çalışmalarla çözülebilir (Yemane, Busauskas, Burris ve Knuepfer, 2010).

2.3. Endoplazmik Retikulum Yapısı ve İşlevleri

ER, hücredeki en büyük organeldir ve protein sentezi ve transportu, protein katlanması, lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolanmasının yapıldığı esas alandır. Organelin karmaşık fiziksel yapısı aynı oranda karmaşık fonksiyonlarına da yansır. ER, nükleer zarf ve periferale ER'den oluşan devamlı membran sisteminden

meydana gelmektedir. ER alanının şekli ve dağılımı, çeşitli integral membran proteinleri, diğer organellerle ve hücre iskeleti etkileşimi ile düzenlenir. Bu etkileşimler dinamiktir ve hücre içi değişimleri yansıtır. Nükleer zarf, iç nükleer membran ve dış nükleer membran olmak üzere iki lipit tabakasından oluşur ve bunlar periferik ER ile ortak bir lümeni paylaşırlar. Nükleer zarfın membranlarından geçen yüzlerce nükleer açıklık (por) RNA'lar ve proteinler gibi moleküllerin taşınmasına izin verir. Nükleer zarf, yapraklar veya sisterna ile bağlıdır ve bu periferik ER'nin bir kısmını oluşturur. Yapraklar, membran köşelerine yerleşmiş kıvrımlı alanlar ile aralarında lümen olan iki lipit çift tabakalarından oluşan yassı yapılardır. Yapraklar genellikle yığılı yapılar halinde görünür ve membranların kıvrık alanları ile helikal köşelere bağlanırlar. Bu yapraklar, sentez, katlama ve salgılanmış veya membran-bağı proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarının yapıldığı ana alanlardır. Çok az sayıda ribozom, ER tübüllerinin membran yüzeyinde yer alır (Schwarz ve Blower, 2016). Lipit sentezi ve kalsiyum sinyalleme gibi işlemlerde rol alan hücrelerde, ER ağırlıklı olarak tübüllerden oluşur. Periferik ER'nin ek bir yapılanması olan kortikal ER, plazma membranıyla bitişiktir, yapraklar ve tübüller ile membranlar arasında orta bir fenotip sergiler. Kalsiyum sinyalleme, plazma membranı ve kortikal ER arasındaki kontakt alanlarında meydana gelir ve kas kasılması için gereklidir. (Block, Imagawa, Campbell ve Franzini-Armstrong, 1988; Takeshima, Komazaki, Nishi, Iino ve Kangawa, 2000). Bu nedenle, ER alt alanlarının morfolojisi ve hücre içi yerleşimi, bu yapıların işlevlerine ve böylece bulundukları özelleşmiş hücredeki rollerine katkıda bulunur (Resim 2.7.) (Bravo ve diğerleri, 2013; Schwarz ve Blower, 2016).



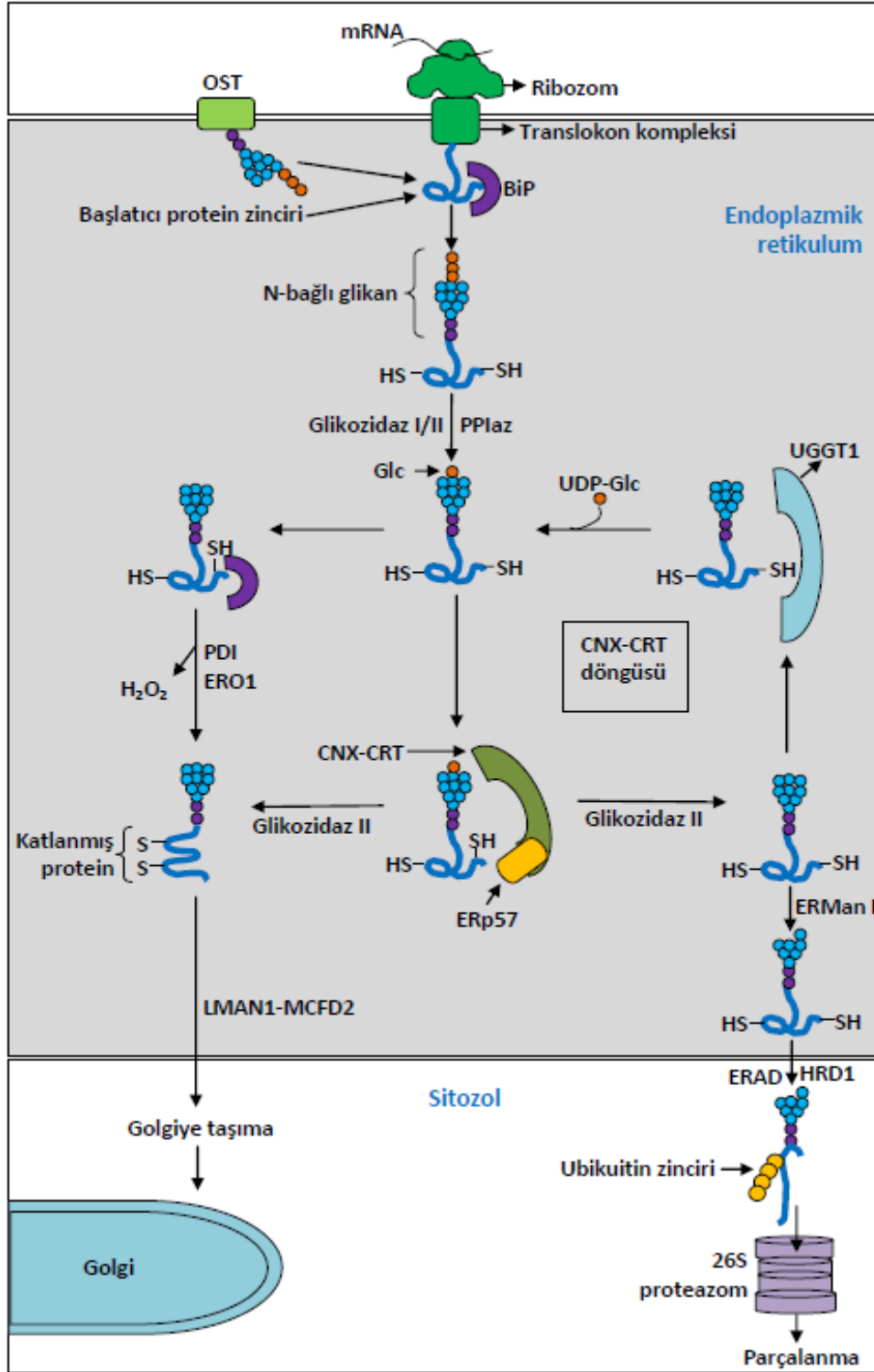
Resim 2.7. Endoplazmik retikulum yapısı ve genel işlevleri. ER: endoplazmik retikulum, IP3R: inositol trifosfat reseptörü, RyR: ryanodin reseptörü, SERCA: sarko/endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz, MAM: mitokondri ilişkili ER membranı

ER'nin ana işlevlerinden biri, sitozolik protein grubunun yanı sıra integral membran proteinleri için de protein sentez alanı olarak işlev görmektir. Protein sentezi için, ribozomların ER'nin sitozolik yüzüne yerleşmesi ve mRNA:ribozom kompleksinin ER membranı üzerinde ko-translasyonel kenetlenmesi gereklidir.

Bir proteinin dinamik hayat döngüsü ribozomda başlar. mRNA, protein sentezini başlatmak için ribozomların üzerine yüklenir. Daha sonra bu mRNA'ları taşıyan ribozomlar, sinyal tanıma partikülleri tarafından tanımlanıp bağlanan başlangıç

polipeptidinin amino terminalindeki sinyal sekansı aracılığıyla ER membranına toplanır (Walter ve Blobel, 1981; Walter, Ibrahimi ve Blobel, 1981). Başlangıç peptidleri, katlanmamış durumda translokon kompleksi ile ER'ye girer. Oligosakkariltransferaz (OST), bir translokon bileşeni, polipeptidlerin transportundan sorumludur. ER'de protein katlanması, protein katlanma oranını artıran peptidilprolil izomerazlar (PPIaz'lar)'ın yanında PDI, ERp57 ve ERO1 gibi pek çok şaperon tarafından kolaylaştırılır. BiP, GRP94 ve GRP170 gibi peptid-bağlayan proteinler, agregasyonu önlerler ve aslında protein katlanma oranını düşürürler. UDP-glikoz glikoprotein glikoziltransferaz 1 (UGGT1) ile tekrar glikozilasyon ile birlikte, N-bağlanmış çekirdek oligosakkaritin katılması ve ayrılması; katlanma kalitesi ve doğrudan transport ve proteinlerin degradasyonunu kontrol eden şaperonlar kalneksin (CNX) ve kalretikulin (CRT) ile proteinlerin etkileşimini kolaylaştırır.

Doğru bir şekilde katlanan proteinler LMAN1–MCFD2 gibi taşıma trafiği kompleksleri içine Golgi aparatına taşınırlar. Golgi'de farklı hücresel kompartımanlara bölünürler; ER'ye tekrar dönerler veya ekstraselüler alana sekrete edilirler. Katlanmamış, yanlış katlanmış ya da kümelenmiş proteinler, ubiquitinasyon ve ER-bağlantılı protein degradasyonu (ERAD) yoluyla 26S proteazom tarafından degradasyon için, sitozole tekrar transloke olurlar (Wang ve Kaufman, 2016) (Resim 2.8.).



Resim 2.8. Bir proteinin dinamik yaşam döngüsü. OST: oligosakkariltransferaz, BiP: bağlayıcı immünoglobülin protein, PPIaz: piroil izomeraz, Glc: glikoz, UDP-Glc: üridin difosfat glikoz, UGGT1: glikoprotein glikoziltransferaz 1, PDI: protein disülfid izomeraz, ERO1: endoplazmik retikulum (ER) oksidoredüktin 1, CNX: kalneksin, CRT: kalretikulin, ERMan I: ER mannosidaz I, LMAN1-MCFD2: kargo trafiği kompleksi, HRD1: ERAD aracılıklı E3 ubikuitin-protein ligaz HRD1, ERAD: ER aracılı protein parçalanması

2.4. Endoplazmik Retikulumda Ca^{+2} Homeostazı

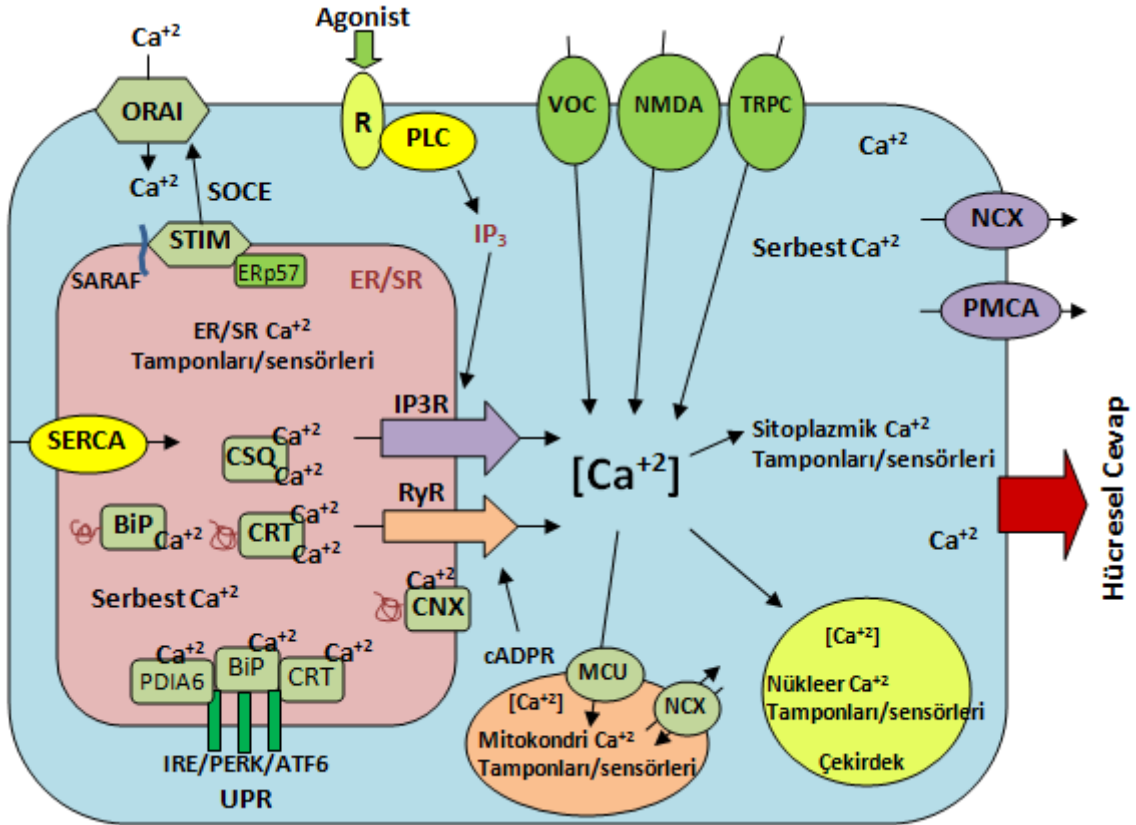
ER, çeşitli biyomolekülleri sentezi ve transportu için esas alan olması yanında hücre içi Ca^{+2} 'un ana depo yeri olarak işlev gösterir. Normal sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu ~ 100 nM iken, ER lümeni içerisinde $100\text{-}800\ \mu\text{M}$ ve ekstraselüler Ca^{+2} konsantrasyonu ~ 2 mM'dır (Clapham, 2007; Samtleben ve diğerleri, 2013).

Hücre için büyük öneme sahip olan Ca^{+2} homeostazı, ikincil haberci olarak Ca^{+2} 'un önemini yansıtır. Metabolizma, protein fosforilasyonu ve defosforilasyonu, hücre proliferasyonu, bölünme ve farklılaşma, gen transkripsiyon, hücre motilitesi, kas uyarılması-kasılması ve stimülüs-sekresyon bağlantısı, programlı hücre ölümü ve nörotransmisyon gibi çeşitli hücresel işlemleri düzenler (Berridge, Bootman ve Roderick, 2003). Ca^{+2} homeostazını korumak için, hücre ve organellerin içine ve dışına Ca^{+2} akışının kesin bir denge içerisinde düzenlenmesi gerekir. Uzun süreli yüksek hücresel Ca^{+2} konsantrasyonu hücre ölümüne neden olabilir, bu nedenle Ca^{+2} transport ve tamponlama sistem ağı hücre içinde kontrolü sağlayacak şekilde gelişmişlerdir. Ca^{+2} homeostazının korunması, birçok hormon kontrollü feedback döngüsü ile Ca^{+2} -taşıyıcıları, Ca^{+2} -kanalları, Ca^{+2} -değiştirici, Ca^{+2} -bağlayan/tamponlayan proteinler ve Ca^{+2} -pompalarından oluşan detaylı bir sistemden oluşan kompleks bir işlemdir (Resim 2.9.) (Krebs, Agellon ve Michalak, 2015).

2.4.1. Ca^{+2} tamponları ve Ca^{+2} sensörleri

Ca^{+2} sinyallemesi ya hücre dışından Ca^{+2} 'un alınması ya da hücre içi depolardan Ca^{+2} salımı ve sonuçta serbest Ca^{+2} konsantrasyonunun değişmesi yoluyla oluşabilir. Hücre içi depoların lümeninde, oldukça fazla miktarda Ca^{+2} , kalsekuestrin veya kalretikulin gibi Ca^{+2} bağlayıcı proteinler tarafından tamponlanır. Bu proteinler, sitozolik Ca^{+2} bağlayıcı proteinler parvalbümin, kalbindin veya S100 proteinleri olarak adlandırılan gruptan farklıdır (Marenholz, Heizmann ve Fritz, 2004). Bu iki grup protein arasındaki esas fark, Ca^{+2} bağlama özellikleri tarafından belirlenir. Organellerdeki Ca^{+2} tamponları, düşük afiniteli fakat yüksek kapasitede Ca^{+2} bağlayıcı proteinler olarak nitelendirilir; sitozolik Ca^{+2} tamponları ise yüksek afiniteli fakat düşük kapasitede Ca^{+2} bağlayıcı özellik gösterirler. Sitozolik grup ayrıca, "EF-hand" alanı içeren proteinlerle karakterizedir. Bu alan sadece sitozolik Ca^{+2} tamponlarına özel değildir, ayrıca kalmodulin, troponin C veya

nöronal Ca^{+2} sensör ailesi gibi Ca^{+2} sensörlerinde bulunur. Bu sensörler, Ca^{+2} bağlanması ile konformasyonel değişim geçirerek hedeflerine bağlanabilir duruma gelirler. Ca^{+2} tamponları ve Ca^{+2} sensörleri arasındaki farklılaşma fonksiyonel olarak değişebilir; son zamanlardaki sonuçlar, Ca^{+2} tampon proteinlerin sensör fonksiyonu da gösterebildiğini işaret etmektedir (Schwaller, 2012).



Resim 2.9. Ca^{+2} homeostazında rol alan sistemlerin şematik gösterimi. cADPR: siklik ADP riboz, CNX: kalneksin, CRT: kalretikulin, CSQ: kalsekuestrin, IP3: inositol-1,4,5-trisfosfat, IP3R: Inositol trisfosfat reseptörü, MCU: mitokondri kalsiyum uniporter, NCX: sodyum/kalsiyum değiştirici, NMDA: N-metil-D-aspartat reseptörü, ORAI: kalsiyum salımı ile aktive olan kanal proteini, PDIA6: protein disülfid izomeraz A6, PLC: fosfolipaz C, PMCA: plasma membran kalsiyum ATPaz, R: reseptör, SOCE: depo aracılı kalsiyum girişi, STIM: stromal etkileşim molekülü, SARAF: SOCE aracılıklı düzenleyici faktör, TRPC: transient reseptör potansiyel kanalı, VOC: voltaj kapılı kalsiyum kanalı, IRE: inositol bağımlı kinaz, PERK: çift sarmal RNA-aktivasyonlu protein kinaz benzeri endoplazmik retikulum kinaz, ATF6: aktive edici transkripsiyon faktörü 6, UPR: katlanmamış protein cevabı

2.4.2. Ca^{+2} kanalları

Kalsiyum plazma membranına yerleşmiş çeşitli kanallarla elektrokimyasal gradiente göre hücre içine girebilir. Bu kanallar voltaj-bağımlı (CaV1-3), reseptör aracılıklı (N-metil-D-aspartat reseptör (NMDA) gibi), transient reseptör potansiyel kanallar (TRPC) veya depo-aracılı giriş (SOCE) kanalları (ORAI gibi) olabilir. Ca^{+2} hücre içi depolardan da salıverilebilir, bu endo/sarkoplazmik retikulumdan inosital-1,4,5-trifosfat (IP3), siklik ADPriboz (cADP), nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat (NAADP) gibi mesajcılar yoluyla gerçekleşir (Berridge, Bootman ve Roderick, 2003). Hücre yüzeyindeki reseptörlerin aktivasyonlarına cevaben; fosfolipaz C, fosfatidilinositol 4,5-bifosfatı IP3 ve diaçilgliserol (DAG)'e hidroliz eder. IP3, IP3-kapılı Ca^{+2} kanalı olan IP3 reseptörü (IP3R) aracılığıyla ER'den Ca^{+2} salımına neden olur (Resim 2.8.). Sarkoplazmik retikulumdaki bir diğer Ca^{+2} kanalı ryanodin reseptörü (RyR)'dür. Memelilerde üç farklı genle kodlanır. RyR1 ilk kez iskelet kasında, RyR2 kalpte ve RyR3 ise beyinde tanımlanmıştır fakat bu proteinler farklı hücre tiplerinde de eksprese edilebilmektedir (Resim 2.9.) (Krebs, Agellon ve Michalak, 2015).

IP3R en yaygın bulunan hücre içi Ca^{+2} kanalıdır ve omurgalılarda 3 farklı izoformu bulunur (IP3R1, IP3R2 ve IP3R3). İzofomların aminoasit sekansları %60-80 oranında homologdur. Ana düzenleyicileri sitozoldeki ve ER içindeki serbest Ca^{+2} konsantrasyonu, ATP, tiyol modifikasyonu ve protein kinazlar tarafından fosforilasyondur. Düşük nanomolar aralıkta Ca^{+2} konsantrasyonlarında IP3 için farklı bağlanma afiniteleri gösterirler (IP3R2 > IP3R1 > IP3R3) (Wojcikiewicz ve Luo, 1998). Ayrıca, IP3R1 izoformunun hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonuna bağlı inhibisyon gösterirken, IP3R2 ve IP3R3 göstermediği bulunmuştur (Hagar, Burgstahler, Nathanson ve Ehrlich, 1998; Ramos-Franco ve diğerleri, 2000). IP3R alt tiplerinin doku, hücre tipi veya subselüler lokasyonlarına bununla birlikte heterotetramerik kanal kompleksi oluşturma yeteneğine uygun olarak dağılımı ve çeşitliliğindeki farklılık, kalsiyum salım modellerinin farklı olmasına ve sonuçta farklı fizyolojik sonuçlara neden olur (Grayson, Haddock, Murray, Wojcikiewicz ve Hill, 2004). Vasküler dokuda her üç izoform da eksprese edilmektedir. Fakat vasküler duvarın endotel ve düz kas tabakalarında bu kanalların dağılımları farklılık göstermektedir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, IP3R1 alt tipinin torasik aortda, basilar ve mezenterik arterlerde baskın alt tip olduğu ve hem endotel hem de düz kasta eksprese edildiği gösterilmiştir. Diğer taraftan, IP3R2 ve IP3R3 büyük ölçüde endotel tabakasıyla

kısıtlı kalmıştır. Protein ekspresyon seviyeleri arasındaki fark, mRNA seviyeleri ile de uyumlu bulunmuştur (Grayson, Haddock, Murray, Wojcikiewicz ve Hill, 2004).

2.4.3. Sarko/endoplasmik retikulum kalsiyum ATPaz

ER kalsiyum pompası, Ca^{+2} 'un retiküler ağın lümeni içerisine alımından sorumludur. Sarko/endoplasmik retikulum kalsiyum ATPaz (SERCA) pompası P-tip ATPaz sınıfına aittir ve ATP kullanarak, iyon gradientine karşı membrandan Ca^{+2} geçişini sağlar (Krebs, Agellon ve Michalak, 2015). SERCA işlevlerinin düzenlenmesi, Ca^{+2} homeostazında anahtar rol oynar ve hücre tipine bağlı olarak değişir. Ayrıca, kas hücrelerinde ikili görev üstlenir: kas kasılması sırasında harekete geçen SR'yi kontrol eder ve sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu düşürerek gevşemeyi sağlar (Lipskaia, Chemaly, Hadri, Lompre ve Hajjar, 2010).

SERCA izoformları (SERCA1, SERCA2 ve SERCA3), üç farklı kromozomda yerleşmiş ATP2A1, 2 ve 3 genleri tarafından kodlanır (Dally, Corvazier, Bredoux, Bobe ve Enouf, 2010). Karşılık gelen proteinler ile en az 14 SERCA mRNA'sı tanımlanmıştır. Bu izoformlardan bazıları türe özgüdür ve ayrıca ekspresyonları hücre tipine ve gelişme evresine özeldir. SERCA1, SERCA2 ve SERCA3 ailelerindeki proteinler %75 veya daha fazla oranda homologdur (Periasamy ve Kalyanasundaram, 2007).

SERCA1 geni, 2 mRNA çeşidini kodlar ve çoğunlukla, hızlı uyarılan iskelet kaslarında eksprese edilir. SERCA1a yetişkin iskelet kasında eksprese edilirken, SERCA1b fetal dokularda eksprese edilmektedir (Periasamy ve Kalyanasundaram, 2007). SERCA1a'nın iskelet kası gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Toyoshima, Nakasako, Nomura ve Ogawa, 2000).

SERCA2 geninin alternatif kesilme sonucu oluşan a, b, c ve d olmak üzere 4 türü vardır. Kardiyak izoform da denilen SERCA2a kardiyak kas, yavaş kasılan iskelet kası ve düz kas hücrelerinde eksprese edilir. SERCA2b ise yaygın bir izoformdur ve hem kas hücrelerinde hem de kas-dışı hücrelerde eksprese edilmektedir (Periasamy ve Kalyanasundaram, 2007). SERCA2a ve SERCA2b, SERCA2 geninin alternatif kesilmesi yoluyla oluşur ve sadece SERCA2b'de ek olarak bulunan 49 amino asit nedeniyle farklıdır. SERCA2c ilk olarak kardiyak dokuda belirlenmiştir. SERCA2d mRNA'sı iskelet kasında bulunmuştur fakat

fonksiyonel ve endojen SERCA2d proteini ile ilgili bir kanıt yoktur (Chemaly, Bobe, Adnot, Hajjar ve Lipskaia, 2013).

SERCA3 ailesinin, 3'-ucundan çeşitli kesilme farklılıkları nedeniyle türe özgü izoformları vardır. Bunlar: 5 insan izoformu (SERCA3b-f), 2 fare (SERCA3b-c) ve 1 sıçan (SERCA3b/c) proteinleri ve yaygın olan SERCA3a izoformudur (Chemaly, Bobe, Adnot, Hajjar ve Lipskaia, 2013). SERCA3 izoformlarının ekspresyonu çoğunlukla kas-dışı hücrelerde, özellikle hematopoietik hücrelerdedir, kas hücrelerinde oldukça az miktarda ekspresyon vardır (Periasamy ve Kalyanasundaram, 2007). Ek olarak, SERCA3d ve SERCA3f'nin insan kalbinde eksprese edildiği gösterilmiştir (Dally ve diğerleri, 2009).

Vasküler düz kas hücrelerinde iki SERCA geni (ATP2A2 ve ATP2A3) simultane olarak eksprese edilir. SERCA2a ve SERCA2b yaygın biçimde eksprese edilen ve bazal Ca^{+2} alımında rolü olan izoformlardır. SERCA3 ise oldukça düşük miktarda eksprese edilir ve düşük afiniteli bir Ca^{+2} pompasıdır (Chemaly, Bobe, Adnot, Hajjar ve Lipskaia, 2013). Vasküler düz kastaki ana SERCA2 izoformunun ya SERCA2a ya da SERCA2b olması hücre fenotipine bağlı olarak değişebilir. Erişkin kan damarlarında, vasküler düz kas hücreleri farklı aralıklarda fenotipler sergilerler; çoğunlukla pasif/kontraktıl fenotiptedirler ve vasküler tonusu kontrol ederler. Kontraktıl vasküler düz kas hücrelerinin hasar durumunda, sentetik fenotipe doğru değişimi, vasküler onarım mekanizmasında hayati rol oynar ve aynı zamanda bu değişim vasküler remodelinge neden olan primer patofizyolojik mekanizmadır (Owens, Kumar ve Wamhoff, 2004). Vasküler düz kas hücrelerinin sentetik durumu, kontraktıl cevapla ilgili proteinlerin, özellikle SERCA2a izoformunun azalması ile karakterizedir; sitozolik Ca^{+2} , yavaş Ca^{+2} pompası SERCA2b ile zayıf bir şekilde pompalanmaktadır. Vasküler düz kas hücrelerindeki Ca^{+2} geçici modu ise yalnızca SERCA işlevine bağlıdır. Bu moda Ca^{+2} osilasyonları ekstraselüler Ca^{+2} yokluğunda korunmuştur; SERCA aktivitesinin bloklanması Ca^{+2} osilasyonlarını önlemiştir; bu sonuçlar SR'den salıverilen Ca^{+2} 'un osilasyonlara neden olduğunu göstermektedir (Chemaly, Bobe, Adnot, Hajjar ve Lipskaia, 2013).

SERCA izoformları, farklı hücrelerde özel işlevler için uyarlanmış ve gelişmiştir. Ekspresyonları ve aktivitelerindeki değişimler pek çok hücrel işlemi etkilemekte ve birçok hastalığın patogenezinde yer almaktadır.

2.5. Endoplazmik Retikulum Stresi

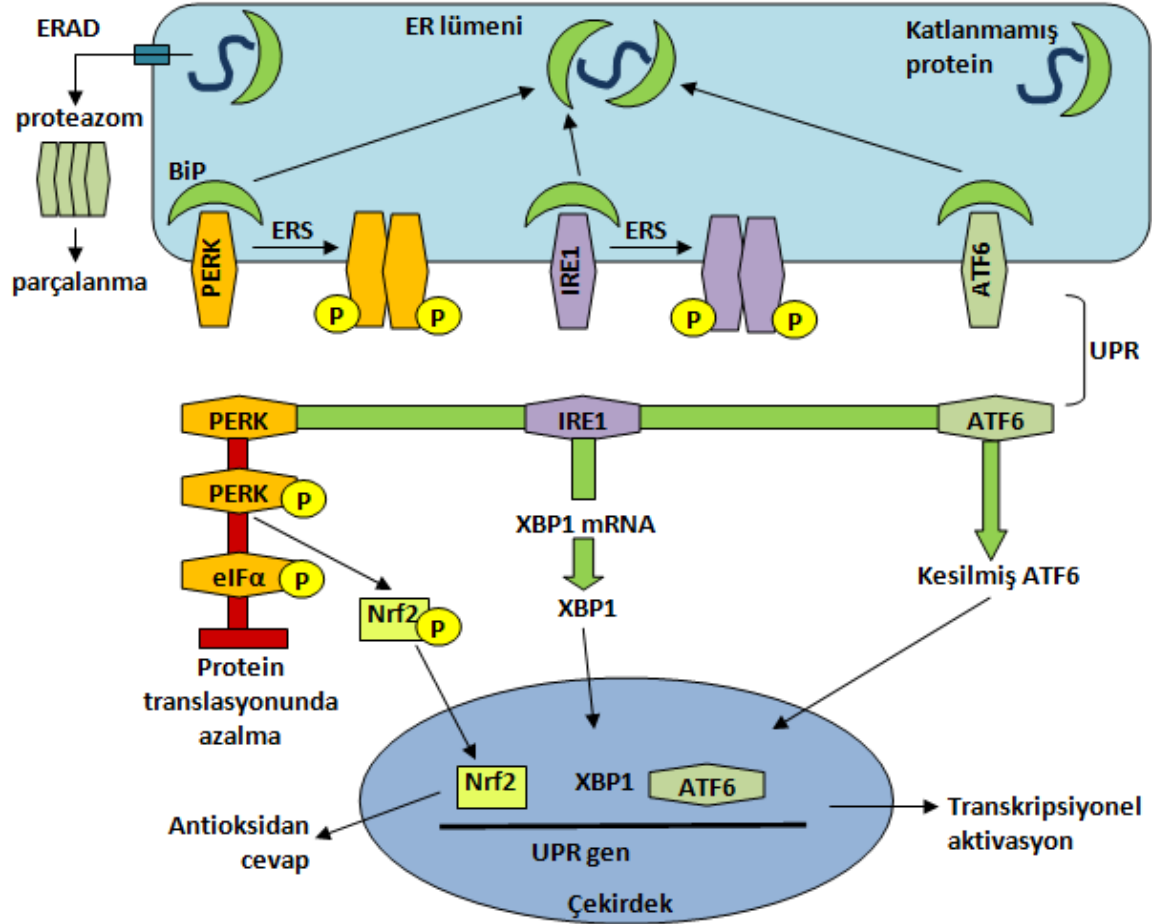
Endoplazmik retikulum (ER) ökaryotlarda protein katlanmasının düzenlendiği en önemli organeldir. ER, protein sentezi için kalite kontrol merkezi olarak tanımlanabilir. Sadece doğru katlanmış proteinler ER'dan çıkabilirler, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler tutulur ve degrade edilir (Shen, Zhang ve Kaufman, 2004). Bir hücrenin stresi algılama, cevap verme ve engelleme yeteneği homeostazın devamı için gereklidir. Stres ister endojen isterse eksojen olsun, hücrede patojenik enfeksiyon, kimyasal hasar, genetik mutasyon ve hatta normal farklılaşma gibi pek çok farklı yolla oluşabilir. Protein katlanma işlemi bu durumlara özellikle duyarlıdır (Rutkowski ve Kaufman, 2004). ER hücresel strese karşı erken cevap alanıdır (Zhao ve Ackerman, 2006; Ron ve Walter, 2007). ER işlev kapasitesini aşan fizyolojik veya patolojik durumlarda lümende katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi meydana gelir ve bu durum ERS olarak isimlendirilmektedir (Düzgün, Alaçam ve Okuyucu, 2012).

2.5.1. Endoplazmik retikulum stres yolağı

ERS'nin erken evrelerinde moleküler şaperonlardaki bozulma, hücre içi proteinlerin stabil durumunu bozar. Pek çok adaptif ve koruyucu strateji, ERS'nin zararlı etkilerinin üstesinden gelmek için devreye girer. Örnek olarak, ER'de katlanmamış/yanlış katlanmış proteinlerin fazla miktarda birikmesi nedeniyle, yeni protein sentezi inhibe edilir. Akümü olmuş proteinlerin ortadan kaldırılması amacıyla, çeşitli şaperon genleri transkripsiyonel seviyede indüklenir ve ERAD sistemi aktive olur. Bu sistem proteazomal degradasyon yoluyla yanlış katlanmış proteinleri ortadan kaldırabilir. Bu işlemler UPR olarak adlandırılır (Meusser, Hirsch, Jarosch ve Sommer, 2005; Lynch ve diğerleri, 2012).

UPR sırasında, ER homeostazındaki bir dengesizlik algılanır; sitoplazmaya ve nükleusa iletilir ve kompensatuvar cevabın oluşmasına neden olur. Luminal, transmembran ve sitoplazmik alanları olan çeşitli ERS sensörleri vardır. Yanlış katlanmış proteinlerin konsantrasyonundaki artış, luminal sensör alanı tarafından algılanır ve daha sonra farklı sinyallerle sitoplazma ve nükleusa iletilir (Bravo ve diğerleri, 2013).

UPR, üç ER transmembran reseptör proteini aracılığıyla gerçekleşen kompleks bir hücresel cevaptır. Bu proteinler: PERK, IRE1 ve ATF6'dır. GRP78 de UPR'de önemli rol oynar (Resim 2.10) (Naidoo, 2009; Liu, Chen ve Chen, 2016).



Resim 2.10. UPR'nin üç esas yolağının şematik gösterimi. ER: endoplazmik retikulum, ERS: endoplazmik retikulum stresi, ER-bağımlı protein degradasyonu, UPR: katlanmamış protein cevabı, IRE1: inositol bağımlı kinaz, PERK: çift sarmal RNA-aktivasyonlu protein kinaz benzeri endoplazmik retikulum kinaz, ATF6: aktive edici transkripsiyon faktörü 6, eIFα: ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2, Nrf2: nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2

IRE1 yolağı, UPR'nin en yüksek oranda korunumlu koludur. IRE1, bir N-terminal luminal sensör alanı, tek bir transmembran alanı ve C-terminal sitozolik efektör alanından oluşan bir ER transmembran proteinidir (Walter ve Ron, 2011). ER lümenindeki katlanmamış proteinler IRE1 tarafından algılanır ve sitozolik efektör alanda, reseptör oligomerizasyonu ve transfosforilasyonu indüklenir (Shamu ve Walter, 1996). Memelilerde iki IRE1 paralogu vardır: IRE1α ve IRE1β. Bunlar benzer yapısal özelliklere sahiptir fakat

fonksiyonları farklıdır. ERS durumunda, IRE1 α “X-box-bağlayıcı protein 1” (X-box-binding protein 1; XBP1) mRNA birleşmesini katalize eder (Hac1’in memeli ortologu); IRE1 β ise 28S rRNA alan spesifik kesilmesine ve translasyonel atenüasyona aracılık eder (Tirasophon, Welihinda ve Kaufman, 1998; Iwawaki ve diğerleri, 2001). IRE1 α , kendi mRNA’sını kesme yoluyla kendi ekspresyonunu kontrol eder, ayrıca IRE1 α kesilmesi için aday 13 başka mRNA tanımlanmıştır (Oikawa, Tokuda, Hosoda ve Iwawaki, 2010).

IRE1 α ’nın ER stresi algılama kapasitesi, BiP/GRP78’den ayrılmasına ve doğrudan katlanmamış proteinlerle etkileşimine bağlıdır. Bu gözlemler IRE α regülasyonunun iki basamaklı modeline uymaktadır. BiP/GRP78’in IRE1 α ’dan ayrılması oligomerizasyonu sağlarken, katlanmamış proteinlere bağlanma IRE1 α aktivasyonuna neden olur (Kimata ve diğerleri, 2007). Başka proteinler de IRE1 α aktivasyonunu kontrol etmektedir. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri Bax ve Bak, IRE1 α ’nın sitozolik alanı ile protein kompleks oluşturur; bu aktivasyonu için gereklidir (Hetz ve diğerleri, 2006).

IRE1 α aktive olduğunda, luminal ERS sinyali sitoplazmaya iletilir ve çeşitli sinyal yollarını aktive eder. Bunlardan biri IRE1 α aracılı XBP1 mRNA birleşmesi ile başlatılır. XBP1, ER protein sentezi, katlanması, glikozilasyon, ERAD, redoks metabolizması, otofaji, lipid biyogenezi ve veziküler trafik ile ilgili genleri regüle eden güçlü bir transaktivatördür (Walter ve Ron, 2011).

IRE1 α ayrıca TNF reseptör-bağlantılı adaptör protein TRAF2 yoluyla c-Jun N-terminal kinaz (JNK)’yı aktive eder. ERS ile gelişen bu aktivasyon, mitogen-activated protein 3 kinaz (MAP3K), apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) ve ASK1-interacting protein-1 (AIP1) varlığını gerektirir. JNK aktivasyonu hücre ölümü ile ilişkilidir ve c-Jun aktivasyonu yoluyla hücrenin hayatta kalmasını destekler. JNK’ya benzer şekilde ERS, IRE1 ve TRAF2 aracılığıyla NF- κ B aktivasyonunu indükler. Bu aktivasyon mitokondri matriksinde bulunan antioksidan enzim manganez süperoksid dismutaz (MnSOD)’ın ekspresyonunu kontrol eder (Bravo ve diğerleri, 2013).

Bir diğer ER stres dönüştürücü olan PERK, ilk olarak memeli pankreatik islet hücrelerinde tanımlanmıştır (Shi ve diğerleri, 1998). Katlanmamış proteinlerin akümüasyonu durumunda, ER’de GRP78/PERK kompleksi ayrılır ve otofosforilasyon yoluyla kinaz alanı aktive olur. Daha sonra PERK, ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 (eukaryotic

translation initiation factor-2; eIF2 α)'in α alt ünitesini fosforiller ve aktive eder. PERK bir luminal alan ve protein serin/treonin kinaz aktivitesi gösteren sitozolik alandan oluşmaktadır. Protein kinaz alanı, büyük bir C-terminal lobu ve daha küçük bir N-terminal lobu içerir. C-terminal lobu, geniş bir aktivasyon kıvrımı, yedi α -heliks ve iki kısa β -kordonundan oluşur. N-terminal lobu, üç α -heliks ve beş β -kordonu içerir (Cui, Li, Ron ve Sha, 2011).

UPR aktif olmadığında BiP/GRP78, PERK'in luminal alanına bağlıdır. Katlanmamış protein akümüasyonu üzerine, BiP/GRP78 PERK'ten ayrılır ve bu etkileşimin kaybı aktive olmuş PERK'in yüksek moleküler kütle kompleksinin oluşumu ile korelasyon gösterir. BiP/GRP78 fazla ekspresyonu bu aktivasyonu azaltır (Bertolotti, Zhang, Hendershot, Harding ve Ron, 2000).

ER stresi PERK'in protein kinaz aktivitesinde ve eIF2 α fosforilasyonunda artışa neden olmaktadır. Bu durumda eIF2 α -GDP'nin eIF2 α -GTP'ye dönüşümü inhibe olur. eIF2 α -GTP ise aktif 43S translasyon-baştatıcı kompleksinin oluşumunda anahtar rol oynamaktadır (Dever, 2002). Sonuç olarak, PERK yolağı genel mRNA translasyonunu inhibe eder, protein sentezini düşürür ve ER'nin işini azaltır. PERK ayrıca UPR transkripsiyonel aktivasyonunda rol alır (Harding ve diğerleri, 2003).

eIF2 α fosforilasyonuna cevaben oluşan gen ekspresyonu ökaryotlarda gerçekleşir. Transkripsiyon faktörü ATF4 translasyonel olarak indüklenir çünkü öncesinde 5'-ucunda açık okuma yapısı (open reading frame; ORF) vardır. Bu ORF normal koşullarda, doğru ATF4 translasyonunu önler. Sadece eIF2 α fosforile olduğunda bu işlevi göstermez ve ATF4 translasyonu olur (Harding ve diğerleri, 2000). Nükleer faktör eritroid 2–ilişkili faktör 2 (Nrf2) transkripsiyon faktörü de PERK substratlarından biridir. Stres altında olmayan hücrelerde, Nrf2, Keap1 ile birleşmiş halde sitoplazmada bulunur. PERK aracılı fosforilasyon Nrf2/Keap1 kompleksinin ayrılmasını tetikler ve tekrar birleşmelerini engeller, daha sonra Nrf2'nin nükleusa taşınmasına neden olur (Cullinan ve diğerleri, 2003).

Hücre içi homeostaz sağlandıktan sonra ise aktif PERK defosforile olarak inaktive olmaktadır. Fakat bu inaktivasyon mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. p-PERK

tarafından aktive edilen p-eIF2 α birbirinden bağımsız iki fosfataz ile defosforile olarak inaktif hale geçmektedir (Bravo ve diğerleri, 2013).

ERS cevabında üçüncü yolak ise ATF6 yolağıdır. ATF6 α ATF6 β olmak üzere iki izoformu vardır ve genlerin regülasyonu ile ilişkili bir protein ailesinin üyesidir. ATF6, cAMP cevap elementi (CRE) olarak adlandırılan bir sekansa sahiptir. Bu 90 kDa protein, homo- veya heterodimerizasyon sonrası DNA bağlanması için bZIP alanı içermektedir. ATF6, ERS durumunda Golgi kompartımanına transloke olur ve iki proteaz ile kesilir. Serin proteaz alanı-1 ATF6'yı luminal alandan keserken, N-terminal parçası metalloproteaz alanı-2 ile kesilir. Nükleusa giren ATF6'nın kesilen N-terminal parçası UPR genlerinin transkripsiyonunu destekler (Liu, Chen ve Chen, 2016).

ERS'nin kardiyovasküler hastalıklar, obezite, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, viral enfeksiyon, kanser, inflamasyon gibi pek çok hastalıkla ilişkisi olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Minamino, Komuro ve Kitakaze, 2010; Ozcan ve diğerleri, 2006; Flamment, Hajdich, Ferré ve Foulfelle, 2012; Lindholm, Wootz ve Korhonen, 2006; Dong ve diğerleri, 2010). Bu nedenle ERS yolaklarının aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

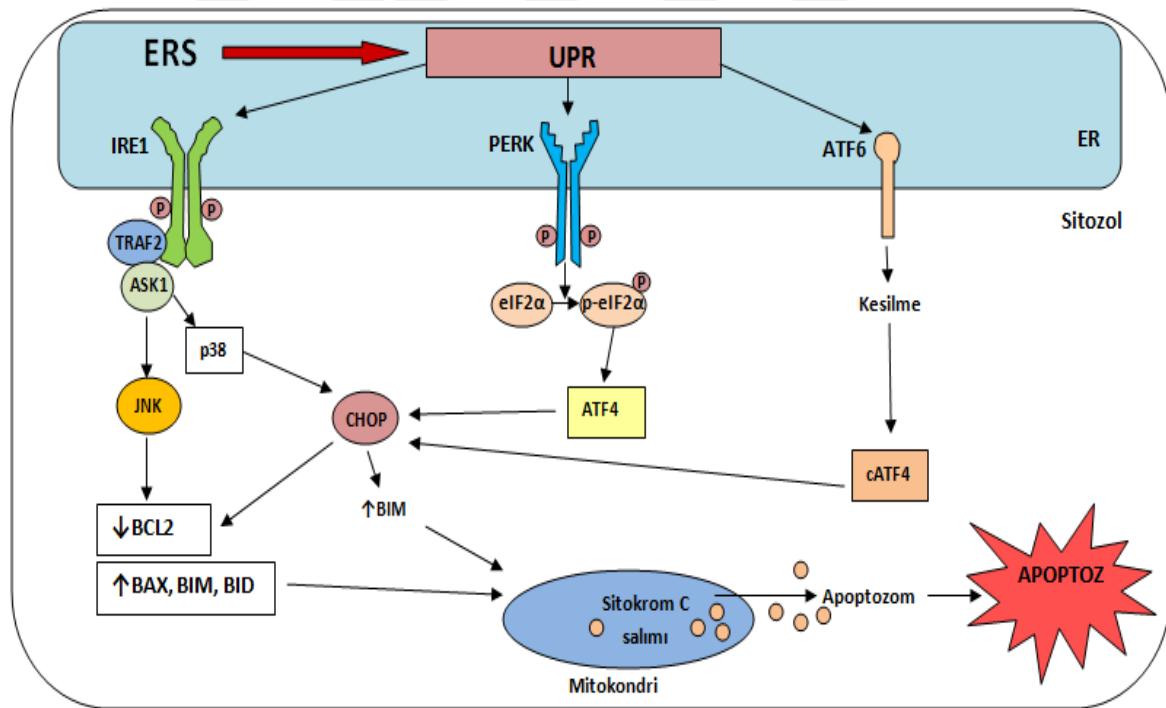
2.5.2. Endoplazmik retikulum stresine bağlı hücre ölümü

ER stresinin kronik olarak devam ettiği ve ER'deki protein akümüülasyonunun katlama kapasitesini oldukça aştığı durumlarda, hücresel işlev kaybı ve hücre ölümü meydana gelir (Hetz, 2012). UPR yolakları arasında IRE1 α , hücrenin sonuna karar veren anahtar molekül görevi görmektedir. IRE1 α sitoprotektif fonksiyonunun yanında ASK1'in aktivasyonunu stimüle eder. Böylece, kaskadın altlarındaki JNK ve p38 MAPK aktivasyonuna neden olur (Ron ve Hubbard, 2008). JNK'nın apoptozu indükleyici substratları arasında B-hücre lenfoma (B-cell lymphoma 2, Bcl2) JNK fosforilasyonu ile inhibe olur. Ayrıca, p38 MAPK transkripsiyon faktörü C/EBP homolog protein (CHOP)'u fosforilleyerek aktive eder. CHOP gen ekspresyonunu apoptoz lehine değiştirir; Bim ekspresyonunu artırırken, Bcl2 ekspresyonunu azaltır (Puthalakath ve diğerleri, 2007; Yamaguchi ve Wang, 2004) (Resim 2.11).

Düzenlenmiş IRE1 bağımlı mRNA bozulması (RIDD)'nın ER'de bulunan mRNAları azalttığı gösterilmiştir (Hollien ve diğerleri, 2009). RIDD işlemi selektif olarak, protein

katlanmasında rol alan proteinleri kodlayan mRNA'ları hedef alır ve degrade eder. RIDD sinyalinin uzun süreli aktivasyonu, IRE1 α 'nın konformasyonel durumuna bağlı olarak işlev göstererek hücre ölümünü kolaylaştırır. IRE1 α ile aktive olan RIDD'a aracılık eden mekanizmalar ise tam olarak bilinmemektedir (Sano ve Reed, 2013). Ayrıca IRE1'in endoribonükleaz aktivitesi miRNA'ları kesebilir; bu miRNA'lar proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu düzenleyerek de hücre ölümünü kolaylaştırabilir (Dufey, Sepúlveda, Rojas-Rivera ve Hetz, 2014).

ATF6, ERS durumunda Golgi kompartımanına transloke olur ve iki proteaz ile kesilir. N-terminal parçası nükleusa giderek BiP, Grp94 ve CHOP gibi hedef genleri aktive eder. ATF6 ayrıca, IRE1 α 'nın önemli substratı olan XBP1 mRNA transkripsiyonunu da artırmaktadır (Logue, Cleary, Saveljeva ve Samali, 2013).



Resim 2.11. ERS-aracılı hücre ölümü. ER: endoplazmik retikulum, ERS: endoplazmik retikulum stresi, UPR: katlanmamış protein cevabı, IRE1: inositol bağımlı kinaz, PERK: çift sarmal RNA-aktivasyonlu protein kinaz benzeri endoplazmik retikulum kinaz, ATF6: aktive edici transkripsiyon faktörü 6, TRAF2: tümör nekroz faktör reseptörü aracılı faktör 2, ASK1: apoptoz sinyali düzenleyici kinaz 1, JNK: c-Jun N-terminal kinaz, Bcl2: B-hücre lenfoma 2, Bax: Bcl2-bağılantılı X protein, BIM: Bcl2 benzari protein, BID: BH3-etkileşimli alan ölüm agonisti, CHOP: C/EBP homolog protein, eIF α : ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2, ATF4: aktive edici transkripsiyon faktörü 4, cATF4: kesilmiş ATF4

PERK, ERS durumunda mRNA translasyonunun azalmasına neden olan ana proteindir. Bu azalma eIF2 α fosforilasyonu aracılığıyla olur. eIF2 α fosforilasyonu ATF4 gibi UPR-bağımlı genlerin translasyonuna izin verir. ATF4'ün önemli hedefleri CHOP, GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible 34) ve ATF3'tür (Sano ve Reed, 2013). PERK, mitokondri-bağımlı ER membranları (MAMs)'nda kalsiyum sinyallemesinin kontrolü ve ROS üretimi yoluyla, sitokrom c salımı ve apoptozun ayarlanması için gereklidir (Dufey, Sepúlveda, Rojas-Rivera ve Hetz, 2014) (Resim 2.11).

Bcl-2 ailesi proteinler, kronik ER stres altında apoptozun kontrolünde esansiyel rol oynarlar. Proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri Bcl2-bağımlı X protein (Bax) ve Bak, mitokondride apoptoz indüksiyonunda anahtar adımdır ve sitokrom c salımına ve kaspazların aktivasyonuna neden olurlar (Urrea, Dufey, Lisbona, Rojas-Rivera ve Hetz, 2013). Transkripsiyon faktörü CHOP, antiapoptotik Bcl2 proteinini azaltırken GADD34'ü indükler. Ayrıca UPR BH3-only proteinlerin (PUMA, BIM ve NOXA gibi) transkripsiyonel upregülasyonunu kontrol eder. BH3-only protein BID, kaspaz-2 kesilmesi ile apoptozu aktive edebilir. ER membranında, TM6/BI-1 kalsiyum salımını inhibe eder. Mitokondriyel kalsiyum fazla yüklenmesi, permeabilite geçiş porunun açılmasını indükler ve mitokondriyel iç membran potansiyelinin kaybına, iyonik dengesizliğe, matriste şişliğe ve mitokondriyel iç ve dış membran permeabilizasyonuna neden olur. Ve hücre apoptoza gider (Dufey, Sepúlveda, Rojas-Rivera ve Hetz, 2014) (Resim 2.11).

2.5.3. Hipertansiyonda endoplazmik retikulum stresi

Giderek artan sayıda çalışma ve kanıt ERS ve hipertansiyon arasındaki ilişkiyi işaret etmektedir. İlk olarak Young ve diğerleri (2012) ERS'in, özellikle beyindeki ERS'in, kronik hipertansiyonda anahtar rol oynadığını göstermiştir. Böylece ERS ile ilişkili hastalıklar arasına hipertansiyon da katılmış ve sonraki çalışmalarda, farklı hipertansiyon modellerinde ERS'in rolü araştırma konusu olmuştur. Anjiyotensin II ile oluşturulmuş hipertansiyonda, aortta ve mezenterik resistans arterlerde ERS geliştiği, eNOS fosforilasyonunun ve endotele bağımlı gevşemelerin azaldığı gösterilmiş; TUDCA ile ERS inhibisyonunun eNOS fosforilasyonunu artırdığı, vasküler işlevi iyileştirdiği ve kardiyak hasarı azalttığı bulunmuştur (Kassan ve diğerleri, 2012). Farelerde yapılan bir çalışmada ERS'in anormal vasküler kontraksiyona ve bunun sonucu olarak yüksek kan basıncına neden olduğu öne sürülmüştür. ERS inhibisyonunun, anormal vasküler kasılmaları

düzeltiltiği ve kan basıncını düşürdüğü rapor edilmiştir (Liang ve diğerleri, 2013). Spontan hipertansif sıçanlarda, TUDCA ile ER stres inhibisyonu artmış olan sistolik kan basıncını düşürmüş ayrıca artmış aort kontraksiyonunu normalize etmiştir. TUDCA uygulamasının, ACh ile uyarılan prostanoid salımı artışını, siklooksijenaz-1 ekspresyonu artışını, sitozolik fosfolipaz A2 ile ERK1/2 fosforilasyonundaki artışı geri çevirdiği gösterilmiştir (Spitler, Matsumoto ve Webb, 2013). ERS'nin, vasküler düz kas hücrelerinde proapoptotik ve fibrotik sinyal yolları aracılığıyla aort sertleşmesinde rol oynadığı belirtilmiştir. TUDCA ile ERS inhibisyonu aortada apoptozu, kolajen içeriği artışını ve fibrozisi azaltmıştır (Spitler ve Webb, 2014). Endotel hücrelerinde ERS'nin kronik aktivasyonunun, oksidatif stres artışına ve inflamasyona sonuç olarak da çoğunlukla hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Lenna, Han ve Trojanowska, 2014). Kimyasal olarak indüklenen ERS'nin, p38 MAPK ve oksidatif stres artışına ve vasküler endotel işlev bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir (Galán ve diğerleri, 2014). Anjiyotensin II ile indüklenmiş hipertansiyonda yapılan bir diğer çalışmada, ERS inhibisyonunun hipertansiyonu önlemediği fakat vasküler remodelingi azalttığı belirtilmiştir (Takayanagi ve diğerleri, 2015). Jo ve diğerleri (2015) DOCA-tuz uygulamasının, beyinde subfornikal organda ERS'ye yol açtığını göstermişlerdir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, hipertansiyonda ERS inhibisyonunun yararlı etkilerini ortaya koymaya devam etmektedir. Fakat hipertansiyon ile ER stresi arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.5.4. Endoplazmik retikulum stresi inhibisyonu

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yeni bir potansiyel tedavi yaklaşımı olarak ER stresi inhibisyonuna odaklanılmıştır. Çalışmalarda sıklıkla kullanılan ERS inhibe edici maddeler 4-fenil bütirik asit (PBA) ve TUDCA'dır. Ursodeoksikolik asit (UDCA)'nın taurin konjugatı olan TUDCA, sadece intestinal bakteriler tarafından üretilen sekonder bir safra asitidir. TUDCA potent bir apoptoz önleyicidir; ROS üretimini inhibe eder; ERS'i azaltır ve UPR'yi stabilize eder (Vang, Longley, Steer ve Low, 2014). TUDCA'nın ER stresini engelleyici etkisi birçok çalışmada ortaya konmuştur (Ozcan ve diğerleri, 2006; Chen ve diğerleri, 2008). Tunikamisin ile indüklenen ERS'de TUDCA uygulamasının, PERK fosforilasyonunu, eIF2 α fosforilasyonunu ve JNK aktivasyonunu önlediği bulunmuştur (Ozcan ve diğerleri, 2006).

TUDCA ile ER stres inhibisyonunun tip 2 diyabetik farelerde vasküler patolojide koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Amin ve diğerleri, 2012). Anjiotensin II ile indüklenmiş hipertansiyonda ER stres inhibisyonu kardiyak hasarı azaltırken vasküler işlevde iyileşme sağlamaktadır (Kassan ve diğerleri, 2012). Spontan hipertansif rat modelinde (SHR), ER stres inhibisyonunun SHR’de artmış olan sistolik kan basıncını düşürdüğü ayrıca artmış aort kontraksiyonunu normalize ettiği gösterilmiştir (Spitler, Matsumoto ve Webb, 2013). ER stresinin baskılanmasının çeşitli hastalıklar üzerindeki olumlu etkileri ortaya konmuştur fakat DOCA-tuz uygulaması ile indüklenen hipertansiyonda endotel işlevleri üzerindeki etkileri bilinmemektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

DOCA (Sigma)

TUDCA (Calbiochem)

NaCl (Merck)

KCl (Merck)

MgCl₂ (Merck)

NaH₂PO₄ (Merck)

Dekstroz (Merck)

CaCl₂ (Merck)

NaHCO₃ (Merck)

Mısır özü yağı (Kristal)

EGTA (Sigma)

Fenilefrin (Sigma)

Asetilkolin (Sigma)

ZnSO₄ (Merck)

Sülfanilik asit (Merck)

NED (Griess reajanı)

NaOH (Merck)

Amonyum asetat (Merck)

Neokuproin (Merck)

CuCl₂.2NH₄Cl.2H₂O (Merck)

diNa EDTA (Sigma)

Tris base (Merck)

PMSF (Sigma)

NP40 (Sigma)

Sukroz (Sigma)

SDS (Sigma)

Glisin (Sigma)

Metanol (Merck)

Tween 20 (Sigma)

Na₂HPO₄ (Sigma)

K₂HPO₄ (Sigma)

Akrilamid (Sigma)

Bis-akrilamid (Sigma)

TEMED (Sigma)

Amonyum persülfat (APS) (Sigma)

Bax antikor (N-20) sc-493, rabbit polyclonal IgG, (Santa Cruz Biotech.)

Bcl-2 antikor (C21) sc-783, rabbit polyclonal IgG, (Santa Cruz Biotech.)

PERK antikor (H-300) sc-13073, rabbit polyclonal IgG, (Santa Cruz Biotech.)

p-PERK antikor (Thr 981) sc-32577, rabbit polyclonal IgG, (Santa Cruz Biotech.)

IP3R-1 antikor (H-80) sc-28614, rabbit polyclonal IgG, (Santa Cruz Biotech.)

SERCA2 antikor (N-19) sc-8095, goat polyclonal IgG, (Santa Cruz Biotech.)

GAPDH antikor (FL-335) sc-25778, rabbit polyclonal IgG, (Santa Cruz Biotech.)

Goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2030, (Santa Cruz Biotech.)

Rabbit anti-goat IgG-HRP sc-2768, (Santa Cruz Biotech.)

3.2. Kullanılan Aletler

Kuyruktan Kan Basınç Ölçüm Cihazı (BIOPAC Systems, NIBP200A)

İzole organ banyosu sistemi (BIOPAC Systems)

pH metre (Mettler Toledo)

Mikropipet (Eppendorf Research)

Hassas terazi (Schimadzu)

Vorteks (Firlabo)

Santrifüj (Sigma)

Doku parçalayıcı (Qiagen)

Çalkalayıcı (Labnet)

Isıtıcı blok (Biosan)

Spektrofotometre (Multiskan Go, Thermo Scientific)

Elektroforez tankı (Bio-Rad)

Güç kaynağı (Thermo Scientific)

Transfer sistemi (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad)

Görüntüleme sistemi (ChemiDoc MP Imaging system, Bio-Rad)

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışları

Krebs Çözeltisi

NaCl 112 mM

KCl 5 mM

NaH₂PO₄ 1,2 mM

Dekstroz 11,5 mM

MgCl₂ 0,5 mM

CaCl₂ 2,5 mM

NaHCO₃ 25 mM

Maddeler istenen konsantrasyon için gerekli miktarlarda tartılarak distile su içerisinde çözülmüştür.

Homojenizasyon Tamponu

diNa EDTA 2 mM

Tris 50 mM

PMSF 1 mM

NP40 % 1

Sukroz % 10

Proteaz ve fosfataz inhibitörleri kokteyl tablet

Maddeler gerekli miktarlarda tartılarak çözelti PBS içerisinde hazırlanmıştır.

Elektroforez Tamponu

Tris 3 g

Glisin 14,4 g

SDS 1 g

Gerekli miktarlar tartılarak 1 L distile su içerisinde çözülür.

Transfer Tamponu

Tris 3,028 g

Glisin 14,41 g

Maddeler tartılarak 800 ml distile suda çözülür. 200 ml metanol eklenir.

TBS-T Tamponu

NaCl 58,04 g

Tris base 4,84 g

Maddeler tartılarak distile suda çözülür. pH 7,4'e ayarlanır. Hacim 2 L'ye tamamlanır. 1 mL Tween 20 eklenir.

PBS Tamponu

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 10 mM

K₂HPO₄ 1,8 mM

Maddeler tartılarak distile suda çözülür. pH 7,4'e ayarlanır. Hacim 1 L'ye tamamlanır.

Tris Çözeltileri

Tris 0,5 M (pH:6,8)

Gerekli miktar tartılarak distile suda çözülür ve pH 6,8'e ayarlanır.

Tris 1,5 M (pH:8,8)

Gerekli miktar tartılarak distile suda çözülür ve pH 8,8'e ayarlanır.

Jel Hazırlanışı

Üst jel (2 jel için):	Distile su	6,1 ml	
	Bis/Akrilamid	1,3 ml	
	Tris (0,5 M; pH 6,8)	2,5 ml	
	%10'luk SDS	0,1 ml	
	%10'luk APS	50 µl	
	TEMED	10 µl	
Alt jel (2 jel için):		%10'luk jel	%12'lik jel
	Distile su	4,1 ml	3,4 ml
	Bis/Akrilamid	3,3 ml	4 ml
	Tris (1,5 M; pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml
	%10'luk SDS	0,1 ml	0,1 ml
	%10'luk APS	50 µl	50 µl
	TEMED	50 µl	50 µl

Maddeler belirtilen miktarlarda eklenerek karıştırılır. APS ve TEMED en son eklenir.

3.4. Deney Hayvanı Grupları

Deneylerde Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş. tarafından üretilen 240-260 g ağırlığında, 8 haftalık Wistar albino erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'ndan G.Ü.ET-13.076 kod numaralı, 29.11.2013 tarih ve 211-26578 sayılı etik kurul izni alınmıştır.

Hayvanlar rastgele her grupta 8 hayvan olacak şekilde dört gruba ayrılmıştır. Gruplar:

Grup 1: Kontrol

Grup 2: Kontrol + TUDCA (150 mg/kg/gün, ip, 4 hafta)

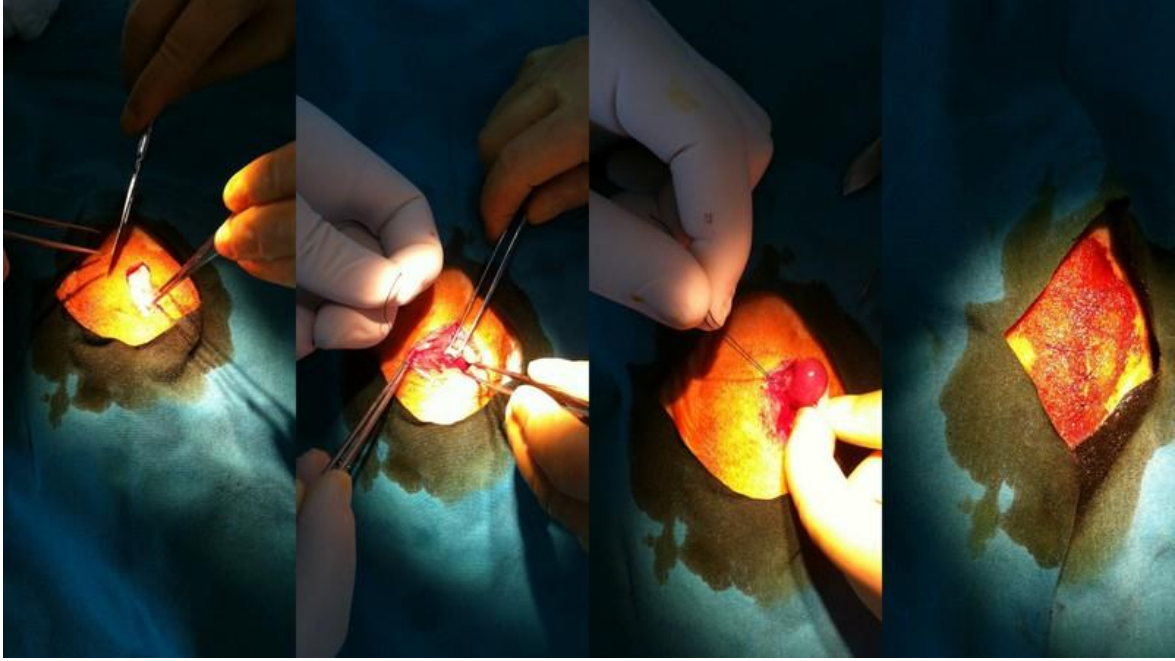
Grup 3: Hipertansif

Grup 4: Hipertansif + TUDCA (150 mg/kg/gün, ip, 4 hafta)

TUDCA uygulaması son 4 hafta süresince 150 mg/kg/gün intraperitoneal enjeksiyon ile yapılmıştır. TUDCA serum fizyolojik içerisinde çözülerek verilmiştir.

3.5. DOCA-Tuz Hipertansiyon Modelinin Oluşturulması

Sıçanlarda hipertansiyon oluşturmak için “DOCA-tuz hipertansiyon modeli” kullanılmıştır. Sıçanlara anestezi altında (ketamin 80 mg/kg+ksilazin 10 mg/kg, ip), steril şartlarda tek taraflı (sol) nefrektomi uygulanmıştır.



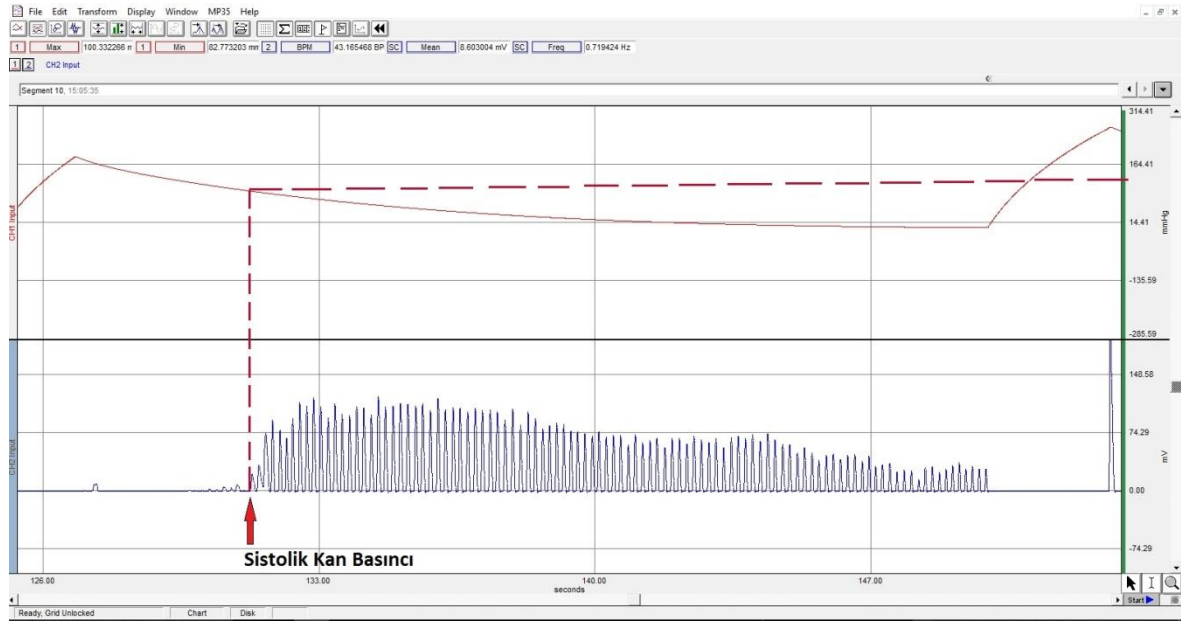
Resim 3.1. Unilateral nefrektomi operasyonu

Postoperatif toparlanma için bir kez analjezik (dipiron 100 mg/kg, intramusküler) ve 2 ml serum fizyolojik subkütan enjeksiyonla verilmiştir. Bir haftalık iyileşme süreci sonunda, periyodik olarak haftada iki kez 20 mg/kg subkütan DOCA enjeksiyonlarına başlanmıştır. DOCA mısır yağı içerisinde (20 mg/ml derişimde) uygulanmıştır. Ek olarak içme suyuna % 1 NaCl ve % 0,2 KCl katılmıştır. Kan basınçları 140/90 mmHg ve üzerinde olan sıçanlar hipertansif kabul edilmiştir. Nefrektomiden bir hafta önce başlamak koşulu ile haftada bir kez 12 hafta boyunca kan basınçları kaydedilmiş ve ağırlıkları ölçülmüştür. Kontrol hayvanlarının da ağırlık ve kan basıncı ölçümleri haftalık olarak yapılmıştır.

3.6. Kan Basıncı Ölçümü

Sıçanlarda sistolik kan basıncı ölçümleri kuyruktan kan basıncı ölçüm sistemi (Tail cuff) kullanılarak yapılmıştır. Bütün kan basıncı ölçümler günün aynı saat aralığında (14.00-15.00) yapılmıştır. Ölçüm öncesi sıçanlar 15 dakika boyunca ısıtma kabini de 40°C’de

tutulmuştur. Daha sonra kuyrukları dışarıda kalacak şekilde ölçüm kutusuna konulmuş ve kuyruklarından kan basıncı kayıtları alınmıştır. Her ölçüm döneminde her bir sıçan için ardı ardına en az 6 ölçüm yapılmıştır. Ayrıca tüm sıçanlarda, ortam şartları nedeniyle oluşabilecek stres kaynaklı kan basıncı artışlarını önlemek için deneylere başlamadan önce alıştırma ölçümleri yapılmıştır.



Resim 3.2. Kan basıncı ölçümünden örnek trase

3.7. İzole Aort Deneyleri

12 hafta sonunda sıçanlar, ketamin+ksilazin anestezisinin ardından abdominal aorttan kan alınarak ötenazi edilmiştir. Hayvanların kanı EDTA'lı tüplere alınarak santrüfüljenmiş ve elde edilen plazma deneylerde kullanılmak üzere -80°C 'de saklanmıştır. Torasik aortun bir kısmı "Western Blot" çalışmaları için alınıp -80°C 'de saklanmıştır.

Sıçan torasik aortası dikkatlice çıkarıldıktan sonra, etrafındaki bağ doku temizlenip 2-3 mm'lik 4 adet halka kesilmiştir. Halkalardan ikisinde endotel dokusu uzaklaştırılmıştır. Damar halkaları karşılıklı iki tel arasına takılarak, gazlanan (% 95 O_2 % 5 CO_2) ve ısıtılan (37°C) Krebs çözeltisi içeren izole organ banyolarına yerleştirilmiştir. İzometrik kasılmalar kaydedilmiştir. Tüm aorta halkalarına 2 g'lık ön gerim uygulanarak 40 dakikalık dengelenme süresi boyunca, 10 dakikada bir Krebs çözeltisiyle yıkanmıştır. Dengelenme sürecinin ardından, 10-90 mM KCl kümülatif dozlarına verdiği kasılma cevapları

alınmıştır. Daha sonra banyolara 40 dakikalık dengelenme periyodu uygulanmıştır. Bu aşamadan sonra endotelli ve endotelsiz aort halkalarına farklı protokoller uygulanmıştır.

Endotelli damar halkaları submaksimal doz (10^{-6} M) fenilefrin (FE) ile kastırılarak asetilkolinin 10^{-8} M- 10^{-5} M kümülatif dozlarına verdiği gevşeme yanıtları kaydedilmiştir. Tekrar 40 dakikalık dengeleme periyodu ardından endotelli damarlar 10^{-6} M FE kastırılarak sodyum nitroprusid (SNP) 10^{-10} M- 10^{-5} M kümülatif dozlarına verdiği gevşeme yanıtları kaydedilmiştir.

Endotelsiz aort halkalarında 40 dakika yıkama süresi sonrası banyolar kalsiyumsuz ve Ca^{+2} şelatörü EGTA (0,01 mM) içeren krebs ile doldurularak 15 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda 10^{-5} M FE ile kasılma cevapları alınmış daha sonra 2,5 mM Ca^{+2} eklenerek yine kasılma cevapları kaydedilmiştir.

3.8. Biyokimyasal İncelemeler

3.8.1. Plazmada NO ölçümü

Ependorfa plazma veya standartlar konulmuş üzerine ZnSO_4 ve NaOH eklenerek karıştırılmıştır. 13 000 g'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant alınarak enfluent CuSO_4 ile kaplanmış kadmiyum granülleri ve glisin tamponu ile 30 dakika çalkalanmıştır. 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna hazırlanan çözelti ve reaktifler (N-naftiletilediamin ve Sülfanilik asit) eklenerek 10 dakika inkübasyon yapılmıştır. Spektrofotometrede 546 nm'de absorban değerleri okunmuştur. Standart eğri için sodyum nitrit kullanılmıştır.

3.8.2. Plazmada total antioksidan kapasite ölçümü

96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna, örnek plazma veya standart konulmuş üzerine Kuprik Amonyum Klorür, Neokuproin ve Amonyumasetat tamponu eklenmiştir. 15 dakika inkübe edilmiştir. Spektrofotometrede 455 nm'de absorban değerleri okunmuştur. Standart eğri için, Trolox kullanılmıştır.

3.9. Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi

3.9.1. Doku homojenizasyonu

Torasik aort dokuları tartılarak tüplere alındı. Homojenizasyon tamponu eklenerek doku parçalayıcı yardımıyla homojenize edildi. 800 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısımları alınarak protein analizleri için -80°C'de saklandı.

3.9.2. Protein miktar tayini

Elde edilen homojenatlardaki protein miktarlarını belirlemek için "Lowry Yöntemi" kullanıldı. 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna örnek homojenat veya standart ardından ACR (Alkaline Copper Reagent) reaktifi konularak 10 dakika karanlıkta bekletildi. Folin reaktifi eklenerek 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Spektrofotometrede 660 nm'de absorbans değerleri okundu ve protein konsantrasyonları hesaplandı. Standart eğri için BSA kullanıldı.

3.9.3. Western blot analizi

Homojenatlar 1:1 oranında yükleme tamponu ile karıştırılarak 5 dakika 95 °C'de inkübe edilmiştir. Örnekler, hazırlanan SDS-poliakrilamid jeldeki çukurlara her bir doku örneğinden total protein miktarı 50 µg olacak şekilde yüklenmiştir. Bax ve Bcl2 proteinleri için % 12'lik, PERK, p-PERK, SERCA2 ve IP3R proteinleri için % 10'luk jel kullanılmıştır. Elektroforez işlemi (200 V) ile proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanmıştır. Daha sonra jel üzerindeki proteinlerin PVDF membrana transferi sağlanmıştır. Transfer işlemi için, blotlama kasetlerinin üzerine sırasıyla transfer tamponu ile ıslatılmış pedler, membran, jel ve ıslatılmış pedler yerleştirilerek kaset kapatılmıştır. Kasetler Bio-Rad Trans-Blot Turbo transfer sistemine yerleştirildikten sonra 25 V, 1 A'lık akım ile 45 dakika boyunca blotlamaya bırakılmıştır.

Transfer işlemini sonunda membranlar TBS-T çözeltisine alınmış daha sonra %5'lik yağsız süt tozu (TBS-T içerisinde), p-PERK için ise %3'lük BSA çözeltisinde, 1 saat oda ısısında, çalkalayıcı üzerinde bloklama işlemi yapılmıştır. Bloklama sonrası membranlar 5'er kez 5 dakika TBS-T çözeltisi ile çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Membranlar 1:100 oranında dilüe edilmiş primer antikolar ile gece boyunca inkübe edilmiştir ve sonrasında

5'er kez 5 dakika boyunca TBS-T ile çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Daha sonra, membranlar uygun sekonder antikor (1:10 000 oranında dile edilerek) ile 1 saat inkübe edildikten sonra 5'er kez 5 dakika boyunca TBS-T ile çalkalayıcı üzerinde yıkanmış ve görüntüleme işlemine geçilmiştir.

Membranlar ECL görüntüleme solüsyonu ile muamele edilmiş ve membranda kemiluminesans ışması sonucu ilgili proteine ait bantlar "Bio-Rad Chemi Doc MP Imaging Sistemi" kullanılarak görüntülenmiştir.

Daha sonra membranlar TBS-T ile yıkanmış ve 1:2000 oranında dile edilmiş GAPDH primer antikoru ile 2 saat inkübe edilmiştir. 5'er kez 5 dk yıkanan membranlar sekonder antikorla (1:10 000 dile) 1 saat inkübe edildikten sonra 5 kez yıkanarak görüntüle işlemi yapılmıştır.

Image Lab programı ile bantların optik dansiteleri hesaplanmıştır. Protein bantlarının dansiteleri GAPDH bantlarının dansitelerine oranlanmıştır.

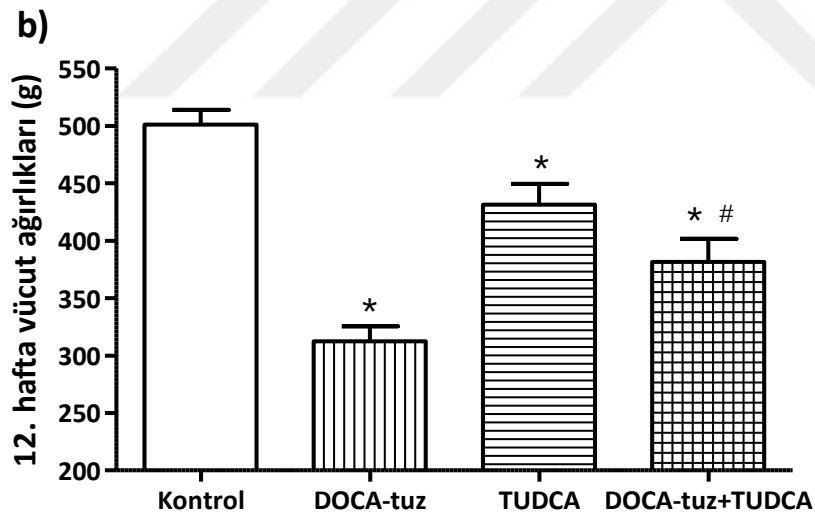
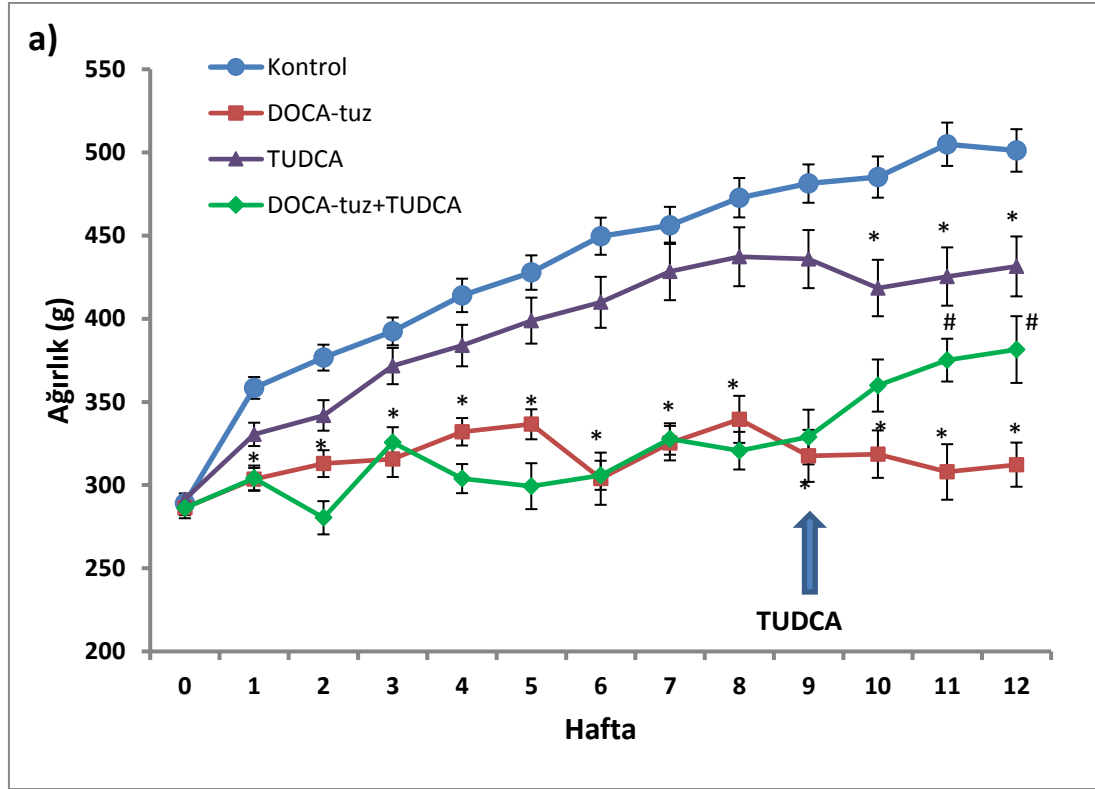
3.10. İstatistiksel Analiz

Tüm sonuçlar ortalama±ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde gösterilmiştir. İzole organ banyosu deneylerinden elde edilen torasik aort gevşeme yanıtları prekontraksiyonda kullanılan fenilefrin (10^{-6} M) kasılmaların yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Kasılma cevapları ise mN cinsinden hesaplanarak ifade edilmiştir. Kan basıncı ve doz-cevap eğrilerinin değerlendirilmesinde "Ardışık iki yönlü varyans analizi" (Repeated two-way ANOVA) ve posthoc Bonferroni testi kullanılmıştır. EC_{50} ve E_{max} değerlerinin, biyokimyasal sonuçlarının ve protein ekspresyonu sonuçlarının istatistiksel analizinde Student t testi kullanılmıştır. $P<0,05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Analizde "GraphPad Prism 5.01" (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Amerika) istatistik programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

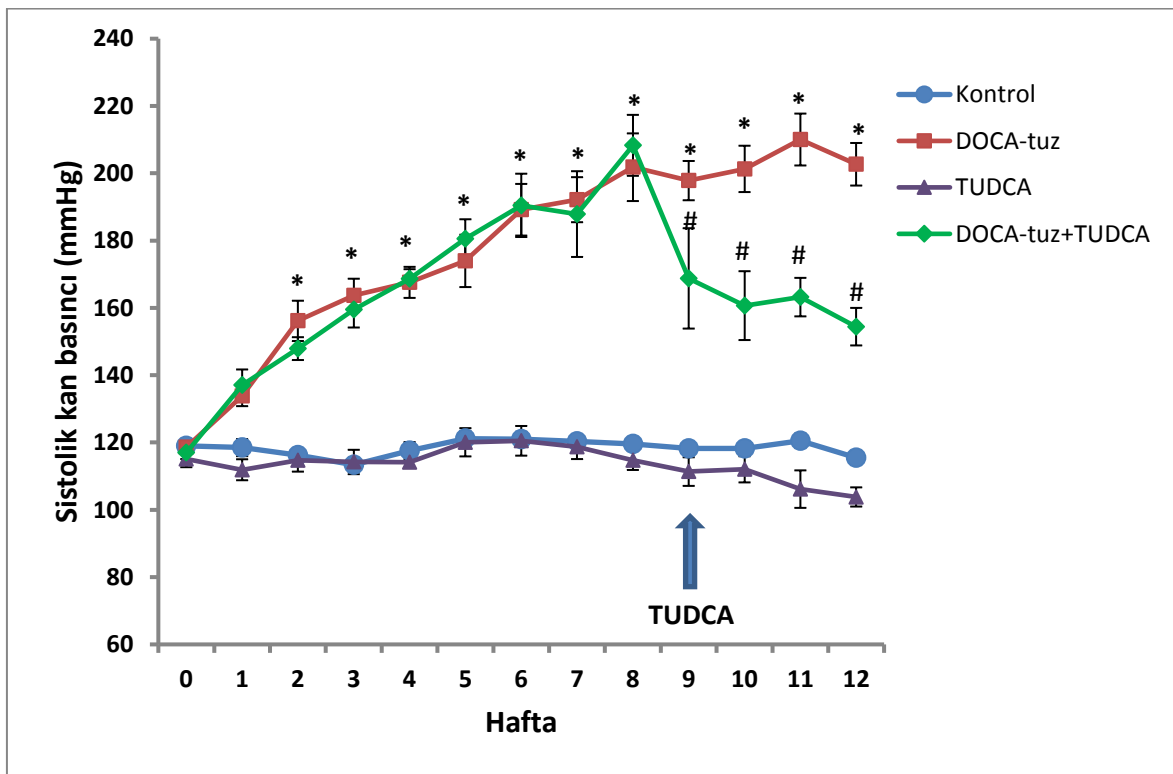
Sıçanların vücut ağırlıkları 12 hafta boyunca haftada bir kez ölçülerek kaydedilmiştir. Başlangıç vücut ağırlıkları tüm deney gruplarında fark göstermemektedir. Hipertansif hayvanlarda vücut ağırlıklarının ilk haftadan itibaren kontrole göre anlamlı olarak düşük olduğu gözlenmiştir. TUDCA uygulamasının normotansif hayvanlarda vücut ağırlıkları artışını engellediği, hipertansif hayvanlarda ise vücut ağırlıklarını anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.1.).





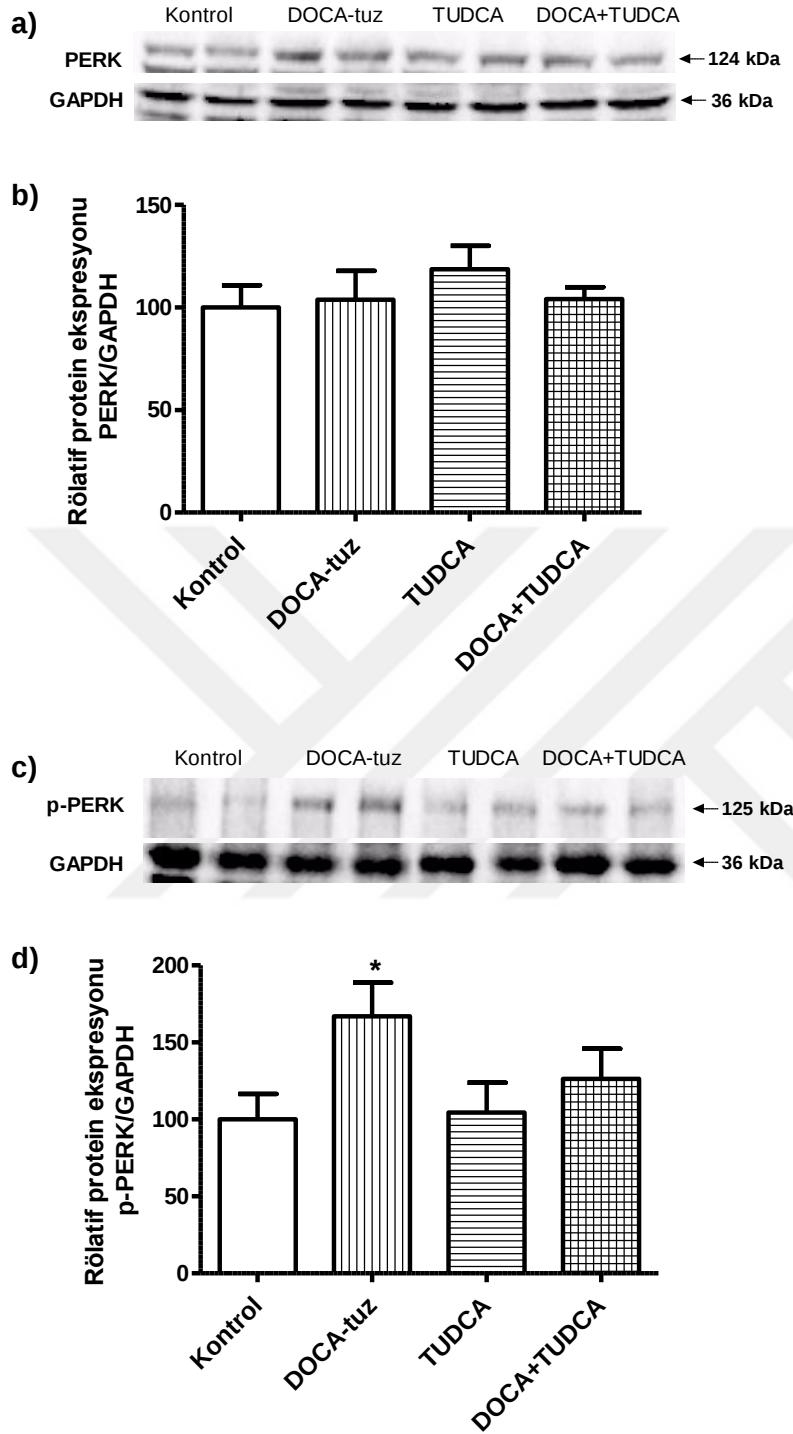
Şekil 4.1. Hayvanların vücut ağırlıklarının deney süresince değişimleri. 12 hafta boyunca ve son haftada vücut ağırlıkları. TUDCA uygulaması normotansiflerde vücut ağırlığını azaltırken, hipertansiflerde artırmıştır. *Kontrolde farklı, #DOCA-tuz'dan farklı (n=6-8)

Sıçanların kan basınçları “tail-cuff” yöntemi ile haftada bir kez ölçülerek takip edilmiştir. DOCA-tuz uygulamasının 2. haftasından itibaren sistolik kan basınçlarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Tek başına TUDCA enjeksiyonunun normotansif sıçanların kan basınçları üzerinde bir etkisi olmamıştır. DOCA-tuz+TUDCA grubunda son 4 haftalık TUDCA uygulaması (150 mg/kg/gün, i.p.) yapılmıştır. TUDCA uygulamasının başlangıcından bir hafta sonra kan basınçları ölçülmüş ve TUDCA uygulamasının ilk haftadan itibaren kan basıncında anlamlı bir düşüşe neden olduğu bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.2.).



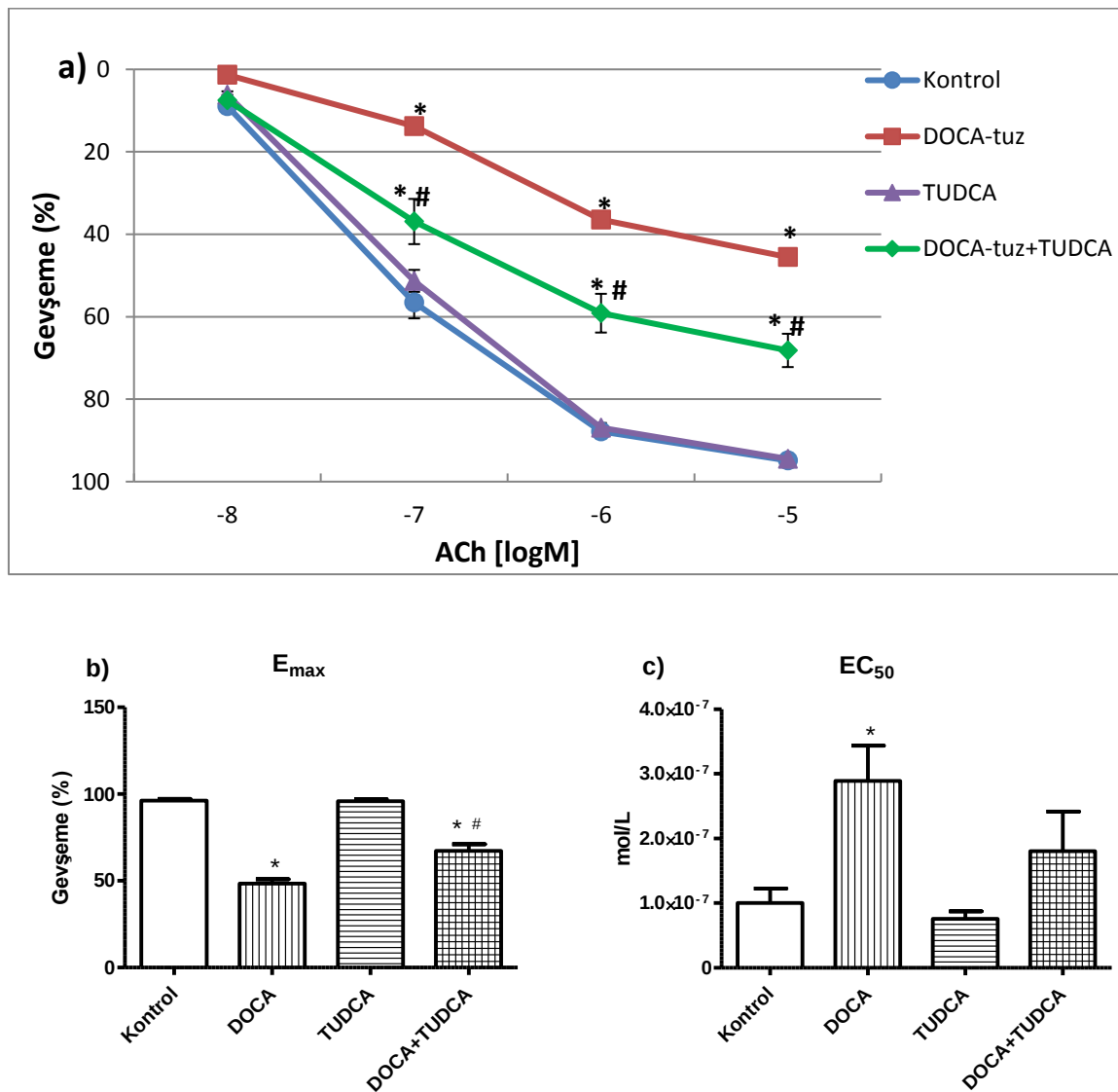
Şekil 4.2. TUDCA ile ERS inhibisyonunun sistolik kan basıncı üzerindeki etkisi. Sistolik kan basıncı DOCA-tuz uygulamasının ikinci haftasından itibaren artarken, TUDCA uygulamasıyla düşmüştür. *Kontrolde farklı, #DOCA-tuz'dan farklı ($n=6-8$)

Torasik aorta örneklerinde ERS belirteci olarak PERK ekspresyonları incelenmiştir. Total PERK ekspresyon seviyeleri arasında gruplararası anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.3.). PERK'in aktif hali olan pPERK ekspresyonları ise, hipertansif grupta artmış ve TUDCA tedavisi bu artışı geri çevirmiştir ($p<0,05$). Normotansif sıçanlarda ise TUDCA uygulaması ekspresyon seviyelerini değiştirmemiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. TUDCA ile ERS inhibisyonunun PERK ve pPERK protein ekspresyonları üzerindeki etkisi ve örnek bantlar. PERK ekspresyonları gruplar arası fark göstermemiştir. p-PERK ekspresyonları hipertansiflerde artarken TUDCA tedavisi ile azalmıştır. *Kontrolden farklı (n=6)

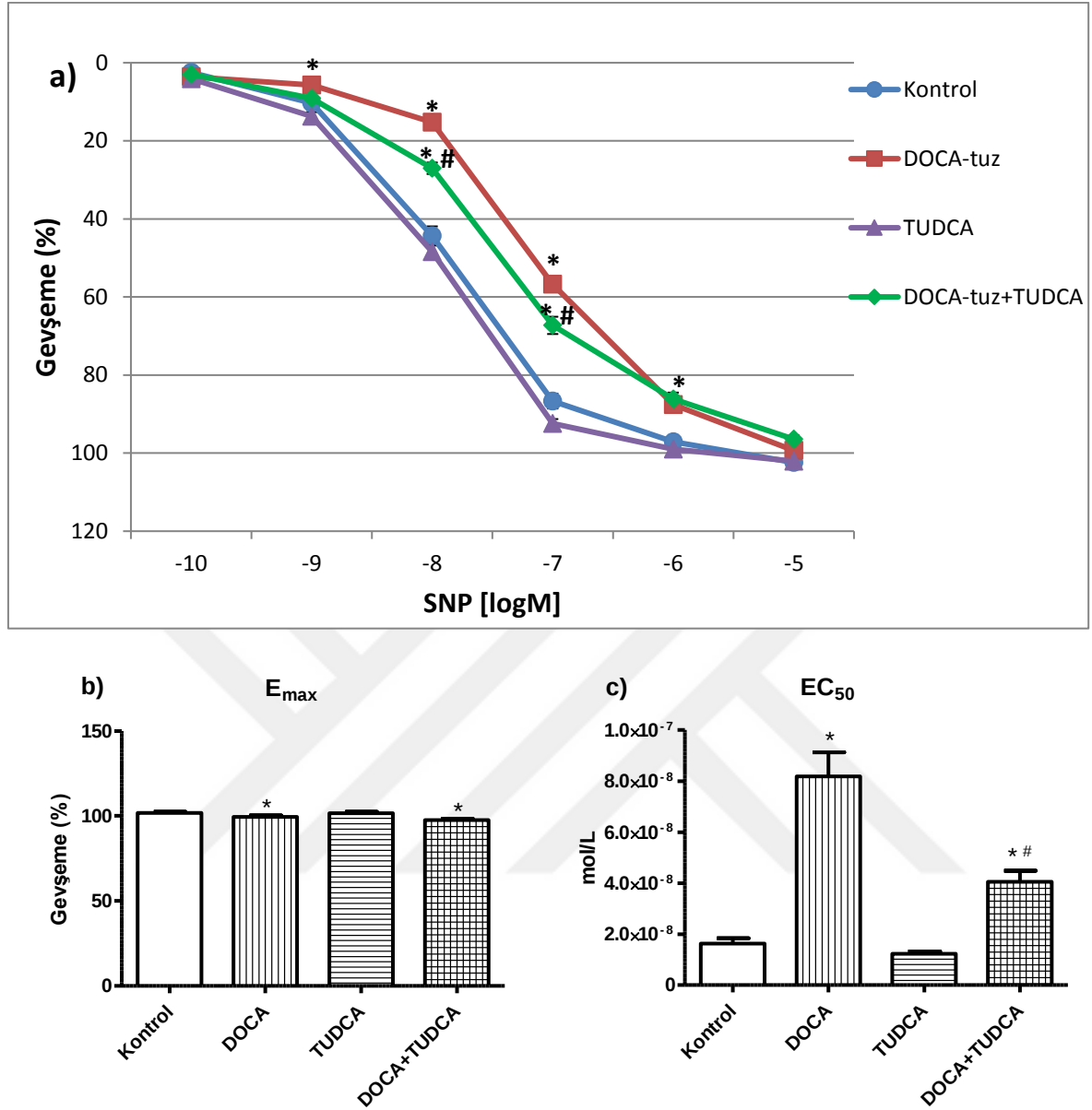
Sıçanlardan izole edilen torasik aortların endotel-bağımlı ACh gevşeme cevapları kaydedilmiş ve hipertansif grupta cevapların kontrole göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p<0,05$). TUDCA tedavisi ise hipertansif hayvanlarda azalmış olan endotel-bağımlı gevşeme cevaplarında anlamlı bir düzelme sağlamıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.4.). EC_{50} ve E_{max} değerleri ACh doz-cevap eğrilerinden hesaplanmıştır. E_{max} değerleri DOCA-tuz grubunda azalmış, TUDCA tedavisi ile anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.4.). Hipertansif sıçanlarda EC_{50} değerinin ise anlamlı olarak yükseldiği, TUDCA uygulamasının bu artışı geri çevirdiği bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. TUDCA ile ERS inhibisyonunun endotele bağımlı gevşeme cevapları üzerindeki etkisi. Doz-cevap eğrileri, E_{max} ve EC_{50} değerleri. ACh ile uyarılan gevşeme yanıtları hipertansif grupta azalırken, TUDCA tedavisi sonrası artmıştır. *Kontrolde farklı, #DOCA-tuz'dan farklı (n=6-8)

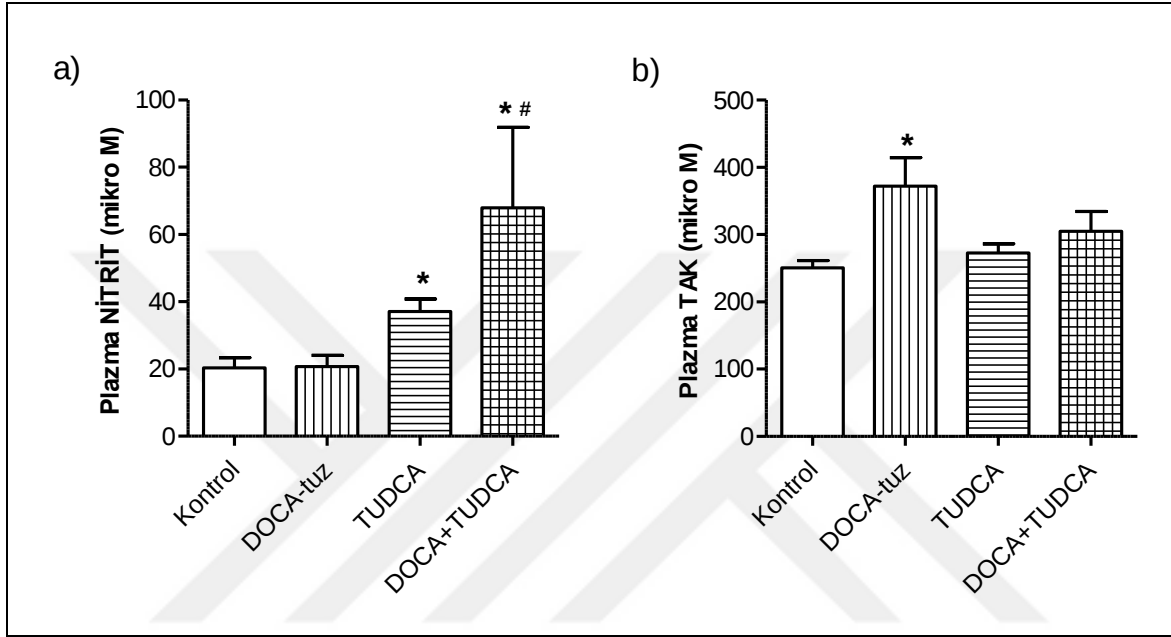
Endotelden bağımsız SNP gevşeme cevaplarında ise hipertansif gruplarda azalma gözlenmiştir. TUDCA tedavisi hipertansif sıçanlarda düşük doz SNP ile oluşan gevşemeleri artırmıştır. Normotansif hayvanlarda da TUDCA'nın düşük doz SNP ile oluşan gevşeme cevaplarını artırdığı bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.5.). EC_{50} ve E_{max} değerleri SNP doz-cevap eğrilerinden hesaplanmıştır. E_{max} değerlerinin hipertansif sıçanlarda azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.5.). EC_{50} değerleri hipertansif grupta artarken TUDCA uygulaması anlamlı bir azalma sağlamıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.5.).





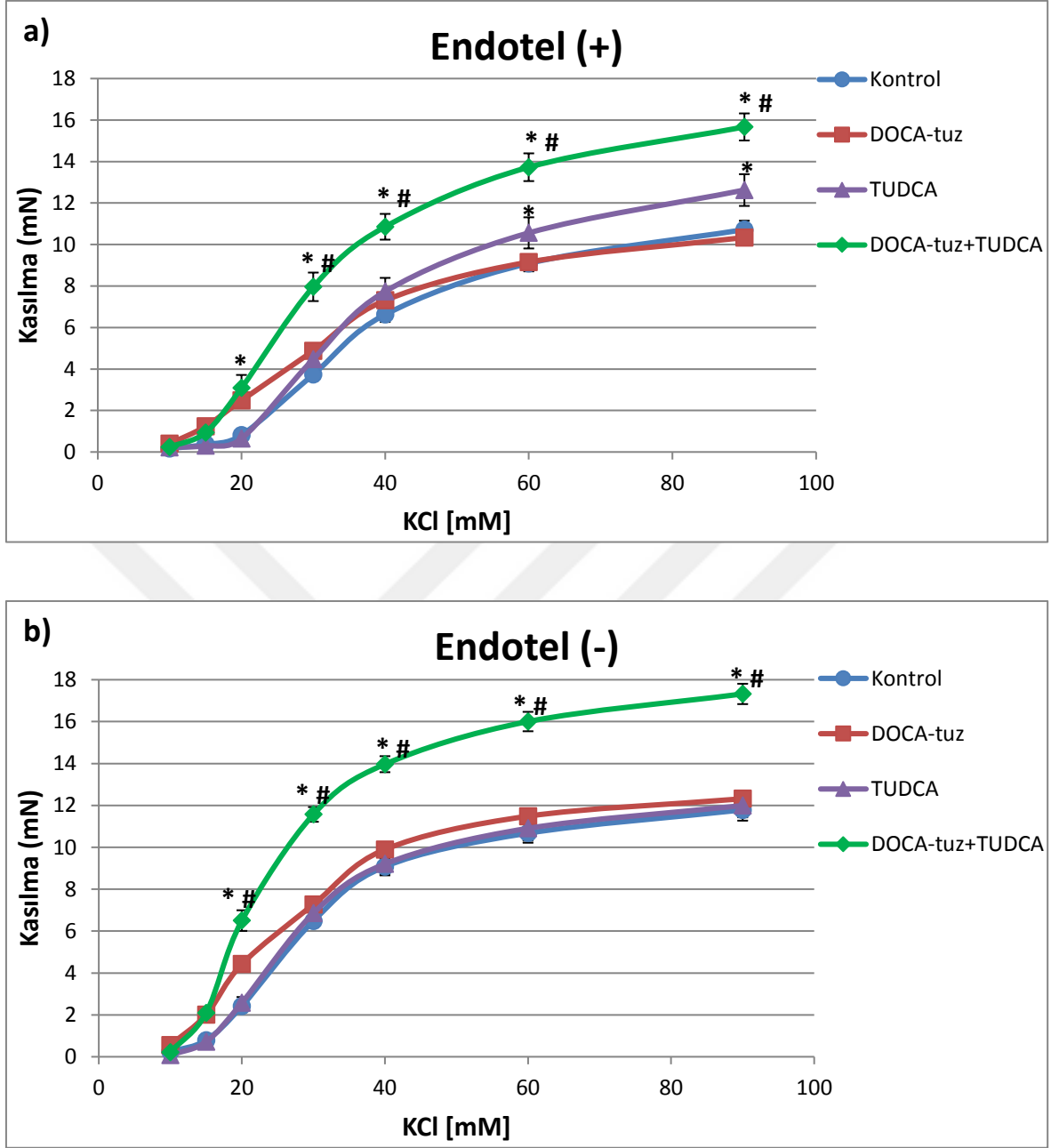
Şekil 4.5. TUDCA ile ERS inhibisyonunun endotelden bağımsız gevşeme cevapları üzerindeki etkisi. Doz-cevap eğrileri, E_{max} ve EC₅₀ değerleri. SNP ile uyarılan gevşeme cevapları hipertansif grupta azalırken, TUDCA tedavisi maksimum cevabı değiştirmemiş fakat EC₅₀ değerini düşürmüştür. *Kontrolден farklı, #DOCA-Tuz'dan farklı (n=6-8)

Sıçanlardan alınan plazma örneklerinde DOCA-tuz hipertansif sıçanlarda NO seviyelerinin değişmediği gözlenmiştir. Ayrıca TUDCA uygulamasının, hem normotansif hem de hipertansif sıçanlarda NO düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.6.). Plazma TAK düzeyleri ise hipertansif hayvanlarda anlamlı olarak artmış, TUDCA uygulamasıyla kontrol değerlerine dönmüştür ($p<0,05$) (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. TUDCA ile ERS inhibisyonunun plazma NO ve TAK derişimlerine etkisi. TUDCA uygulaması hem normotansif hem de hipertansiflerde plazma nitrit seviyelerini artırmıştır. TAK seviyeleri hipertansif sıçanlarda artmış, TUDCA uygulamasıyla azalmıştır. *Kontrolde farklı, #DOCA-tuz'dan farklı (n=6-8)

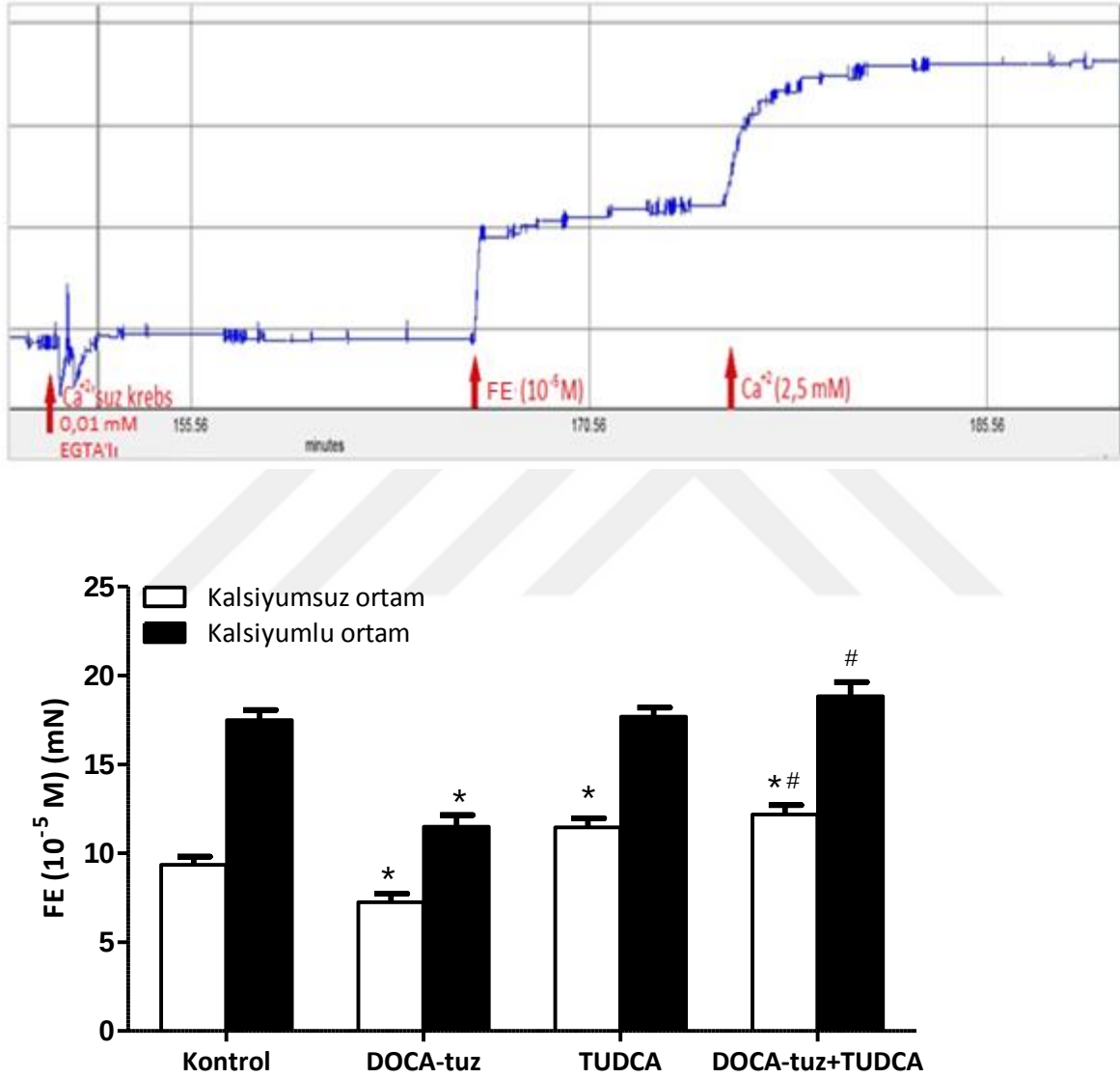
TUDCA uygulaması, KCl kasılma cevaplarını hem normotansif hem de hipertansif sıçanların endoteli sağlam torasik aortlarında artırmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.7.). Endotelsiz torasik aortlarda ise kasılma yanıtlarının TUDCA uygulanan hipertansif grupta diğer gruplara göre daha fazla olduğu bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. TUDCA ile ERS inhibisyonunun KCl kasılma cevaplarına etkisi. TUDCA uygulaması hipertansif grupta hem endotelli hem de endotelsiz damarlarda kasılma cevaplarını artırmıştır. *Kontrolde farklı, # DOCA-tuz'dan farklı (n=6-8)

Damar düz kasının FE uyarısı ile oluşan kasılması, hem ER kalsiyum depolarından salıverilen hem de hücre dışından giren kalsiyumuna bağlıdır. Kasılma için gereken kalsiyumu sağlayan bu iki kaynağın katkılarını gözlemek amacıyla, FE kasılma cevapları kalsiyumsuz ve ortama kalsiyum eklenerek kaydedilmiştir. Endotelsiz izole damar halkaları kalsiyumsuz ortamda (10^{-5} M EGTA içeren) 10^{-5} M FE ile uyarılmış ardından ortama 2,5 mM kalsiyum eklenerek hücre dışı kalsiyumun etkisi incelenmiştir. Kalsiyumlu

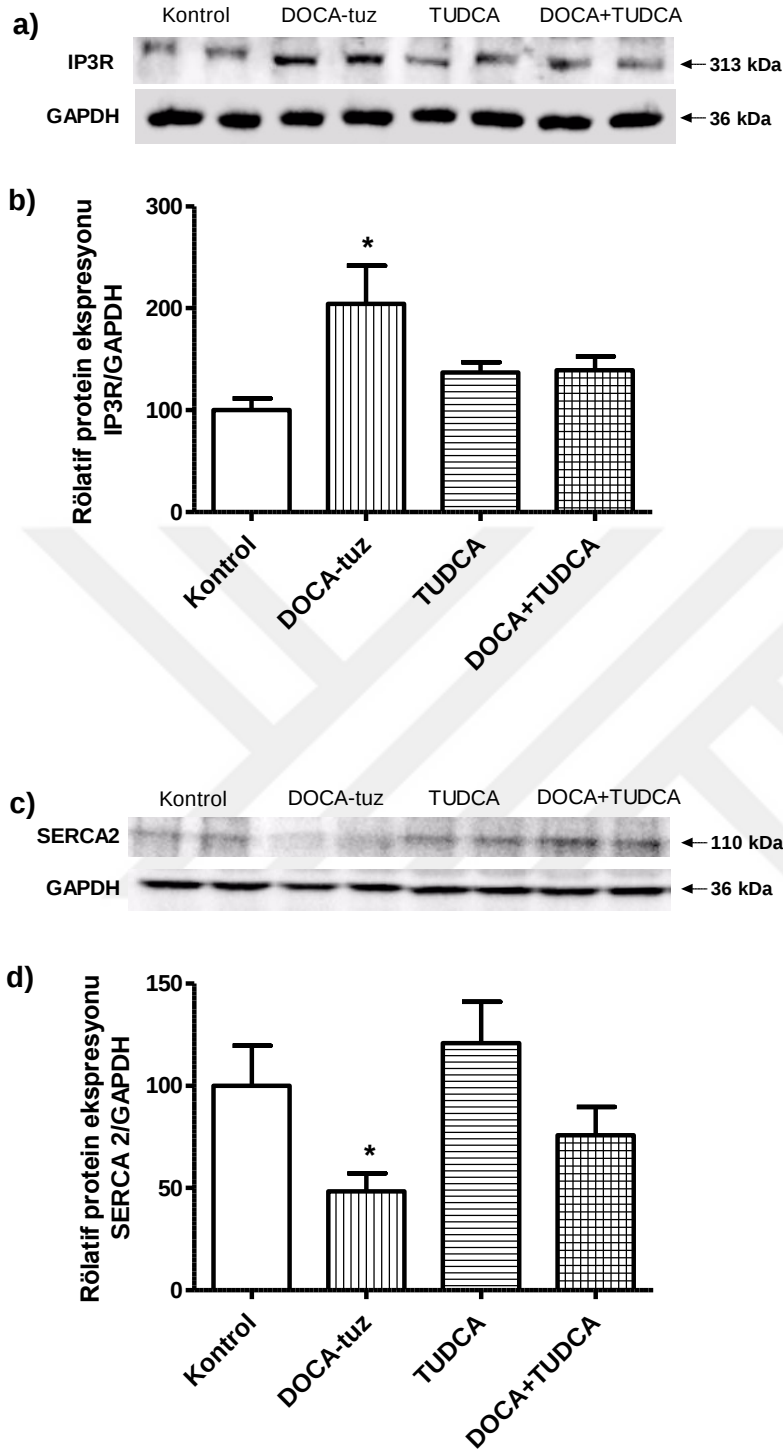
ve kalsiyumsuz ortamda alınan FE (10^{-5} M) kasılma cevaplarının DOCA-tuz grubunda kontrole göre anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.8.). TUDCA uygulaması, kalsiyumsuz ortamdaki FE kasılmalarını hem hipertansif hem de normotansif sıçanlarda arttırmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.8.). TUDCA hipertansif grupta dışarıdan eklenen kalsiyumla oluşan kasılmalarındaki azalmayı da geri çevirmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. TUDCA ile ERS inhibisyonunun FE kasılma cevaplarına etkisi, Kalsiyumsuz ve kalsiyumlu ortamda kasılma cevapları ve örnek trase. Hipertansif sıçanlarda kasılma cevapları azalmış, TUDCA tedavisi hem kalsiyumlu hem de kalsiyumsuz ortamda kasılmaları artırmıştır. *Kontrolde farklı, #DOCA-tuz'dan farklı (n=6-8)

FE uyarısı sonucu hücre içinde artan ikinci haberci IP₃, ER’de bulunan ve bir kalsiyum kanalı olan IP₃R’yi aktive ederek, ER’den kalsiyum salıverilmesine neden olmaktadır. Sıçan torasik aorta örneklerinde, IP₃R protein ekspresyonlarının hipertansif hayvanlarda anlamlı olarak arttığı, TUDCA tedavisinin ekspresyon seviyesini azalttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Normotansif hayvanlarda TUDCA uygulaması IP₃R ekspresyonunu değiştirmemiştir (Şekil 4.9.).

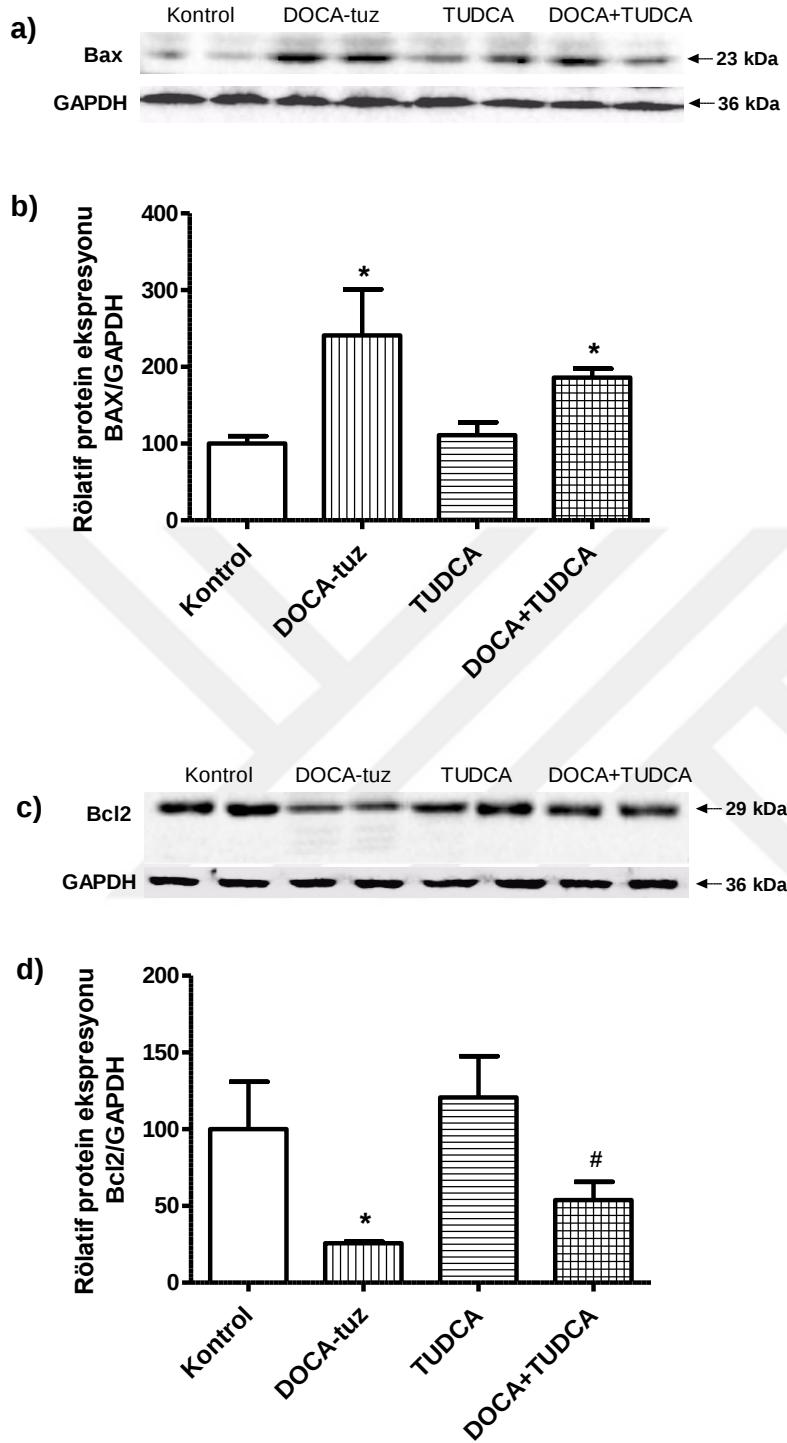
Damar düz kasında sitozolde artan kalsiyumu ER’ye yeniden pompalayan kalsiyum pompası SERCA2’dir. SERCA2 ekspresyon seviyelerinin DOCA-tuz grubunda kontrole göre anlamlı olarak azaldığı, TUDCA uygulaması ile artarak kontrol seviyelerine döndüğü bulunmuştur ($p<0,05$). Normotansif hayvanlarda ise TUDCA bir değişime neden olmamıştır (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. TUDCA ile ERS inhibisyonunun IP3R ve SERCA2 protein ekspresyonları üzerindeki etkisi ve örnek bantlar. IP3R ekspresyonları hipertansif sıçanlarda artmış, TUDCA tedavisi bu artışı önlemiştir. SERCA2 ekspresyonları hipertansiflerde azalırken TUDCA tedavisi ile artmıştır. *Kontrolden farklı (n=6)

Proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl2 proteinleri, kronik ER stres altında uyarılan apoptozun kontrolünde önemli rol oynamaktadırlar. Çalışmamızda sıçan torasik aort örneklerinde Bax protein ekspresyonlarının hipertansif hayvanlarda anlamlı olarak arttığı bulunmuştur ($p<0,05$). TUDCA uygulaması, Bax ekspresyonlarında hem normotansif hayvanlarda hem de hipertansif hayvanlarda bir değişime neden olmamıştır (Şekil 4.10.). Bcl2 protein ekspresyon seviyesi ise hipertansif hayvanlarda azalmış, TUDCA tedavisi bu azalmayı anlamlı olarak artırmıştır ($p<0,05$) normotansif sıçanlarda TUDCA uygulamasıyla bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.10.).





Şekil 4.10. TUDCA ile ERS inhibisyonunun Bax ve Bcl2 protein ekspresyonları üzerindeki etkisi ve örnek bantlar. Bax ekspresyonları hipertansif gruplarda artmıştır. Bcl2 ekspresyonları hipertansiflerde azalmış, TUDCA tedavisi ile artmıştır. *Kontrolden farklı, #DOCA-tuz'dan farklı (n=6)

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında ilk kez DOCA-tuz hipertansiyonda, TUDCA ile ERS inhibisyonunun artmış kan basıncını azalttığı; endotel işlev bozukluğunda iyileşme sağladığı ve torasik aortanın bozulmuş kasılma ve gevşeme yanıtlarını düzelttiği; aortta hipertansiyonda değişen SERCA2 ve IP3R ekspresyonlarını düzelttiği ve antiapoptotik etki gösterdiği ortaya konmuştur.

Hipertansiyon, sistemik arteriyel kan basıncının yükselmesi ile karakterize bir kalp damar hastalığıdır (Kayaalp, 2005: 357). Dünya çapında 1 milyardan fazla insanı etkileyen ve en yaygın görülen kronik hastalıklardan biridir (Coffman, 2011). Hipertansiyon oldukça karmaşık bir patogeneze sahiptir ve moleküler etiyojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

ERS, ER işlev kapasitesini aşan fizyolojik veya patolojik durumlarda ER lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikmesi olarak tanımlanmaktadır (Kaufman, 1999). Redoks dengesindeki değişimler, kalsiyum homeostazındaki değişimler, hipoksi, genel protein sentezinin artması ve posttranslasyonel modifikasyonlarda bozukluk gibi patofizyolojik hasarlar ER’de katlanmamış protein birikimine ve ERS’e yol açmaktadır (Kitamura, 2008). ERS kardiyovasküler hastalıklardan, nörodejenerasyon, kanser, diyabet ve kas dejenerasyonuna kadar pek çok hastalığın patogenezinde önemli rol oynar. İlk olarak Young ve diğerleri (2012) özellikle beyindeki ERS’nin, kronik hipertansiyonda anahtar rol oynadığını göstermiştir. Böylece ERS ile ilişkili hastalıklar arasına hipertansiyon da katılmış ve sonraki çalışmalarda, farklı hipertansiyon modellerinde ERS’in rolü araştırma konusu olmuştur (Kassan ve diğerleri, 2012; Liang ve diğerleri, 2013; Spitler, Matsumoto ve Webb, 2013; Spitler ve Webb, 2014; Lenna, Han ve Trojanowska, 2014; Takayanagi ve diğerleri, 2015).

ERS’in lipid, glikoz ve enerji metabolizmasını da etkilediği ortaya konmuştur (Ozcan ve diğerleri, 2004; Zhao ve diğerleri, 2013; Guo ve diğerleri, 2015). Guo ve diğerleri (2015) TUDCA’nın yüksek yağ içerikli diyet alan farelerde kilo alımını engellediğini göstermişlerdir. Çalışmamızda kullanılan hayvanların vücut ağırlıkları haftalık olarak izlenmiş ve hipertansif hayvanlarda ilk haftalardan itibaren düşük seyrettiği bulunmuştur. TUDCA uygulaması ise hipertansif hayvanlarda vücut ağırlığını artırırken, normotansif

hayvanlarda ağırlık artışını engellediği gözlenmiştir. Lipid, glikoz ve enerji metabolizmasındaki değişimler, vücut ağırlığını doğrudan etkilemektedir. TUDCA ile ERS inhibisyonun, hayvanların vücut ağırlıkları üzerindeki etkilerine lipid, glikoz ve enerji metabolizmasını düzenleyici aktivitelerinin aracılık ettiği düşünülebilir. Fakat bu etkinin açıklanması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

TUDCA ile ERS inhibisyonunun anjiyotensin II ile indüklenmiş hipertansiyonda (Kassan ve diğerleri, 2012; Spitler ve Webb, 2014) ve spontan hipertansif sıçanlarda (Spitler, Matsumoto ve Webb, 2013) kan basıncında anlamlı bir azalmaya neden olduğu daha önce bildirilmiştir. Çalışmamızda ilk kez, TUDCA ile ERS inhibisyonun DOCA-tuz hipertansif sıçanlarda da kan basıncını anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir.

ER lümende katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi sonucu oluşan ERS, UPR adı verilen adaptif bir programı aktive etmektedir (Rutkowski ve Kaufman, 2004). Memeli hücrelerinde, UPR üç adet ER transmembranal reseptörün aracılık ettiği kompleks bir sinyalleme programıdır. Bunlar: ATF6, IRE1 ve PERK'dir. ERS durumunda, ER'de GRP78/PERK kompleksi ayrılır ve otofosforilasyona uğrar. Sonuç olarak PERK'in aktif hali pPERK oluşur (Cui, Li, Ron ve Sha, 2011). Hipertansif hayvanların aortlarında PERK ekspresyonlarının değişmediği gösterilmiştir (Galán ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda da torasik aortta PERK ekspresyon seviyeleri arasında gruplar arası anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bir ERS belirteci olan pPERK'in ekspresyon seviyesi ise hipertansif grupta artarken, TUDCA verilmesi bu artışı geri çevirmiştir. Sonuçlar doğrultusunda, hipertansiyonda torasik aortta ER stresin arttığı, TUDCA tedavisinin ERS artışını inhibe ettiği görülmektedir.

Endotel kan damarlarının en iç yüzeyini kaplayan, vasküler tonusun ve yapının düzenlenmesinde önemli rol oynayan tek katlı ince bir epitel tabakasıdır (Giannotti ve Landmesser, 2007). Endotel işlev bozukluğunun hipertansiyon ve diğer pek çok hastalığın patogeneğinde yer aldığı bilinmektedir. Hem insanlarda hem de çeşitli hayvan hipertansiyon modellerinde bu hastalığa bağlı olarak gelişen endotel işlev bozukluğu gösterilmiştir (Han ve diğerleri, 2015; Nakano ve diğerleri, 2003; Galisteo ve diğerleri, 2004a; Vera ve diğerleri, 2007; Gumanova ve diğerleri, 2007; Tang ve Vanhoutte, 2010). Vasküler endotel hücreleri oldukça dinamik ve yüksek miktarda protein sentezlenen metabolik olarak aktif hücrelerdir, bu durum ERS'ye ortam hazırlamaktadır. ERS ile

endotel işlev bozukluğu ilişkisine işaret eden çalışmalar bulunmaktadır (Civelek, Manduchi, Riley, Stoeckert ve Davies, 2009; Galán ve diğerleri, 2014; Matsumoto ve diğerleri, 2016). ERS'in in vivo endotel hücrelerinde, eNOS ekspresyonu ve aktivasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Galán ve diğerleri, 2014). Fakat ERS'in endotel işlev bozukluğundaki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. TUDCA ile ERS inhibisyonun, anjiyotensin II verilen hipertansif farelerde endotel işlev bozukluğunu iyileştirdiği (Kassan ve diğerleri, 2012); fare aortunda tunikamisin ile indüklenen endotel işlev bozukluğunu önlediği (Choy ve diğerleri, 2016); SHR'de mezenterik arterlerde endotel bağımlı gevşemeleri artırdığı (Carlisle ve diğerleri, 2016) gösterilmiştir. ACh ile indüklenen endotel bağımlı NO aracılı gevşeme cevapları endotel işlevinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda önceki araştırmalarla uyumlu olarak, hipertansif sıçanlarda endotel bağımlı gevşeme cevaplarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Ek olarak, ERS inhibisyonunun DOCA-tuz hipertansiyonda gözlenen endotel işlev bozukluğunu üzerindeki iyileştirici etkisi ilk kez ortaya konmuştur. Bu sonuçlar TUDCA ile ERS inhibisyonunun, DOCA-tuz hipertansiyonda gösterdiği antihipertansif etkide, bozulan endotel işlevlerini düzeltmesinin rolü olduğunu düşündürmektedir.

Çeşitli hipertansiyon modellerinde, damarlarda SNP ile indüklenen endotelden bağımsız gevşeme cevaplarının da azaldığı gözlemlenmiştir (Ajay, Achike ve Mustafa, 2007; Oloyo, Sofola ve Yakubu, 2016). Ayrıca SNP gibi NO donörlerinin, hipertansif sıçan aortlarında, normotansif sıçan aortuna göre daha az gevşeme oluşturduğu gösterilmiştir (Bonaventura, de Lima, da Silva ve Bendhack, 2011). Çalışmamızda DOCA-tuz hipertansif sıçan aortlarında SNP ile indüklenen endotel bağımsız gevşeme cevaplarının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda TUDCA uygulamasının hipertansif sıçanlarda maksimum gevşeme yanıtlarını değiştirmediği fakat EC_{50} değerini anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir. Endotelden bağımsız SNP gevşeme yanıtlarındaki azalmaya, vasküler düz kasın NO-sGMP sinyalleme yolağı ile oluşan gevşemeye karşı duyarlılığının değişmesinin neden olabileceği düşünülmektedir. NO-sGMP aktivasyonundaki bozulmanın gevşemenin azalmasına neden olduğu öne sürülmüştür (Oloyo, Sofola ve Yakubu, 2016). Ayrıca hipertansiyonda, SNP ile indüklenen vasküler düz kas gevşemelerinde SERCA aktivasyonun ortadan kalktığı ve bunun gevşemede azalmaya yol açtığı bulunmuştur (Bonaventura, de Lima, da Silva ve Bendhack, 2011). ERS inhibisyonunun SNP ile indüklenen gevşemeler üzerindeki olumlu etkisine bu mekanizmalar aracılık ediyor olabilir.

Endotel kaynaklı NO düzeyleri endotelial işlevin ana göstergesi olarak kabul edilmektedir. Fakat çeşitli hastalık durumlarında NO endotel dışındaki hücrelerde de üretilmektedir. Hipertansiyon patofizyolojisinde rol oynayan inflamasyon, immün hücrelerden NO salımına neden olmaktadır (Montecucco, Pende, Quercioli ve Mach, 2011). NO sentezini endotel hücrelerinde eNOS enzimi ile katalize edilir. iNOS ise sitokinler gibi proinflamatuvar uyarı ile fagositik hücrelerde eksprese edilir ve NO üretimine neden olur (Govers ve Rabelink, 2001). Önceki çalışmalarda, plazma NO seviyelerinin hipertansiyonda değişmediği veya azaldığı bildirilmiştir (Han ve diğerleri, 2015; Martin, Cameron ve McGrath, 2008). Biz de çalışmamızda plazma NO düzeyinin DOCA-tuz hipertansiyonda değişmediğini gözlemledik. Hipertansiyonda azalmış endotel kaynaklı NO üretimi ile birlikte inflamasyon nedeniyle immün hücre kaynaklı NO salımının arttığı ve sonuç olarak dolaşımdaki NO seviyesinin değişmediği düşünülebilir. Çalışmamızda TUDCA uygulamasının hem normotansif hem de hipertansif sıçanlarda plazma NO seviyelerini artırdığı gösterilmiştir. Yakın zamanda Galán ve diğerleri (2014) ERS'in in vivo endotel hücrelerinde, eNOS ekspresyonu ve aktivasyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, TUDCA'nın ERS inhibisyonuyla NO seviyelerini artırıcı aktivitesinin, endotel işlevi üzerindeki iyileştirici ve antihipertansif etkisinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Hipertansiyon patofizyolojisinde rolü olduğu bilinen etkenlerden biri oksidatif stresin artışıdır (Nicod ve diğerleri, 2000; Binda ve diğerleri, 2001; Shirakura ve diğerleri, 2016). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmış üretimi ve/veya bozulmuş inaktivasyonu yani oksidatif stres NO biyoyararlanımında azalmaya neden olmaktadır (Förstermann, 2010). TAK ölçümü, antioksidan savunma sisteminin farklı bileşenlerinin birlikte ölçümünü sağlayan bir yöntemdir. Bu çalışmada, plazma TAK düzeyleri DOCA-tuz hipertansif hayvanlarda artmış, TUDCA uygulamasıyla kontrol değerlerine dönmüştür. Daha önceki çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Vassalle ve diğerleri, 2004; Gawron-Skarbek ve diğerleri, 2014). TAK seviyelerindeki azalma veya artışın, patolojinin seyrine ve oksidatif strese maruziyet süresine bağlı olarak ortaya çıktığı öne sürülmektedir (Gawron-Skarbek ve diğerleri, 2014). Hipertansif hayvanlarda gözlemlediğimiz TAK artışı, uzun süreli oksidatif strese cevaben antioksidan savunma sisteminin aktivitesini artırmasına bağlı olabilir.

Vasküler düz kas kasılması, hücre içi serbest kalsiyum derişimi ve kontraktıl elementlerin kalsiyuma duyarlılığı ile düzenlenmektedir. Hücre içi serbest kalsiyum düzeyindeki artışa bağlı oluşan kasılma, kalsiyumun kalmoduline bağlanması ve kalsiyum-kalmodulin kompleksinin miyozin hafif zincir kinazı aktive ederek miyozin hafif zincirinin fosforilasyonuna yol ağmasıyla sonuçlanır. Miyozin ve aktin filamentleri arasında çapraz k opr  oluşur ve düz kas kasılması gerçekleşir. Çalışmamızda reseptör uyarılmasından bağımsız olarak, hücre içi serbest kalsiyum artışına neden olarak kasılma oluşturan KCl kullanılmıştır.  nceki araştırma sonuçlarına uygun olarak (Bockman, Jeffries, Pettinger ve Abel, 1992; Suzuki, Takata, Kubota, Ozaki ve Kato, 1994),  alışmamızda DOCA-tuz hipertansiyonun hem endoteli sağlam hem de endoteli çıkarılmış damarlarda KCl ile uyarılan kasılmaları anlamlı olarak değiştirmediği bulunmuştur. Ayrıca ilk kez, TUDCA verilen DOCA-tuz hipertansif gruplarda bu kasılmaların arttığı gösterilmiştir. Normotansif hayvanlarda ise TUDCA uygulaması endotelli damarlarda kasılma artışına neden olmuştur. KCl ile uyarılan kasılmalaradaki artmanın, L-tipi Ca^{+2} kanallarının aktivasyonunun ya da ekspresyonunun artması sonucu olabileceği gibi, vasküler cevaplılığın artması nedeniyle de oluşabileceği  ne sürülmüştür (Galisteo ve diğerleri, 2004b). Ayrıca TUDCA'nın normotansif damarlara etkisinin, endotel varlığında ve yokluğunda değişiyor olması, bu etkide endotel tabakasında rol oynadığını düşündürmektedir. Mekanizmanın aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Hücre içi serbest kalsiyum düzeyi kasılma, gevşeme ve büyüme gibi vasküler düz kasın ana işlevlerini düzenlemekte ve özel cevapları tetiklemektedir. Sitolik serbest kalsiyum derişimi sarkoplazmik retikulum, kalsiyum bağlayan proteinler ve hücre zarındaki kalsiyum kanalları tarafından ince bir şekilde ayarlanmaktadır. Hücre içinde $0,1 \mu M$ düzeyinde bulunan serbest kalsiyum derişim uyarıyla 100-200 kat artmaktadır. Bu artışı sağlayan, hücre dışı ortamdan kalsiyum kanalları aracılığıyla giriş ve ER/SR'deki depolardan IP3R ve ryanodin reseptörü ile salıverilmedir. Hücre dışında ve depolarda kalsiyum yaklaşık 3 mM derişimde bulunur ve hücre sitozolünde 10 000 kat daha düşük kalsiyum derişimini korumaya çalışır. Hipertansiyonda bu mekanizmalar önemli derecede değişmektedir. Hücre içi kalsiyum düzenlenmesindeki bozukluk, hipertansiyona bağlı gelişen vasküler işlev bozukluğunda önemli rol oynamaktadır. Arteriyel düz kasta bozulmuş kalsiyum homeostazisi, değişen kalsiyum girişi ve kalsiyum depolanması veya azalmış kalsiyum çıkışı ile ilişkili olabilmektedir (Gouloupoulou ve Webb, 2014). Damar düz kasında alfa-1 adrenoreseptör aracılı kasılma cevaplarında IP3 aracılı ER'den

kalsiyum salıverilmesi ve kalsiyum kanalları ile hücre dışından kalsiyum girişi söz konusudur. Çalışmamızda izole torasik aortlarda kaydettiğimiz, kalsiyumsuz ortamda FE ile uyarılan kasılmalar hücre içi depolardan Ca^{+2} salıverilmesini; ortama kalsiyum eklenmesi ile elde edilen kasılmalar ise hücre dışından Ca^{+2} girişini yansıtmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar incelendiğinde, kalsiyumsuz ortamda ve ortama kalsiyum eklenmesiyle alınan FE kasılma cevaplarında, DOCA-tuz grubunda kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. TUDCA uygulaması, kalsiyumsuz ortamdaki FE ile uyarılan torasik aort kasılmalarını hem hipertansif hem de normotansif sıçanlarda artırmıştır; kalsiyumlu ortamda ise sadece hipertansif sıçanlardaki kasılmalarda bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlarla DOCA-tuz hipertansiyonda, TUDCA uygulamasının hücre içi depolardan salıverilen Ca^{+2} ile oluşan FE ile uyarılan kasılmaları hem normotansif hem de hipertansif hayvanlarda artırdığı; hücre dışından Ca^{+2} girişi ile oluşan kasılmaları ise sadece hipertansif hayvanlarda artırdığı ilk kez gösterilmiştir. Bu veriler, TUDCA ile ERS inhibisyonunun hem hipertansiyonda azalan hücre içi Ca^{+2} depolarını hem de hücre dışından Ca^{+2} girişini artırdığını düşündürmektedir.

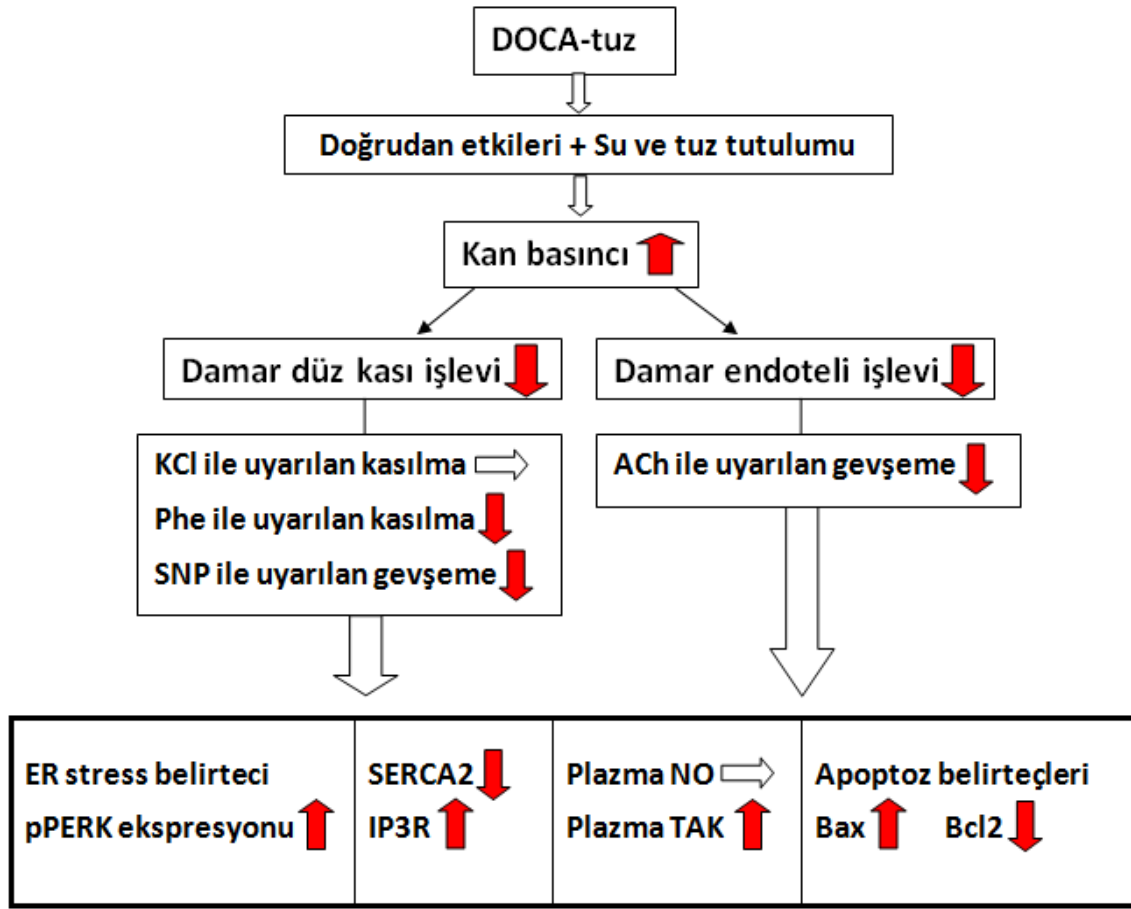
Damarlarda ER'den Ca^{+2} salıverilmesini sağlayan kalsiyum kanalı IP3R'dir. Bu kanalın aktivasyonu; sitozoldeki ve ER'deki Ca^{+2} derişimi, ATP, thiol modifikasyonu ve protein kinazlar tarafından düzenlenir (Mikoshiya, 2007). Hücre için ölüm veya yaşam kararı hücre içi kalsiyum homeostazı ve ER seviyesinde kalsiyum dinamikleri tarafından kontrol edilmektedir. IP3R, ER'den sitozole ve mitokondriye Ca^{+2} akışına aracılık ederek bu süreçlerde oldukça önemli rol oynamaktadır (Ivanova ve diğerleri, 2014). SHR'da endotel hücrelerinde, IP3R izoformlarından IP3R1 azalırken IP3R2'nin arttığı, IP3R3'ün ise değişmediği gösterilmiştir (Mountian ve diğerleri, 2001). Diğer taraftan, IP3R1 dördüncü ERS sensörü olarak öne sürülmüştür (Kiviluoto ve diğerleri, 2013). ER şaperonu GRP78 spesifik olarak IP3R1'e bağlanarak etkileşmekte ve ER strese karşı birlikte çalışmaktadırlar (Ivanova ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda IP3R reseptörlerinin ekspresyonunun hipertansif grupta arttığı, TUDCA uygulamasıyla kontrol değerlerine döndüğü gözlenmiştir. Hipertansiyonda gözlenen IP3R ekspresyonunun artışı ER Ca^{+2} depolarındaki azalmaya ikincil olarak ortaya çıkabilir. Hücre içi ER kalsiyum depolarının azalması, hücreyi ERS'ye sokmakta ve apoptoza yatkın hale getirmektedir. TUDCA'nın hipertansif sıçanların aortlarında gözlenen apoptozu azaltıcı etkisinde kısmen, IP3R ekspresyonlarının azalması da rol oynuyor olabilir.

SERCA, ER membranında bulunan P-tipi ATPaz sınıfına ait bir kalsiyum pompasıdır ve Ca^{+2} 'un ER lümeni içerisine alımından sorumludur. SERCA, depolarda Ca^{+2} birikmesi için major mekanizmayı oluşturmakta ve hücre içi serbest Ca^{+2} seviyelerinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. SERCA yoluyla Ca^{+2} sekestrasyonu düz kas, kardiyak ve iskelet kası relaksasyonuna aracılık etmekte ayrıca apoptoz ve proliferasyon gibi hücrel işlemleri düzenlemektedir (Tong, Evangelista ve Cohen, 2010). Artmış hücre içi Ca^{+2} derişiminin hipertansif hayvanlarda artan vasküler tonus ile ilişkili olduğu ve serbest Ca^{+2} miktarındaki artışın kısmen, azalmış SERCA aktivitesi sonucu olabileceği düşünülmektedir (Levitsky ve diğerleri, 1993). SHR'da endotel hücrelerinde SERCA2b mRNA ekspresyonunun kontrole göre azaldığı bulunmuştur (Mountian ve diğerleri, 2001). Diğer taraftan, SERCA2 inhibisyonu ile ER kalsiyum depolarının boşaltılması, ERS'i indüklemek için kullanılmaktadır (Lytton, Westlin ve Hanley, 1991). SERCA2a aktivitesindeki azalma sonucu oluşan, ER Ca^{+2} depolarındaki azalma, ERS'e yol açmaktadır (Mekahli, Bultynck, Parys, De Smedt ve Missiaen, 2011). Ayrıca artmış oksidatif stres durumunda SERCA işlevleri bozulmakta fakat ekspresyonu ise değişmemektedir (Tong, Evangelista ve Cohen, 2010). SERCA aktivitesi ve ekspresyonunun pek çok faktörle ilişkili olduğu görülmektedir ve hipertansiyonda SERCA ekspresyonu ve aktivitesindeki değişimler tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada ilk kez, SERCA2 ekspresyon seviyelerinin DOCA-tuz hipertansif hayvanlarda kontrole göre anlamlı olarak azaldığı, TUDCA uygulaması ile artarak kontrol seviyelerine döndüğü bulunmuştur. Normotansif hayvanlarda ise TUDCA bir değişime neden olmamıştır. Öte yandan bu bulgularla uyumlu olarak çalışmamızda, torasik aortta kalsiyumsuz ortamda FE ile uyarılan ve hücre içi depolardan salıverilen Ca^{+2} ile tetiklenen kasılmaların hipertansif sıçanlarda kontrole göre azaldığı bulunmuştur. TUDCA uygulaması ise bu kasılmaları artırmıştır. Bu sonuçlar, hipertansiyonda azalan SERCA2 ekspresyonunun, TUDCA ile ERS inhibisyonu sonucu düzeldiğini göstermektedir. Bu etki TUDCA tedavisinin hipertansiyon üzerindeki olumlu etkisinde bir diğer önemli mekanizma olabilir.

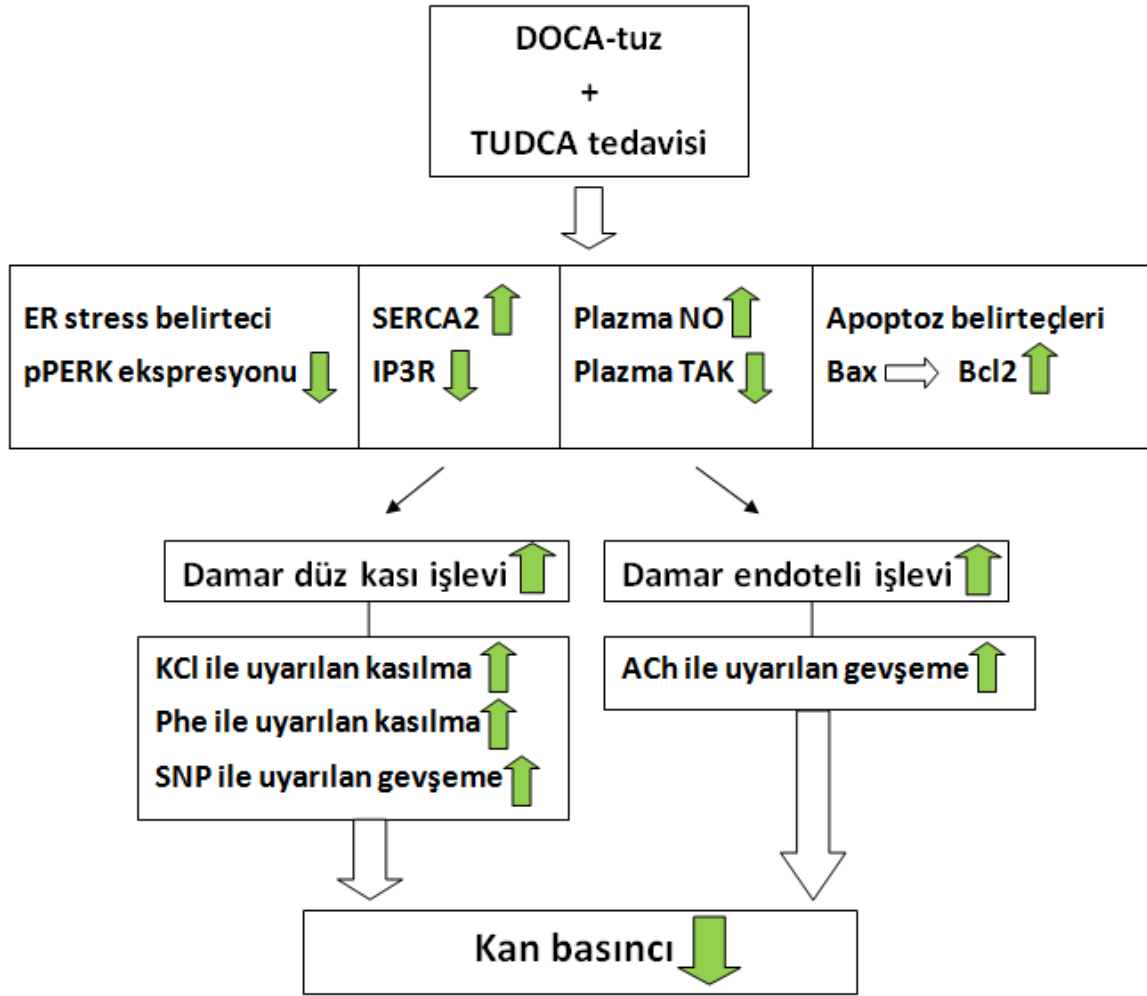
Artmış apoptotik aktivite çeşitli hipertansiyon modellerinde gösterilmiştir (Intengan ve Schiffrin, 2001; Suematsu, Suzuki, Delano ve Schmid-Schönbein, 2002). ER stresinin kronik olarak devam ettiği durumlarda, hücrel işlev kaybı oluşmakta ve daha sonra hücreler apoptoza gitmektedir (Dufey, Sepúlveda, Rojas-Rivera ve Hetz, 2014). Bcl-2 ailesi proteinler, kronik ER stres altında apoptozun kontrolünde önemli rol oynamaktadırlar. Bax gibi proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, mitokondride apoptozun

uyarılmasında esas adımdır. Bunlar sitokrom c salımına ve kaspazların aktivasyonuna neden olurlar. Sonuçta hücre apoptoza gider (Dufey, Sepúlveda, Rojas-Rivera ve Hetz, 2014). Daha önceki çalışmalarda ERS inhibisyonun, SHR aortlarında antiapoptotik etki gösterdiği (Spitler, Matsumoto ve Webb, 2013), pulmoner arter düz kas hücrelerinde indüklenmiş apoptozu baskıladığı (Dromparis ve diğerleri, 2013), anjiyotensin II verilmiş sıçanlarda aortik apoptozu azalttığı bildirilmiştir (Spitler ve Webb, 2014). Bizim çalışmamızda da hipertansif hayvanların aortlarında, proapoptotik Bax proteininin ekspresyon seviyeleri artarken, antiapoptotik Bcl2 proteininin ekspresyonu azalmıştır. Ayrıca ilk kez DOCA-tuz hipertansiyonda; ERS inhibisyonun hipertansiyonda artmış olan proapoptotik Bax ekspresyonunu değiştirmedeği ancak hipertansiyonda azalmış olan antiapoptotik Bcl2 ekspresyon seviyelerini kontrol değerlerine geri çevirdiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar ERS inhibisyonu ile oluşan antiapoptotik etkinin, TUDCA'nın antihipertansif etkisinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda hipertansif hayvanlarda incelenen parametrelerdeki değişimler ve TUDCA'nın bu parametrelere etkileri Şekil 5.1. ve Şekil 5.2.'de özetlenmiştir.



Şekil 5.1. Hipertansiyonun incelenen parametreler üzerindeki etkisi



Şekil 5.2. TUDCA ile ERS inhibisyonunun incelenen parametreler üzerindeki etkisi

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hipertansiyon dünya çapında 1 milyardan fazla insanı etkileyen ve en yaygın görülen kronik hastalıklardan biridir. Hipertansiyonda inme, kalp yetmezliği ve böbrek hastalıkları gibi komplikasyonlar morbidite ve mortalitenin esas nedenlerini oluşturmaktadır (Coffman, 2011). Pek çok patofizyolojik faktör hipertansiyon oluşumunda rol oynamaktadır ve bu mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu açıdan, hipertansiyonun moleküler patogenezi aydınlatmaya yönelik çalışmalar önceliğini ve önemini korumaktadır.

Çalışmamızda ilk kez TUDCA ile ERS inhibisyonunun DOCA-tuz hipertansif sıçanlarda sistolik kan basıncını anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Bulgularımız ERS inhibisyonunun, hipertansiyonda bozulmuş olan hem endotele bağımlı hem de endotelden bağımsız damar gevşemelerini iyileştirdiğini göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda, TUDCA tedavisinin plazma NO seviyelerini artırdığı bulunmuştur. Bu sonuçlar, ERS inhibisyonunun antihipertansif etkisine endotel işlevini düzeltici ve NO artırıcı etkisinin aracılık edebileceğini göstermektedir. İleride yapılacak çalışmalarda, TUDCA uygulamasının damar endotelinde NO sentezinde görev alan enzimler üzerindeki etkileri ve damar düz kasında NOS/NO/cGMP yolağı üzerindeki etkileri incelenebilir.

Çalışmamızda DOCA-tuz hipertansiyonda hem endoteli sağlam hem de endoteli uzaklaştırılmış damarlarda KCl ile uyarılan kasılmalarda anlamlı bir fark oluşmadığı bulunmuştur. Ayrıca, TUDCA uygulanan DOCA-tuz hipertansif gruplarda bu kasılmaların arttığı gösterilmiştir. Normotansif hayvanlarda ise TUDCA uygulaması endotelli damarlarda kasılma artışına neden olmuştur. KCl ile oluşan kasılmaya L-tipi Ca^{+2} kanal aktivasyonu aracılık etmektedir. Bu kasılmadaki artışın nedeninin L-tipi Ca^{+2} kanallarının aktivitesi veya ekspresyonunda ya da düz kas kalsiyum duyarlılığında artma sonucu olabileceği öne sürülmektedir (Galisteo ve diğerleri, 2004b). ERS inhibisyonunun kasılma yanıtları üzerindeki bu etkisini açıklayabilmek için daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Hem hücre membranındaki L-tipi Ca^{+2} kanallarının hem de düz kas kasılmasında rol alan mekanizmaların ERS altındaki durumları incelenmelidir.

Kalsiyum uyarısı kasılma, gevşeme ve büyüme gibi vasküler düz kasın ana işlevlerini kontrol etmektedir. Kalsiyum düzenlenmesi ve sinyalindeki bozukluk, hipertansiyona bağlı

gelişen vasküler işlev bozukluğunda önemli rol oynamaktadır (Gouloupoulou ve Webb, 2014). Çalışmamızda damar düz kası kasılmasında hücre dışından giren ve hücre içi depolardaki kalsiyumun katkılarını belirlemek için, kalsiyumsuz ortamda ve ortama kalsiyum eklenmesiyle oluşan fenilefrin kasılma cevapları incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarla ilk kez DOCA-tuz hipertansiyonda, TUDCA uygulamasının hücre dışından Ca^{+2} girişi ile oluşan FE ile uyarılan kasılmaları hem normotansif hem de hipertansif hayvanlarda artırdığı; hücre içi depolardan salıverilen Ca^{+2} ile oluşan kasılmaları ise sadece hipertansif hayvanlarda artırdığı gösterilmiştir. Bu veriler, TUDCA ile ERS inhibisyonunun, hipertansiyonda azalan hücre içi kalsiyum depolarını ve hücre dışından kalsiyum girişini artırdığını düşündürmektedir. Bu bulgular ve literatür bilgisi ile uyumlu olarak, çalışmamızda ilk kez, SERCA2 ekspresyon seviyelerinin DOCA-tuz hipertansif hayvanlarda kontrole göre anlamlı olarak azaldığı, TUDCA uygulaması ile artarak kontrol seviyelerine döndüğü gösterilmiştir. SERCA, depolarda Ca^{+2} birikmesi için major mekanizmayı oluşturmakta ve hücre içi serbest Ca^{+2} seviyelerinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Elde edilen sonuçlar, SERCA2 ekspresyonunun artışının, ERS inhibisyonunun DOCA-tuz hipertansiyondaki olumlu etkilerinde rol oynayan önemli bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca çalışmamızda, damarlarda ER'den Ca^{+2} salıverilmesini sağlayan kalsiyum kanalı olan IP3R'nin ekspresyonunun hipertansif grupta arttığı, TUDCA uygulamasıyla kontrol değerlerine döndüğü gözlenmiştir. Hipertansif hayvanlarda gözlenen damarda IP3R ekspresyonunun artışı ER Ca^{+2} depolarındaki azalmaya ikincil olarak ortaya çıktığı düşünülebilir.

Hipertansiyonda apoptotik aktivitenin arttığı bilinmektedir (Intengan ve Schiffrin, 2001; Suematsu, Suzuki, Delano ve Schmid-Schönbein, 2002). Kronik olarak ERS'e maruz kalma sonucu hücresel işlev kaybı oluşmakta ve daha sonra hücreler apoptoza gitmektedir (Dufey, Sepúlveda, Rojas-Rivera ve Hetz, 2014). Bcl-2 ailesi proteinlerden olan proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl2 proteinleri apoptozun kontrolünde önemli rol oynamaktadırlar. Çalışmamızda hipertansif hayvanların damarlarında, Bax proteininin ekspresyon seviyeleri artarken, Bcl2 proteininin ekspresyonu azaldığı gösterilmiştir. TUDCA ile ERS inhibisyonunun hipertansiyonda artan proapoptotik Bax ekspresyonunu değiştirmede fakat hipertansiyonda azalan antiapoptotik Bcl2 ekspresyon seviyelerini kontrol değerlerine geri çevirdiği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar TUDCA ile ERS inhibisyonuyla oluşan antiapoptotik etkinin, antihipertansif etkisinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. İleride yapılacak çalışmalarda, ERS inhibisyonunun damarlardaki

apoptoz üzerindeki etkisinin daha ayrıntılı incelenmesi için, apoptotik yolda yer alan diğer proteinler araştırılabilir.

Sonuç olarak elde edilen verilerin ışığında; TUDCA ile ER stres inhibisyonunun DOCA-tuz hipertansiyon modelinde, kan basıncını düşürdüğü, torasik aortun kasılma yanıtlarını değiştirdiği ve endotel işlev bozukluğunu düzelttiği gösterilmiştir. ERS inhibisyonunun bu iyileştirici etkilerine plazma NO seviyesini artırıcı, damarda SERCA2 ve IP3R ekspresyonlarını düzeltici ve antiapoptotik etkileri de eşlik etmektedir. Bu sonuçlar, ERS inhibisyonunun hipertansiyon üzerindeki olumlu etkisinin moleküler mekanizmalarına ışık tutmakta ve yeni tedaviler için potansiyel hedefler öne sürmektedir.





KAYNAKLAR

- Abrams, J.M. and Osborn, J.W. (2008). Osmoregulatory function in health disease: a role for benzamil-sensitive proteins of the central nervous system in the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 35, 687–694.
- Adachi, T., Weisbrod, R.M., Pimentel, D.R., Ying, J., Sharov, V.S., Schöneich, C. and Cohen, R.A. (2004). S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nature Medicine*, 10, 1200-1207.
- Amin, A., Choi, S. K., Galan, M., Kassan, M., Partyka, M., Kadowitz, P., Henrion, D., Trebak, M., Belmadani, S. and Matrougui, K. (2012). Chronic inhibition of endoplasmic reticulum stress and inflammation prevents ischaemia-induced vascular pathology in type II diabetic mice. *The Journal of Pathology*, 227(2), 165-74.
- Ajay, M., Achike, F.I. and Mustafa, M.R. (2007). Modulation of vascular reactivity in normal, hypertensive and diabetic rat aortae by a non-antioxidant flavonoid. *Pharmacological Research*, 55(5),385–91.
- Badyal, D.K., Dadhich, A.P. and Lata, H. (2003). Animal models of hypertension and effect of drugs. *Indian Journal of Pharmacology*, 35(6), 349-362.
- Basha, B., Samuel, S. M., Triggle, C. R. and Ding, H. (2012). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: possible involvement of endoplasmic reticulum stress? *Experimental Diabetes Research*, 2012, 481840.
- Bermúdez, V., Bermúdez, F., Acosta, G., Acosta, A., Añez, J., Andara, C., Leal, E., Cano, C., Manuel, V., Hernández, R. and Israili, Z. (2008). Molecular mechanisms of endothelial dysfunction: from nitric oxide synthesis to ADMA inhibition. *American Journal of Therapeutics*, 15(4), 326-33.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 517-529.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*, 2, 326–332.
- Binda, D., Nicod, L., Viollon-Abadie, C., Rodriguez, S., Berthelot, A., Coassolo, P. and Richert, L. (2001). Strain difference (WKY, SPRD) in the hepatic antioxidant status in rat and effect of hypertension (SHR, DOCA). Ex vivo and in vitro data. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 218, 139-146.
- Block, B.A., Imagawa, T., Campbell, K.P. and Franzini-Armstrong, C. (1988). Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*, 107(6 Pt 2), 2587–2600.

- Bockman, C.S., Jeffries, W.B., Pettinger, W.A. and Abel, P.W. (1992). Enhanced release of endothelium-derived relaxing factor in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*, 20(3), 304-13.
- Bonaventura, D., de Lima, R.G., da Silva, R.S. and Bendhack, L.M. (2011). NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K(+) channels and sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Life Sciences*, 89(17-18), 595-602.
- Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z.V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., Quest, A.F.G. and Lavandero, S. (2013). Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 301, 215-90.
- Brooks, V.L., Freeman, K.L. and Qi, Y. (2006). Time course of synergistic interaction between DOCA and salt on blood pressure: roles of vasopressin and hepatic osmoreceptors. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291, R1825–R1834.
- Brown, L., Ooi, S.Y., Lau, K. and Sernia, C. (2000). Cardiac and vascular responses in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27(4), 263-9.
- Cai, H. and Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular disease. The role of oxidant stress. *Circulation Research*, 87, 840–844.
- Carlisle, R.E., Werner, K.E., Yum, V., Lu, C., Tat, V., Memon, M., No, Y., Ask, K. and Dickhout, J.G. (2016). Endoplasmic reticulum stress inhibition reduces hypertension through the preservation of resistance blood vessel structure and function. *Journal of Hypertension*, 34(8), 1556-69.
- Chemaly, E.R., Bobe, R., Adnot, S., Hajjar, R.J. and Lipskaia, L. (2013). Sarco (Endo) Plasmic Reticulum Calcium ATPases (SERCA) Isoforms in the Normal and Diseased Cardiac, Vascular and Skeletal Muscle. *Journal of Cardiovascular Diseases & Diagnosis*, 1, 113.
- Choy, K.W., Mustafa, M.R., Lau, Y.S., Liu, J., Murugan, D., Lau, C.W., Wang, L., Zhao, L. and Huang, Y. (2016). Paeonol protects against endoplasmic reticulum stress-induced endothelial dysfunction via AMPK/PPAR δ signaling pathway. *Biochemical Pharmacology*, 116, 51-62.
- Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058.
- Carvajal, J.A., Germain, A.M., Huidobro-Toro, J.P. and Weiner, C.P. (2000). Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *Journal of Cellular Physiology*, 184, 409-420.
- Chakrabarti, A., Chen, A. W. and Varner, J. D. (2011). A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12), 2777-93.

- Chapleau, M.W., Rotella, D.L., Reho, J.J., Rahmouni, K., Stauss, H.M. (2016, Jul). Chronic vagal nerve stimulation prevents high-salt diet-induced endothelial dysfunction and aortic stiffening in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 311(1), H276-85.
- Chen, Y., Liu, C. P., Xu, K. F., Mao, X. D., Lu, Y. B., Fang, L., Yang, J. W. and Liu, C. (2008). Effect of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by advanced glycation end products in cultured mouse podocytes. *American Journal of Nephrology*, 28(6), 1014-22.
- Civelek, M., Manduchi, E., Riley, R. J., Stoeckert, C. J. and Davies, P. F. (2009). Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis. *Circulation Research*, 105(5), 453-61.
- Coffman, T. M. (2011). Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nature Medicine*, 17(11), 1402-1409.
- Cohen, RA., Plane, F., Najibi, S., Huk, I., Malinski, T. and Garland, CJ. (1997). Nitric oxide is the mediator of both endothelium dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 4193-98.
- Cohn, JN. (2001). Arterial compliance to stratify cardiovascular risk: more precision in therapeutic decision making. *American Journal of Hypertension*, 14(Suppl), 258S-63.
- Cui, W., Li, J., Ron, D. ve Sha, B. (2011). The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 67, 423–428.
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J. and Diehl, J.A. (2003). Nrf 2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 7198–7209.
- Dally, S., Monceau, V., Corvazier, E., Bredoux, R., Raies, A., Bobe, R., del Monte, F. and Enouf, J. (2009). Compartmentalized expression of three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 isoforms including the switch to ER stress, SERCA3f, in non-failing and failing human heart. *Cell Calcium*, 45(2), 144-54.
- Dally, S., Corvazier, E., Bredoux, R., Bobe, R. and Enouf, J. (2010). Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48, 633-644.
- Dever, T.E. (2002). Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*, 108, 545–556.

- Dong, Y., Zhang, M., Wang, S., Liang, B., Zhao, Z., Liu, C., Wu, M., Choi, H.C., Lyons, T.J. and Zou, M.H. (2010). Activation of AMP-activated protein kinase inhibits oxidized LDL-triggered endoplasmic reticulum stress in vivo. *Diabetes*, 59, 1386–1396.
- Dromparis, P., Paulin, R., Stenson, T.H., Haromy, A., Sutendra, G. and Michelakis, E.D. (2013). Attenuating endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic strategy in pulmonary hypertension. *Circulation*, 127(1), 115-25.
- Dufey, E., Sepúlveda, D., Rojas-Rivera, D. and Hetz, C. (2014). Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 307(7), 582-94.
- Düzgün, A., Alaçam, H. ve Okuyucu, A. (2012). Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29, 95-100.
- Flamment, M., Hajdouch, E., Ferré, P. and Foufelle, F. (2012). New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23, 381–390.
- Förstermann, U. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv*, 459(6), 923-39.
- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373–376.
- Furchgott, R.F. and Vanhoutte, P.M. (1989). Endothelium derived relaxing and contracting factors. *FASEB Journal*, 3, 2007–2017.
- Galán, M., Kassan, M., Kadowitz, P.J., Trebak, M., Belmadani, S. and Matrougui, K. (2014). Mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced vascular endothelial dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(6), 1063-75.
- Galisteo, M., García-Saura, M. F., Jiménez, R., Villar, I. C., Zarzuelo, A., Vargas, F. and Duarte, J. (2004a). Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defence system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 259(1-2), 91-9.
- Galisteo, M., García-Saura, M.F., Jiménez, R., Villar, I.C., Wangenstein, R., Zarzuelo, A., Vargas, F. and Duarte, J. (2004b). Effects of quercetin treatment on vascular function in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Comparative study with verapamil. *Planta Medica*, 70(4), 334-41.
- Gawron-Skarbek, A., Chrzczanowicz, J., Kostka, J., Nowak, D., Drygas, W., Jegier, A. and Kostka, T. (2014). Cardiovascular risk factors and total serum antioxidant capacity in healthy men and in men with coronary heart disease. *BioMed Research International*, 2014, 216964.
- Giannotti, G. and Landmesser, U. (2007). Endothelial Dysfunction as an Early Sign of Atherosclerosis. *Herz*, 32, 568–72.

- Goulopoulou, S. and Webb, R.C. (2014). Symphony of vascular contraction: how smooth muscle cells lose harmony to signal increased vascular resistance in hypertension. *Hypertension*, 63(3), e33-9.
- Govers, R. and Rabelink, T. (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 280, 193–206.
- Grayson, T.H., Haddock, R.E., Murray, T.P., Wojcikiewicz, R.J. and Hill, C.E. (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtypes are differentially distributed between smooth muscle and endothelial layers of rat arteries. *Cell Calcium*, 36(6), 447-58.
- Gumanova, N. G., Artyushkova, E. B., Metel'skaya, V. A., Kochkarov, V. I., Pokrovskaya, T. G., Danilenko, L. M., Korneev, M. M., Pokrovskii, M. V. and Pashin, E. N. (2007). Effect of antioxidants pQ510 and resveratrol on regulatory function of the endothelium in rats with modeled arterial hypertension. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 143(6), 678-81.
- Guo, Q., Shi, Q., Li, H., Liu, J., Wu, S., Sun, H. and Zhou, B. (2015). Glycolipid Metabolism Disorder in the Liver of Obese Mice Is Improved by TUDCA via the Restoration of Defective Hepatic Autophagy. *International Journal of Endocrinology*, 2015, 687938.
- Hagar, R.E., Burgstahler, A.D., Nathanson, M.H. and Ehrlich, B.E. (1998). Type III InsP3 receptor channel stays open in the presence of increased calcium. *Nature*, 396, 81–84.
- Han, S., Uludag, M.O., Usanmaz, S.E., Ayaloglu-Butun, F., Akcali, K.C. and Demirel-Yilmaz, E. (2015). Resveratrol affects histone 3 lysine 27 methylation of vessels and blood biomarkers in DOCA salt-induced hypertension. *Molecular Biology Reports*, 42(1), 35-42.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*, 6, 1099–1108.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M. and Ron, D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell*, 11, 619–633.
- Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.H., Bassik, M.C., Antonsson, B., Brandt, G.S., Iwakoshi, N.N., Schinzel, A., Glimcher, L.H. and Korsmeyer, S.J. (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science*, 312, 572–576.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(2), 89–102.
- Hilgers, R.H. and Webb, R.C. (2005). Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. *Experimental Biology and Medicine*, 230, 829-835.

- Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P. and Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 186, 323–331.
- Hu, L. and Manning, Jr. R. D. (1995). Role of nitric oxide in regulation of long term pressure-natriuresis relationship in Dahl rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 268, H2375-H83.
- Intengan, H.D. and Schiffrin, E.L. (2001). Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*, 38(3 Pt 2), 581-7.
- Ivanova, H., Vervliet, T., Missiaen, L., Parys, J.B., De Smedt, H. and Bultynck, G. (2014). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(10), 2164-83.
- Iwawaki, T., Hosoda, A., Okuda, T., Kamigori, Y., Nomura-Furuwatari, C., Kimata, Y., Tsuru, A and Kohno, K. (2001). Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nature Cell Biology*, 3, 158–164.
- Iyer, A., Chan, V. and Brown, L. (2010). The DOCA-Salt Hypertensive Rat as a Model of Cardiovascular Oxidative and Inflammatory Stress. *Current Cardiology Reviews*, 6(4), 291-7.
- Jacob, F., Clark, L.A., Guzman, P.A. and Osborn, J.W. (2005). Role of renal nerves in development of hypertension in DOCA-salt model in rats: a telemetric approach. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 289, H1519–H1529.
- Jo, F., Jo, H., Hilzendeger, A.M., Thompson, A.P., Cassell, M.D., Rutkowski, D.T., Davisson, R.L., Grobe, J.L. and Sigmund, C.D. (2015). Brain endoplasmic reticulum stress mechanistically distinguishes the saline-intake and hypertensive response to deoxycorticosterone acetate-salt. *Hypertension*, 65(6), 1341-8.
- Kassan, M., Galán, M., Partyka, M., Saifudeen, Z., Henrion, D., Trebak, M. and Matrougui, K. (2012). Endoplasmic reticulum stress is involved in cardiac damage and vascular endothelial dysfunction in hypertensive mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(7), 1652-61.
- Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & Development*, 13(10), 1211-33.
- Kayaalp, O. (2005). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*. (Onbirinci baskı). Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., 357.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M. and Kohno, K. (2007). Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *The Journal of Cell Biology*, 179, 75–86.

- Kitamura, M. (2008). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 295(2), F323-34.
- Kiviluoto, S., Vervliet, T., Ivanova, H., Decuypere, J.P., De Smedt, H., Missiaen, L., Bultynck, G. and Parys, J.B. (2013). Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors during endoplasmic reticulum stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(7), 1612-24.
- Krebs, J., Agellon, L.B. and Michalak, M. (2015). Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460(1), 114-21.
- Lee, M.Y. and Griendling, K.K. (2008). Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(6), 1045-59.
- Lee, J., Bae, E.H., Ma, S.K. and Kim, S.W. (2016, May). Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases. *Chonnam Medical Journal*, 52(2), 81-90.
- Lenna, S., Han, R. and Trojanowska, M. (2014). Endoplasmic reticulum stress and endothelial dysfunction. *IUBMB Life*, 66(8), 530-7.
- Levitsky, D.O., Clergue, M., Lambert, F., Souponitskaya, M.V., Le Jemtel, T.H., Lecarpentier, Y. and Lompré, A.M. (1993). Sarcoplasmic reticulum calcium transport and Ca(2+)-ATPase gene expression in thoracic and abdominal aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(11), 8325-31.
- Liang, B., Wang, S., Wang, Q., Zhang, W., Viollet, B., Zhu, Y. and Zou, M.H. (2013). Aberrant endoplasmic reticulum stress in vascular smooth muscle increases vascular contractility and blood pressure in mice deficient of AMP-activated protein kinase- $\alpha 2$ in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(3), 595-604.
- Lindholm, D., Wootz, H. and Korhonen, L. (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death & Differentiation*, 13, 385–392.
- Lipskaia, L., Chemaly, E.R., Hadri, L., Lompre, A.M. and Hajjar, R.J. (2010). Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10, 29-41.
- Liu, M., Chen, Z., Chen, L. (2016). Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37, 425–443.
- Logue, S.E., Cleary, P., Saveljeva, S. and Samali, A. (2013). New directions in ER stress-induced cell death. *Apoptosis*, 18(5), 537-46.
- Lynch, J.M., Maillet, M., Vanhoutte, D., Schloemer, A., Sargent, M.A., Blair, N.S., Lynch, K.A., Okada, T., Aronow, B.J., Osinska, H., Prywes, R., Lorenz, J.N., Mori, K., Lawler, J., Robbins, J., Molkentin, J.D. (2012). A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response. *Cell*, 149, 1257–68.

- Lytton, J., Westlin, M. and Hanley, M.R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 17067–17071.
- Marenholz, I., Heizmann, C.W. and Fritz, G. (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322, 1111-1122.
- Martin, C., Cameron, J. and McGrath, B. (2008). Mechanical and circulating biomarkers in isolated clinic hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 35(4), 402–408.
- Matsumoto, T., Ando, M., Watanabe, S., Iguchi, M., Nagata, M., Kobayashi, S., Taguchi, K. and Kobayashi, T. (2016). Tunicamycin-Induced Alterations in the Vasorelaxant Response in Organ-Cultured Superior Mesenteric Arteries of Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(9), 1475-81.
- Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J.B., De Smedt, H. and Missiaen, L. (2011). Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1, 3(6).
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. and Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nature Cell Biology*, 7, 766–72.
- Mikoshiba, K. (2007). The IP₃ receptor/Ca²⁺ channel and its cellular function. *Biochemical Society Symposium*, (74), 9-22.
- Minamino, T., Komuro, I. and Kitakaze, M. (2010). Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circulation Research*, 107, 1071–1082.
- Montecucco, F., Pende, A., Quercioli, A. and Mach, F. (2011). Inflammation in the pathophysiology of essential hypertension. *Journal of Nephrology*, 24(1), 23–34.
- Mountian, I., Baba-Aïssa, F., Jonas, J.C., De Smedt, H., Wuytack, F. and Parys, J.B. (2001). Expression of Ca(2+) Transport Genes in Platelets and Endothelial Cells in Hypertension. *Hypertension*, 37(1), 135-141.
- Naidoo, N. (2009). ER and aging-Protein folding and the ER stress response. *Ageing Research Reviews*, 8(3), 150-9.
- Nakano, D., Itoh, C., Ishii, F., Kawanishi, H., Takaoka, M., Kiso, Y., Tsuruoka, N., Tanaka, T. and Matsumura, Y. (2003). Effects of sesamin on aortic oxidative stress and endothelial dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(12), 1701-5.
- Nicod, L., Rodriguez, S., Letang, J. M., Viollon-Abadie, C., Jacqueson, A., Berthelot, A. and Richert, L. (2000). Antioxidant status, lipid peroxidation, mixed function oxidase and UDP-glucuronyl transferase activities in livers from control and DOCA-salt hypertensive male Sprague Dawley rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 203(1-2), 33-9.

- Oikawa, D., Tokuda, M., Hosoda, A. and Iwawaki, T. (2010). Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 α . *Nucleic Acids Research*, 38, 6265–6273.
- Oloyo, A.K., Sofola, O.A. and Yakubu, M.A. (2016). Orchidectomy attenuates high-salt diet-induced increases in blood pressure, renovascular resistance, and hind limb vascular dysfunction: role of testosterone. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(9), 825-33.
- Oparil, S., Zaman, M. A. and Calhoun, D. A. (2003). Pathogenesis of Hypertension. *Annals of Internal Medicine*, 139, 761-776.
- Owens, G.K., Kumar, M.S. and Wamhoff, B.R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological Reviews*, 84, 767-801.
- Ozcan, L. and Tabas, I. (2012). Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annual Review of Medicine*, 63, 317-28.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H. and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306(5695), 457-61.
- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R.O., Görgün, C.Z., Hotamisligil, G. S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, 313(5790), 1137-40.
- Periasamy, M. and Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle and Nerve*, 35, 430-442.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P. and Strasser, A. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 129, 1337–1349.
- Ramos-Franco, J., Bare, D., Caenepeel, S., Nani, A., Fill, M. and Mignery, G. (2000). Single-channel function of recombinant type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biophysical Journal*, 79, 1388–1399.
- Ron, D. and Hubbard, S.R. (2008). How IRE1 reacts to ER stress. *Cell*, 132, 24–26.
- Ron, D. and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 519–529.
- Rutkowski, D. T. And Kaufman, R. J. (2004, Jan). A trip to the ER: coping with stress. *Trends in Cell Biology*, 14(1), 20-8.
- Samtleben, S., Jaepel, J., Fecher, C., Andreska, T., Rehberg, M. and Blum, R. (2013). Direct imaging of ER calcium with targeted-esterase induced dye loading (TED). *Journal of Visualized Experiments*, 75, e50317.

- Sano, R. and Reed, J.C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833, 3460–3470.
- Schenk, J. and McNeill, J.H. (1992). The pathogenesis of DOCA-salt hypertension. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 27(3), 161-70.
- Schwaller, B. (2012). The regulation of a cell's Ca^{2+} signaling toolkit: the Ca^{2+} homeostasome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 740, 1-25.
- Schwarz, D.S. and Blower, M.D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1), 79-94.
- Seis, H. (1985). *Oxidative stress: introductory remarks*. London: Academic Press, 1 – 8.
- Seyle, H. and Bois, P. (1957). The hormonal production of nephrosclerosis and periarteritis nodosa in the primate. *British Medical Journal*, 1, 183-6.
- Shamu, C.E. and Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO Journal*, 15, 3028–3039.
- Shen, X., Zhang, K. and Kaufman, R. J. (2004, Sep). The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 28(1-2), 79-92.
- Shi, Y., Vattem, K.M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L. and Wek, R.C. (1998). Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Molecular and Cellular Biology*, 18, 7499–7509.
- Shirakura, T., Nomura, J., Matsui, C., Kobayashi, T., Tamura, M. and Masuzaki, H. (2016). Febuxostat, a novel xanthine oxidoreductase inhibitor, improves hypertension and endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 389(8), 831-8.
- Spitler, K.M., Matsumoto, T. and Webb, R.C. (2013). Suppression of endoplasmic reticulum stress improves endothelium-dependent contractile responses in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 305(3), 344-53.
- Spitler, K.M. and Webb, R.C. (2014). Endoplasmic reticulum stress contributes to aortic stiffening via proapoptotic and fibrotic signaling mechanisms. *Hypertension*, 63(3), 40-45.
- Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J. and Loscalzo, J. (1992). S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 444-448.

- Storm, D.S. and Webb, R.C. (1992). Alpha-adrenergic receptors and 45Ca^{2+} efflux in arteries from deoxycorticosterone acetate hypertensive rats. *Hypertension*, 6 (2), 734-8.
- Suematsu, M., Suzuki, H., Delano, F.A. and Schmid-Schönbein, G.W. (2002). The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis. *Microcirculation*, 9(4), 259-76.
- Suzuki, S., Takata, Y., Kubota, S., Ozaki, S. and Kato, H. (1994). Characterization of the alpha-1 adrenoceptors in the mesenteric vasculature from deoxycorticosterone-salt hypertensive rats: studies on vasoconstriction, radioligand binding and postreceptor events. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268(2), 576-83.
- Takayanagi, T., Kawai, T., Forrester, S.J., Obama, T., Tsuji, T., Fukuda, Y., Elliott, K.J., Tilley, D.G., Davisson, R.L., Park, J.Y. and Eguchi, S. (2015). Role of epidermal growth factor receptor and endoplasmic reticulum stress in vascular remodeling induced by angiotensin II. *Hypertension*, 65(6), 1349-55.
- Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M. and Kangawa, K. (2000). Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Molecular Cell*, 6(1), 11–22.
- Tang, E.H. and Vanhoutte, P.M. (2010). Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? *Pflügers Archiv*, 459(6), 995–1004.
- Tirasophon, W., Welihinda, A.A. and Kaufman, R.J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/ endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes & Development*, 12, 1812–1824.
- Tong, X., Evangelista, A. and Cohen, R.A. (2010). Targeting the redox regulation of SERCA in vascular physiology and disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(2), 133-8.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405, 647-655.
- Urra, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D. and Hetz, C. (2013). When ER stress reaches a dead end. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(12), 3507–17.
- Vane, JR., Anggard, EE. and Botting, RM. (1990). Regulatory functions on the vascular endothelium. *The New England Journal of Medicine*, 323, 27-36.
- Vang, S., Longley, K., Steer, C.J. and Low, W.C. (2014). The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. *Global Advances in Health and Medicine*, 3(3), 58-69.
- Vanhoutte, P.M., Shimokawa, H., Feletou, M. and Tang, E.H. (2015). Endothelial Dysfunction and Vascular Disease - A Thirtieth Anniversary Update. *Acta physiologica*, Dec 26.

- Vassalle, C., Masini, S., Carpeggiani, C., L'Abbate, A., Boni, C. and Zucchelli, G.C. (2004). In vivo total antioxidant capacity: comparison of two different analytical methods. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42(1), 84-9.
- Vera, R., S'anchez, M., Galisteo, M., Villar, I. C., Jimenez, R., Zarzuelo, A., P'Erez-Vizca'Ino, F. and Duarte, J. (2007). Chronic administration of genistein improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: involvement of eNOS, caveolin and calmodulin expression and NADPH oxidase activity. *Clinical Science*, 112, 183–191.
- Walter, P. and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of invitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *The Journal of Cell Biology*, 91(2 Pt 1), 551–556.
- Walter, P., Ibrahimi, I. and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *The Journal of Cell Biology*, 91(2 Pt 1), 545–550.
- Walter, P. and Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334, 1081–1086.
- Wang, S. and Kaufman, R.J. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *Journal of Cell Biology*, 197(7), 857–67.
- Wang, M. and Kaufman, R.J. (2016). Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, 529(7586), 326-35.
- Wojcikiewicz, R.J. and Luo, S.G. (1998). Differences among type I, II, and III inositol-1,4,5-trisphosphate receptors in ligand-binding affinity influence the sensitivity of calcium stores to inositol-1,4,5-trisphosphate. *Molecular Pharmacology*, 53, 656–662.
- Yamaguchi, H. And Wang, H.G. (2004). CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 45495–45502.
- Yemane, H., Busauskas, M., Burris, S.K. and Knuepfer, M.M. (2010). Neurohumoral mechanisms in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension in rats. *Experimental Physiology*, 95(1), 51-5.
- Young, C.N., Cao, X., Guraju, M.R., Pierce, J.P., Morgan, D.A., Wang, G., Iadecola, C., Mark, A.L. and Davisson, R.L. (2012). ER stress in the brain subfornical organ mediates angiotensin-independent hypertension. *Journal of Clinical Investigation*, 122, 3960–4.
- Zhao, L. and Ackerman, S.L. (2006). Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 18, 444–452.

- Zhao, M., Zang, B., Cheng, M., Ma, Y., Yang, Y. and Yang, N. (2013). Differential responses of hepatic endoplasmic reticulum stress and inflammation in diet-induced obese rats with high-fat diet rich in lard oil or soybean oil. *PLoS One*, 6;8(11), e78620.
- Zhao, Y., Vanhoutte, P.M. and Leung, S.W. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 129(2), 83-94.







EKLER

EK-1. Etik kurul onayı

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : 66332047-604.01.02/ 211-26578
KONU :

29/11/2013

Sayın

Doç.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Mecit Orhan ULUDAĞ, Emine DEMİREL YILMAZ ve Sevtap HAN'dan oluşan, G.Ü.ET-13.076 kod numaralı ve **"Sıçanlarda Hipertansiyon Nedeniyle Gelişen Endotel İşlev Bozukluğunda Endoplazmik Retikulum Stresi'nin İncelenmesi"** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-13.076 and entitled **"The Investigation of Endoplasmic Reticulum Stress in the hypertension-induced Endothelial Dysfunction on Rats"** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


Prof.Dr. Leyla AÇIK
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

EK-1. (devam) Etik kurul onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI
KARARLARI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 22.11.2013		TOPLANTI SAYISI : 12	
ADI-SOYADI			
Prof.Dr.Leyla AÇIK (Başkan)		KATILDI	
Uzm.Dr.Şeyda DİKER (Başkan Yrd.)		KATILDI	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU		KATILDI	
Prof.Dr.Tuncay PEKER		KATILDI	
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER		KATILDI	
Prof.Dr.Esra AKKOL		KATILDI	
Yrd.Doç.Dr.İhsan YIKILGAN		KATILDI	
Yrd.Doç.Dr.Süleyman YEŞİL		KATILAMADI	
Dr.Kadir BAŞAR		KATILDI	
Sevim ÖNCÜ ERSANLI		KATILAMADI	

Prof.Dr.Leyla AÇIK
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

L. AÇIK

EK-2. Deney hayvanı kullanım sertifikası



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
KATILIM SERTİFİKASI

Sayın *Yük. Doç. Dr. Serap HAN*

Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 21-29 Aralık 2009 tarihleri arasında düzenlenen "Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu VII" ye katılarak Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.



Prof. Dr. Nürten TÜRKÖZKAN
Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme
ve Deneysel Araştırmalar Merkezi
Müdürü



Prof. Dr. Gökhan ALPASLAN
Deney Hayvanları Etik Kurulu
Başkanı



Prof. Dr. Rıza AYHAN
Rektör

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Han, Sevtap
 Uyuğu : Türkiye Cumhuriyeti
 Doğum tarihi ve yeri : 1984, Sivas
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0312 2023124
 Faks : 0312 2235018
 e-mail : sevtaphan@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	2010-devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	2010
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2007
Lise	Kongre Lisesi	2002

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2011-Devam ediyor	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI ve SCI-expanded):

- 1- Uludag, O., Hicdurmaz, E., **Han, S.**, Usanmaz, S.E., Abacioglu, N., Ark, M. and Demirel-Yilmaz, E. (2016). Diurnal Temporal Blood H₂S Variations Correlate with the Circadian Rhythm of Vascular Contraction and Blood Pressure. *International Journal of Pharmacology*, 12(6), 587-596.

- 2- **Han, S.**, Uludag, M.O., Usanmaz, S.E., Ayaloglu-Butun, F., Akcali, K.C. and Demirel-Yilmaz, E. (2015). Resveratrol affects histone 3 lysine 27 methylation of vessels and blood biomarkers in DOCA salt-induced hypertension. *Molecular Biology Reports*, 42(1), 35-42.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- 1- **Han, S.**, Bal, NB., Sadi, G., Uludağ, O., Demirel-Yılmaz, E. Inhibition of endoplasmic reticulum stress protected hypertension-induced alteration in the protein expression of rat aorta. *The EMBO meeting*. p:270, 10-13 September 2016. Mannheim, Germany.
- 2- **Han, S.**, Bal, NB., Sadi, G., Uludağ, O., Demirel-Yılmaz, E. Effects of LXR agonist GW3965 on expression of functional proteins in hypertensive rat aorta. *The EMBO meeting*. p:271, 10-13 September 2016. Mannheim, Germany.
- 3- **Han, S.**, Bal, NB., Usanmaz, SE., Uludağ, O., Demirel-Yılmaz, E. Effects of endoplasmic reticulum stress on hypertension induced endothelial dysfunction in rat. *7th European Congress of Pharmacology (EPHAR)*. 26-30 June 2016. İstanbul, Türkiye.
- 4- **Han, S.**, Bal, NB., Usanmaz, SE., Uludağ, O., Demirel-Yılmaz, E. Effects of LXR agonist GW3965 on vascular reactivity in DOCA-salt induced hypertension in rat. *7th European Congress of Pharmacology (EPHAR)*. 26-30 June 2016. İstanbul, Türkiye.
- 5- Bal, NB., **Han, S.**, Usanmaz, SE., Uludağ, O., Demirel-Yılmaz, E. The role of Liver X Receptors on cardiac dysfunction induced by hypertension. *7th European Congress of Pharmacology (EPHAR)*. 26-30 June 2016. İstanbul, Türkiye.
- 6- Bal, NB., **Han, S.**, Kiremitci, S., Sadi, G., Uludağ, O., Demirel-Yılmaz, E. Effect of endoplasmic reticulum stress inhibition on cardiac remodelling induced by hypertension, *7th European Congress of Pharmacology (EPHAR)*. 26-30 June 2016. İstanbul, Türkiye.
- 7- Uludağ, O., **Han, S.**, Usanmaz, SE., Bal, NB., Demirel-Yılmaz, E. Age and gender dependent effects of resveratrol and regular aerobic exercise on the endothelial function related blood biomarkers. *17th World Congress Of Basic And Clinical Pharmacology Congress*. 13-18 July 2014. Cape Town, Güney Afrika Cumhuriyeti.
- 8- **Han, S.**, Bal, NB., Uludag, M.O., Demirel-Yılmaz, E. Age and gender dependent effects of resveratrol and exercise on vascular relaxations. *The 5th EMBO meeting*, Amsterdam Netherlands, 21-24 September 2013.
- 9- Uludag, O., Özdemir, E.D., Bal, N.B., **Han, S.**, Dayanır, H., Babacan, A., Usanmaz, S.E., Demirel-Yılmaz, E. The effects of ozone treatment in endotoxin induced shock model in rats. *XXI ISHR World Congress*, San Diego, California USA, Jun 30-July 04 2013.

- 10- **Han, S.**, Palabiyik, B., Uzun, N.B., Aydın, M., Uludag, O., Basgut, B. The effect of age on hypothalamic oxidative stress in fructose-induced metabolic syndrome. *6th European Congress of Pharmacology (EPHAR)*. July 17-20, 2012. Granada, Spain.
- 11- **Han, S.**, Usanmaz, S.E., Uludag, O., Demirel-Yılmaz, E. Alteration Of The Biomarkers Related To The Endothelial Function In Aging. *III. International Anti-Aging Congress*. December,02-05,2010.Ankara,Turkey.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- 1- **Han, S.**, Bal, N., Usanmaz, S.E., Uludağ, O., Demirel-Yılmaz, E. Hipertansiyonda gelişen endoplazmik retikulum stresinin damar cevapları üzerine etkisi. *Türk Farmakoloji Derneği 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi*. 7-10 Eylül 2015, Ankara, Türkiye.
- 2- **Han, S.**, Usanmaz, S., Akçalı, C., Ayaloğlu, F., Uludağ, O., Demirel-Yılmaz, E. Hipertansiyonda Oluşan Damar Değişiklikleri Üzerine Resveratrolün Etkisi. *Türk Farmakoloji Derneği 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi*. 19-22 Ekim 2011, Eskişehir, Türkiye.
- 3- Hiçdurmaz, E., **Han, S.**, Ark, M., Uludağ, O., Abacıoğlu, N. İzole Sıçan Aortunda Rho-Kinaz Ekspresyonu Ve Aktivasyonunun Güniçi Ritminin İncelenmesi. *Türk Farmakoloji Derneği 20. Ulusal Farmakoloji Kongresi*. 4-7 Kasım 2009, Antalya, Türkiye.
- 4- Sezik, E., Aslan, M., **Han, S.** Ankara'daki özel eczacılık yüksek okulları hakkında. VIII. Türk Eczacılık Tarihi Toplantısı, 29-30 Mayıs, 2008, İstanbul, Türkiye (Sözlü bildiri).

Hobiler

Seyahat etmek, keman çalmak, kayak yapmak, kitap okumak.



GAZİ GELECEKTİR...

