

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

**GESTASYONEL DİYABETLİ VE NORMAL GEBELERDEN İZOLE
EDİLEN UMBİLİKAL ARTERLERDE ANJİYOTENSİN II VE TLR4
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Esra BÜYÜK

Danışman
Prof. Dr. Ayşe Saide ŞAHİN

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 201418011 proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2021

Tez Onay Sayfası

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **Esra BÜYÜK**'ün “**Gestasyonel diyabetli ve normal gebelerden izole edilen umbilikal arterlerde anjiyotensin II ve TLR4 ilişkisinin incelenmesi**” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA/07.10.2021

Tez Danışmanı	Prof. Dr. Ayşe Saide ŞAHİN N.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji A.D.
Üye	Doç. Dr. H. Gül DURSUN N.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.
Üye	Dr. Öğr. Üyesi İpek DUMAN N.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji A.D.
Üye	Prof. Dr. Hülagü BARIŞKANER Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji A.D.
Üye	Doç. Dr. Burak Cem SONER İzmir Demokrasi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji A.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 13/10/2021 tarih ve 22/06 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmza

Tez Beyan Sayfası

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

07.10.2021

Esra BÜYÜK

Benzerlik Raporu

Tezin Adı: Gestasyonel Diyabetli ve Normal Gebelerden İzole Edilen Umbilikal Arterlerde Anjiyotensin II ve TLR4 İlişkisinin İncelenmesi

Öğrencinin Adı Soyadı: Esra BÜYÜK

Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: 29 sayfa

ESRA TEZ

ORJİNALLİK RAPORU

% 3	% 2	% 1	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Öğrenci Ödevi	% 1
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1

Alıntılarını çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

< %1

Bibliyografyayı Çıkart

Kapat

Danışman Öğretim Üyesinin

Adı Soyadı

Prof. Dr. Ayşe Saide ŞAHİN

Önsöz ve Teşekkür

Doktora eğitimimin ilk gününden itibaren bilgi ve tecrübelerini aktaran, akademik anlamda yetişmemi sağlayan, merhamet ve sevgi ile yardımlarını benden esirgemeyen Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayşe Saide ŞAHİN'e daima teşekkür ve saygılarımı sunarım. Eğitimim için katkı sağlayan başta Doç. Dr. Burak Cem SONER, Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK, Doç. Dr. Salim Yalçın İNAN ve Dr. Öğr. Üyesi İpek DUMAN olmak üzere değerli öğretim üyesi hocalarıma teşekkür ederim. Bu süreçte yanımda olan ve doktora tezimde emeği bulunan arkadaşlarım Ecz. Ayten Demirci ve Ecz. Esra ÜN ARSLAN'a, hayatım boyunca beni seven ve destekleyen aileme minnetimi sunarım.

Bu tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 201418011 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Esra BÜYÜK

İçindekiler

Tez Kapağı ve İç Kapak.....	i
Tez Onay Sayfası.....	ii
Tez Beyan Sayfası.....	iii
Benzerlik Raporu.....	iv
Önsöz ve Teşekkür.....	v
İçindekiler.....	vi
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi.....	vii
Şekiller Listesi.....	viii
Tablolar Listesi.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.GDM patofizyolojisi.....	2
2.2.Umbilikal kordun yapısı.....	3
2.3.Anjiyotensin II.....	4
2.4.Toll benzeri reseptörler.....	6
2.5.TAK-242.....	6
2.6.Berberin.....	7
2.7.Toll benzeri reseptör 4 - Diyabet ilişkisi.....	9
2.8.Anjiyotensin II - Toll benzeri reseptör 4 ilişkisi.....	11
3.GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1.Kimyasallar.....	14
3.2.İzole Organ Banyosu Çalışmaları.....	15
3.3.Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Analizi..	16
3.4.İstatistiksel Analiz.....	18
4.BULGULAR	19
5.TARTIŞMA	22
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	26
7.KAYNAKLAR	27
8.ÖZGEÇMİŞ	30
9. EKLER	31

Kısaltmalar ve Simgeler Listesi

AI: Anjiyotensin I

AII: Anjiyotensin II

AT1: Anjiyotensin II tip 1 reseptör

BBR: Berberin

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

GDM: Gestasyonel diyabetes mellitus

IL-1 β : İnterlökin 1 β

IL-6: İnterlökin 6

KCl: Potasyum klorür

KHS: Krebs-Henseleit Solüsyonu

L-NAME: L-Arjinin Metil Ester Hidroklorür

LPS: Lipopolisakkarit

mRNA: Mesajcı RNA

N: Örnek sayısı

NF- κ B: Nükleer faktör kappa B

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

OGTT: Oral glikoz tolerans testi

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RAS: Renin-anjiyotensin sistemi

RNA: Ribonükleik asit

qRT-PCR: Kantitatif Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

siRNA: Küçük interferans RNA

TLR: Toll benzeri reseptör

TLR4: Toll benzeri reseptör 4

TNF- α : Tümör nekroz faktör α

Şekiller Listesi

Şekil 1. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi.....	5
Şekil 2. Berberinin Yapısı.....	7
Şekil 3. İzole Organ Banyosu Uygulama Grupları	16
Şekil 4. Gestasyonel Diyabetes Mellitus Örnekleri Üzerinde Melting Curve (Erime Eğrisi) Analizi	17
Şekil 5. Grupların Anjiyotensin II'ye Verdiği Cevapların Yüzde Kasılma Cinsinden Emax Değerleri	20
Şekil 6. Grupların Anjiyotensin II'ye Verdiği Cevapların Yüzde Kasılma Cinsinden pD2 Değerleri	20
Şekil 7. Normal ve Gestasyonel Diyabetes Mellitus Umbilikal Arterlerde Toll benzeri reseptör 4 (a) ve Agtr1 (b) mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	21

Tablolar Listesi

Tablo 1. qRT-PCR Analizinde Kullanılan Primer Dizileri 17

Tablo 2. Grupların Emax ve pD2 Değerleri 21



ÖZET

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Gestasyonel Diyabetli ve Normal Gebelerden İzole Edilen Umbilikal Arterlerde Anjiyotensin II ve TLR4 İlişkisinin İncelenmesi

Esra BÜYÜK

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi / Konya-2021

Bu in vitro çalışmada, normal ve gestasyonel diyabetes mellitus (GDM) olan gebelerden alınan umbilikal arterlerde Anjiyotensin II (AII) ile Toll Benzeri Reseptör 4 (TLR4) ilişkisi araştırılmıştır. Normal ve GDM'li arterlerde AII'nin vazokonstriktör etkileri, bu etkilerin TLR4 agonist ve antagonistleriyle değişimi; ayrıca, normal ve GDM umbilikal arterlerinde AII ve TLR4 mRNA ekspresyonları belirlenmiştir.

Normal ve GDM'li umbilikal kordlardan hazırlanan arter preparatları 37°C' de sabit tutulan ve %95 O₂-%5 CO₂ karışımı ile sürekli gazlandırılan Krebs-Henseleit solüsyonu (KHS) içeren izole organ banyolarına alınmış ve uygulanan ajanlara alınan cevaplar izometrik olarak kaydedilmiştir. Normal ve GDM umbilikal arterlerde AII'nin (10⁻⁹-10⁻⁴ M) maksimum kasılma cevapları arasında anlamlı bir fark olmadığı; pD₂ değerleri karşılaştırıldığında ise, GDM grubunda AII'ye duyarlılık artışı olduğu saptanmıştır. GDM grubu umbilikal arterlerde Nω-Nitro-L-Arjinin Metil Ester Hidroklorür (L-NAME) (10⁻⁴ M, 20 dakika (dk.)) ve lipopolisakkarit (LPS) (0,3 µg/ml, 90 dk.) ile inkübasyon normal gebelerden alınan umbilikal arterlerden farklı olarak AII'ye duyarlılık artışı oluşmamıştır. Dokuların TAK-242 (10⁻⁶ M, 20 dk.) ile inkübasyonu GDM'li arterlerde normal gruptan farklı olarak maksimum cevabı değiştirmemiş fakat, AII'ye duyarlılığı azaltmıştır. BBR (10⁻⁵ M, 30 dk.) ise, GDM grubunda normal dokulardan farklı olarak maksimum cevap ve duyarlılıkta değişme oluşturmamıştır. qRT-PCR analizinde ise, normal ve GDM umbilikal arterlerde TLR4 ve Anjiyotensin II tip 1 reseptör (AT1) geni AGTR1'in mRNA düzeyinde ekspresyonları ölçülmüştür. Yapılan ölçümlerde gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

Bu sonuçlar, normal ve GDM umbilikal arterleri arasında AII'nin vazokonstriktör etkisinin TLR4 reseptörü aracılığıyla kısmen modüle edilebileceğini göstermektedir. Bu çalışma, AII ve TLR4'ü ilişkilendiren literatür bulgularıyla paralellik göstermektedir. Ancak, örnek sayısı artırılarak yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Anjiyotensin II, gestasyonel diyabetes mellitus, LPS, TAK-242, TLR4

ABSTRACT

REPUBLIC OF TURKEY
NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of the Relationship Between Angiotensin II and TLR4 on Umbilical Arteries isolated from Pregnants Of Normal And Gestational Diabetes

Esra BÜYÜK

Department Of Medical Pharmacology

PhD Thesis / Konya–2021

It has been investigated the relationship of Angiotensin II and Toll Like Receptor 4 (TLR4) in umbilical arteries of pregnant with normal and gestational diabetes mellitus (GDM) in this study in vitro. Vasoconstrictor effects of AII, the changes of these effects with the TLR4 agonist and antagonists, and mRNA expression levels of normal and GDM umbilical arteries have been determined.

Prepared arteries from normal and GDM umbilical cords have been inserted in an isolated organ bath filled with Krebs-Henseleit solution (KHS) and aired with a mixture of 95% O₂ -5% CO₂ under fixed temperature at 37°C and responses after agent applications have been recorded isometrically. No statistical significance has been observed in maximum contraction responses of AII (10⁻⁹-10⁻⁴ M) in normal and GDM umbilical arteries. As for the comparison of pD₂ values, increased sensitivity to AII has been shown in the GDM group. There is no increased sensitivity to AII has been seen in the GDM group umbilical arteries with the incubation of N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) (10⁻⁴ M, 20 minutes (min.)) and lipopolysaccharide (LPS) (0.3 µg/ml, 90 min.) contrary to normal arteries. As distinct from the normal group, the tissue incubation with TAK-242 (10⁻⁶ M, 20 min.) has not changed the maximum contraction response in the GDM arteries. However, sensitivity to AII has been reduced. No difference has been determined in the maximum contraction response and the sensitivity after BBR (10⁻⁵ M, 30 min.) incubation dissimilar from the normal tissues. mRNA expression levels of TLR4 and Angiotensin II type 1 receptor (AT1) gene AGTR1 have been measured. No statistical difference has been noted between the measured groups in the qRT-PCR analysis.

As a consequence, it has been shown TLR4 partially modulates vasoconstrictive effect of AII between the normal and GDM umbilical arteries. This study is in comply with literature findings on the affiliation of AII and TLR4. However, more comprehensive studies with high subject numbers are needed.

Key words: Angiotensin II, gestational diabetes mellitus, LPS, TAK-242, TLR4

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gebelik sürecinde vücutta çeşitli fizyolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Dokularda artan besin ihtiyacı glikoz ile indüklenen insülin salgısını artırır. Pankreatik beta hücrelerinin insülin salgılamada yetersiz kalması sonucu ortaya çıkan yüksek kan glikozu tablosu GDM olarak isimlendirilir (Plows ve ark., 2018). Türkiye’de GDM prevalansının %17,8 olduğu bildirilmiştir (IDF, 2019). GDM’nin gebelik sırasında ve sonrasında hem anne hem de çocuk açısından çeşitli komplikasyonlara neden olması, gebelik döneminde ilaç kullanım kısıtlılığı ve birden çok patofizyolojisinin bulunması konuyla ilgili araştırmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır (Johns ve ark., 2018).

GDM sırasında damar rezistansında meydana gelen bazı lokal değişiklikler (J. Li ve ark., 2014), plasenta ve umbilikal kordun büyük ölçüde sinirsel innervasyondan yoksun olması (Fujiyaimia ve ark., 1971; Reilly ve Russell, 1977) plasenta ve özellikle umbilikal kord üzerine etkili lokal vazomotor ajanlardan kaynaklanan patofizyolojiler üzerine dikkatimizi yoğunlaştırmıştır.

AII, umbilikal kord damarlarında etkili (Gao ve ark., 2017) güçlü vazokonstriksiyon oluşturabilen endojen bir moleküldür. TLR4 ise, diyabet patogeneziyle ilişkilendirilmiş bir reseptördür (Alibashe-Ahmed ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda AII’nin TLR4 ekspresyonunu artırdığı ve çeşitli etkilerine aracılık ettiği, benzer şekilde AII antagonistlerinin TLR4 ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (De Batista ve ark., 2014).

Bu çalışmada normal ve GDM umbilikal arterlerinde AII ve TLR4 reseptörü ilişkisinin deneysel olarak incelenmesi ve elde edilen çıktıların literatüre katkı sağlaması yanı sıra TLR4’ün olası tedavi hedefi olarak potansiyelinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Gebelik süresince diyabetojenik hormonların artışı pankreatik beta hücrelerinde hiperplaziye neden olur. İnsülin salgısının yetersiz kalmasıyla ortaya çıkan yüksek kan glikozu tablosu GDM olarak değerlendirilir. GDM yüksek doğum ağırlığı, preeklampsi, neonatal morbidite ve ölü doğum gibi sonuçlara neden olabilir. Ayrıca, yenidoğan için obeziteye, insülin intoleransına ve metabolik sendroma yatkınlık oluşturabilir (Mack ve Tomich, 2017). GDM prevalansının tüm dünyada 2019 yılı verilerine göre %7,5 ile 27 arası değişen oranlarda olduğu belirtilmiştir. Türkiye’de ise, %17,8 oranında görüldüğü ve 2019 yılında 15,506 canlı doğumu etkilediği bildirilmiştir (IDF, 2019).

Gebeliğin 24 ile 28. haftaları arasında yapılan oral glikoz tolerans testi (OGTT) ile hastalar GDM tanısı almaktadır. Açlık kan şekerinin 92 mg/dL’nin üzerinde olması GDM belirtisi olarak değerlendirilir. Oral olarak 75 gram glikoz yüklemesini takiben birinci ve ikinci saatlerde kan glikoz ölçümü yapılır. Kan glikozunun birinci saatte 180 mg/dL veya ikinci saatte 153 mg/dL’nin üzerinde olması durumunda GDM tanısı koyulur (Plows ve ark., 2018).

2.1. Gestasyonel Diyabetes Mellitus patofizyolojisi

Gebelik döneminde pek çok fizyolojik değişiklik meydana gelmektedir. Besin ihtiyacının karşılanması amacıyla insülin hassasiyetinde artış meydana gelir. Östrojen, progesteron, kortizol, leptin gibi lokal ve plasental hormonlar ise, insülin rezistansına neden olur. GDM patofizyolojisi temelde pankreas beta hücre disfonksiyonuna dayanır. GDM’de glikoz ile indüklenen insülin salınımının normal gebelere göre azaldığı bildirilmiştir (Plows ve ark., 2018).

Tip 2 diyabete genetik yatkınlık, iskelet kasında insülin rezistansı, leptin rezistansı, adiipoz dokunun enflamasyonu, tümör nekroz faktör α (TNF- α), interlökin 1 β (IL-1 β) ve interlökin 6 (IL-6) ile intrauterin maruziyet, oksidatif stres, plasentadan salınan hormonlar ve sitokinler GDM patofizyolojisinde rol oynamaktadır. Fazla kilo/obezite, yetersiz ve dengesiz beslenme, ileri yaş ve aile diyabet öyküsü GDM için yatkınlılaştırıcı faktörler olarak görülmektedir. Bu durum yenidoğanda fetal makrozomi, erken doğum, omuz çıkığı, hipoglisemi, solunumsal sıkıntılar gibi

komplasyonlara neden olmaktadır. GDM'ye maruz kalan çocuklarda ileriki dönemde prediyabet/diyabet, metabolik sendrom veya yüksek vücut-kitle indeksi görülme riskinin arttığı bildirilmiştir. Annede ise; preeklampsi, polihidraminoz, sezaryen doğum riski artmaktadır. Radikal tedavi yöntemi bulunmamakla birlikte genellikle doğumla birlikte annenin insülin rezistansı da düzelmektedir. Hayat tarzı değişiklikleri ve insülin takviyesi rutin tedavide kullanılmaktadır. (Johns ve ark., 2018; Plows ve ark., 2018).

Normal ve GDM gebelerde yapılan bir çalışma umbilikal arterde sistolik, diastolik basınç ve rezistansın diyabet grubunda, normal gebelere göre anlamlı ölçüde fazla olduğunu göstermiştir. Bu durum, gebeliğin ikinci trimesterinde GDM grubundaki fetüslerde azalmış kan akımı ve gelişim geriliğine neden olmuştur. (J. Li ve ark., 2014). Bu durum, umbilikal kordda meydana gelen lokal faktörlere dikkat çekmektedir.

2.2. Umbilikal kordun yapısı

Umbilikal kord, amniyon dokusundan köken alan, gebeliğin üçüncü haftasında gelişmeye başlayan iki arter bir venden oluşan, dışı Wharton jeli ile kaplı, koryon tabakasına bağlı doku içerisinde bulunan yapıdır. Umbilikal arter duvarı intima ve kalın bir kas tabakasından meydana gelir. Kas tabakasının iç kısmı boylamasına, dış kısmı ise sarmal yapıda olan iki katmanlı kas tabakasından oluşmaktadır. Fetüsün perfüzyonu umbilikal arterler ve vendeki kan akımı aktif olarak kan basıncı gradiyenti ve kord boyunca oluşan pasif basınç değişiklikleri ile sağlanır. Vasküler yapılardan birinin veya birkaçının eksik olması çeşitli anomalilerle ilişkilendirilmiştir. Sağlıklı gebelerde yapılan incelemelerde umbilikal arter ve ven çapının takip eden haftaya göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Umbilikal kord gebeliğin 40. haftasına kadar 60 cm uzunluğa ve 4 cm çapına erişebilmektedir (Spivack, 1946; Stallabrass, 1963; Spurway ve ark., 2012; Muniraman ve ark., 2018).

Yapılan çalışmalarda umbilikal arterlerde diğer arterlerden farklı olarak otonomik innervasyon bulunmadığı gösterilmiştir. Bir çalışmada umbilikal kordun nöral innervasyonu, nöral yapılara bağlanan antikorlar ve hematoksilen & eozin boyama ile araştırılmış, fetal beyin ve nöroblastoma dokuları kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her trimester için alınan üçer örnekte (n=9) yapılan incelemede

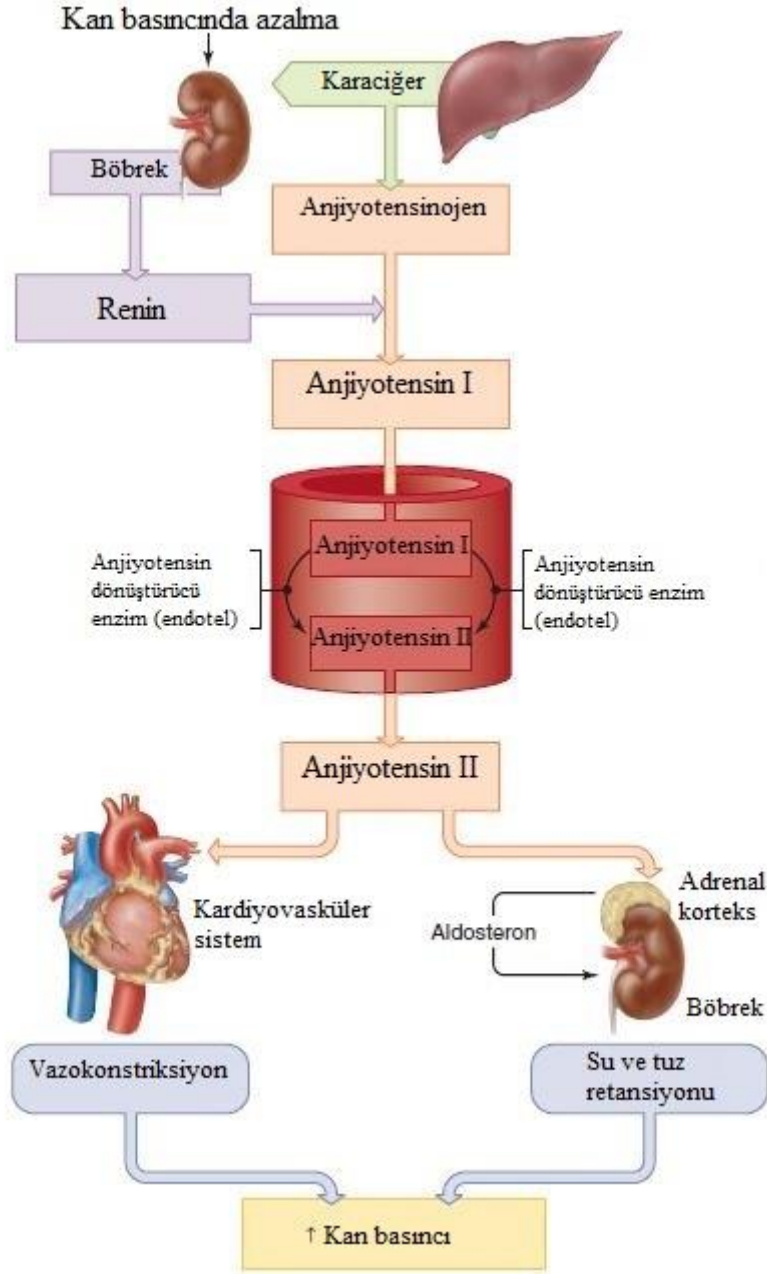
kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir boyanma gözlenmemiştir (Fox ve Khong, 1990). Başka bir çalışmada ise, 5 normal ve 2 diyabetik gebeden alınan umbilikal kordlar adrenerjik ve kolinerjik sinir uçlarını görüntülemek amacıyla floresan boyama ile incelenmiştir. Fare iskelet kası ve adrenal bez dokuları ise, kontrol amacıyla kullanılmıştır. Kontrol kesitlerinde pozitif boyanmalar görülürken, umbilikal kord kesitlerinde zemin boyanması dışında herhangi bir boyanma gözlenmemiştir (Reilly ve Russell, 1977).

Umbilikal damarların otonom inervasyonunun olmaması nedeniyle; bu damarları etkileyen endojen veya eksojen vazoaaktif ajanlar plasental dolaşımın düzenlenmesi ve fetüsün gelişimi açısından önemlidir. Bu nedenle kanda bulunan AII, arjinin, vazopressin ve atriyal natriüretik peptid; sinir uçlarından salınan asetilkolin ve noradrenalin; östrojen, progesteron ve glukokortikoidler gibi endokrin hormonlar ve bradikinin, histamin, serotonin, prostaglandinler, lökotrienler, endotelin ve adenosin gibi otokoidler umbilikal damar tonusun düzenlenmesine önemli oranda katkı sağlamaktadır (Walters, 1992; X. Li ve ark., 2016).

2.3. Anjiyotensin II (AII)

Renin-anjiyotensin sistemi (RAS) sıvı elektrolit dengesinin düzenlenmesinde ve böbrekler yoluyla kan basıncının kontrolünde önemli rol oynamaktadır.

Böbrekte jukstaglomerüler epitel hücrelerinde sentezlenen preprorenin prorenine dönüştürülerek salınır veya granüllerde renin olarak depolanır. Renin, karaciğerden salınan anjiyotensinojeni anjiyotensin I' (AI)e ve AI ise, anjiyotensin dönüştürücü enzim ile AII'ye dönüştürülmektedir (Harvey ve ark., 2019). AT1 reseptörüne bağlanan AII, su-tuz retansiyonu ve vazokonstriksiyona neden olur. Renin sentezi primer olarak baroreseptörler ve maküla densa tarafından kontrol edilmektedir. AII, aldosteron sentezleyen enzimlerin salınımını artırarak, adenokortikal hücrelerin proliferasyonunu artırarak ve AT1 reseptörlerini indükleyerek aldosteron salınımını sağlamaktadır (Şekil 1)(Matsusaka ve Ichikawa, 1997).



Şekil 1. Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (Barrett ve ark., 2012).

Ganong's Review Of Medical Physiology 24.baskıdan Türkçeleştirilerek alınmıştır.

RAS'ın sistemik etkilerin yanı sıra doku düzeyinde de otokrin ve parakrin rolleri bulunmaktadır. Kalp, böbrek ve adrenal bez gibi dokularda bulunan AII'nin lokal olarak sentezlendiği; anjiyotensin dönüştürücü enzimin ise, vasküler endotel, renal proksimal tübüler endotel, kalp, akciğer, ince bağırsak, kolon ve beyin bazı bölümlerinde bulunduğu bildirilmiştir. Bunun dışında dokuda bulunan başka enzimler de AII sentezinden sorumludur. AT1 reseptörü de benzer şekilde dokularda dağılım göstermektedir. Bu sayede dokuda AT1 reseptörünün vazokonstriktör, proliferatif, trombotik ve aritmojenik etkilerine aracılık etmektedir (Nehme ve ark.,

2019). AII düzeyindeki artış AT1 reseptör ekspresyonunu da artırmaktadır. Fakat, AII'ye kronik maruziyetin reseptörde down-regülasyona neden olduğu gösterilmiştir. Bunun dışında pek çok madde AT1 reseptörünün ekspresyonunu etkilemektedir. AII, AT1 reseptörüne bağlandıktan sonra G-protein ve tirozin kinaz aracılı bir dizi sinyal yolağını aktive eder ve hücre sağ kalımı, hipertrofi, oksidatif stres, hipertansiyon, hiperlipidemi, ateroskleroz ve enflamasyon gibi olayları etkilemektedir (Mehta ve Griendling, 2007).

2.4. Toll benzeri reseptörler (TLR)

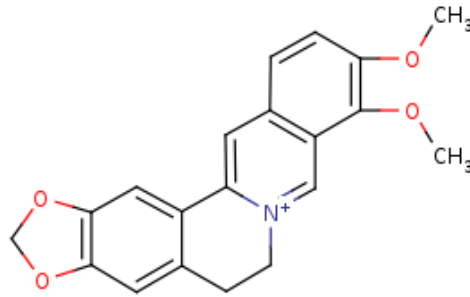
TLR insan hücre membranında veya endozomlarında bulunan ve 10 üyeden oluşan bir reseptör ailesidir. Doğuştan ve adaptif immünitinin bir parçası olarak kabul edilirler. Eksojen ligandları patojenler ve LPS olup; uyarıldıklarında nükleer faktör kappa B (NFκB) ve mitojenle aktifleşen protein kinaz yollarını aktive ederler. Bunun sonucunda pek çok proenflamatuvar sitokin, kemokin ve eşlik eden diğer moleküllerin salınımına yol açarlar (Vidya ve ark., 2018). Toll benzeri reseptörlerden TLR4 ise; diyabet, obezite, metabolik sendrom başta olmak üzere kardiyovasküler, otoimmün, santral sinir sistemi ve psikiyatrik pek çok hastalıkla ilişkilendirilmektedir. TLR4'lerin uyarılma ve enflamasyon anında salınan β-defensin, hyalüronik asit, heparin, P maddesi gibi endojen ligandları bulunmaktadır. LPS ise başlıca eksojen ligandlarıdır. Etanolamin türevleri, CCL-34, KRN7000 ve TAK-242 sentetik antagonistlerini teşkil eder. Kurkumin, glisirizin, kafeik asit fenetil ester, sinnamaldehit, epigallokateşin gallat, paklitaksel, morfin ve nalokson gibi doğal ajanların da TLR4 modülatörleri olduğu bildirilmiştir (Peri ve Calabrese, 2014).

2.5. TAK-242

Takeda Farmasötik tarafından sentetik olarak geliştirilen TAK-242, sitokin ve enflamatuvar ajanların salınımını inhibe eden özelliğinden dolayı sepsis tedavisinde değerlendirilmiştir. Yapılan Faz 3 çalışması yeterli antienflamatuvar etkiyi sağlayamadığı gerekçesiyle durdurulmuştur. TLR4'ün potent antagonistlerinden biri olan TAK-242, LPS ile yarışmasız olarak TLR4 inhibisyonuna neden olur. (Romerio ve Peri, 2020). Literatürde resatorvid ve CLI-095 olarak da isimlendirmeleri mevcuttur.

2.6. Berberin (BBR)

BBR, Asya ve Avrupa ülkelerinde kullanılan *Berberis vulgaris* başta olmak üzere çeşitli bitkilerin (*Berberis aristata* L., *Berberis croatica* L., *Berberis aquifolium* L., *Coptis chinensis* L., *Coptis japonica* L., *Hydrastis Canadensis* L) kök, rizom, gövde ve kabuğundan elde edilen alkaloit yapıda bir etkin maddedir. Tip II diyabet, polikistik over, postmenopozal osteoporoz, metabolik sendrom, ateroskleroz, konjestif kalp yetmezliği, ventriküler taşiaritmi, radyoterapi komplikasyonları, akut iskemik inme, diyare gibi hastalıkların tedavisinde terapötik etkileri ve antibakteriyel etkinliği araştırılmıştır (Imenshahidi ve Hosseinzadeh, 2019).



Şekil 2. Berberinin yapısı (BRENDA, 2021).

BBR ve kurkumin gibi doğal ajanların TLR4 reseptörü üzerine antagonist etkileri olduğu bildirilmiştir (Molteni ve ark., 2018).

Streptozosinle diyabet oluşturulmuş sıçanlarda berberinin farklı dozlarda (50, 100 ve 200 mg/kg/gün) uygulaması yapılarak kan basıncı ve vazodilatasyon üzerine etkileri araştırılmıştır. BBR diyabet grubuna göre doza bağımlı olarak vücut ağırlığı ve kan glikozu değerlerini anlamlı ölçüde azaltmıştır ($p<0,05$). Sıçanlardan izole edilen orta serebral arterlerin asetilkolin aracılı gevşemesinin 100 ve 200 mg/kg/gün BBR uygulanan diyabetik grubunda diyabet kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$). Serebral arterlerden izole edilen vasküler düz kas hücreleri ile yapılan ölçümlerde ise, 100 mg/kg/gün BBR uygulanan diyabet grubunda kalsiyum ile aktiflenen potasyum kanallarının fonksiyonelliğini ve ekspresyonunu diyabet kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artırmıştır ($p<0,05$) (Ma ve ark., 2017).

BBR'nin pozitif inotrop etkisini ve etki mekanizmasını belirlemek amacıyla sıçanlardan izole edilen kalp preparatları Langendorf aparatında incelenmiştir. BBR 10-20 μM konsantrasyonlarında kalp kontraktilitesinde kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artış oluşturmuş; 100-300 μM arası konsantrasyonlarda ise, izole sol ventrikül kas striplerinde doza bağımlı şekilde kasılmayı artırmıştır. BBR'nin 30-300 μM arası konsantrasyonlarının sol ventrikül miyositlerinde intraselüler kalsiyum miktarını kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artırdığı gösterilmiştir ($p<0,05$). Kalsiyumsuz ortamda 300 μM BBR ile yapılan çalışmada gerilim $17,7 \pm \% 19,8$ olarak ölçülürken, kalsiyumlu ortamda gerilim $121,0 \pm \% 18,3$ olarak ölçülmüştür. Bu durum BBR'nin kasılma etki mekanizmasının ekstraselüler kalsiyum ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür. L-tipi kalsiyum kanalı inhibitörü nifedipin varlığında BBR'nin oluşturduğu kasılma, yalnız BBR grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0,05$). Fakat, nifedipin varlığında intraselüler kalsiyum düzeyinde anlamlı bir azalma meydana gelmemiştir ($p>0,05$). FPL-64716 isimli kalsiyum kanal aktivatörü BBR ile alınan kasılma cevaplarını artırmıştır. Sodyum varlığında elde edilen BBR kasılmasının sodyumsuz ortamda azaldığı da bulgular arasındadır ($p<0,05$). Bu bulgular ışığında BBR'ye bağlı kasılma cevaplarına kalsiyum ve sodyumun aracılık ettiği öne sürülmüştür (Zhao ve ark., 2020).

Diğer bir çalışmada, insülinoma hücreleri LPS ile 24 saat indüklenerek antienflamatuvar yanıt ve hücre sağ kalımı yönünden değerlendirilmiştir. Pankreas beta hücrelerinin sağ kalımı LPS inkübasyonu ile anlamlı ölçüde azalmıştır ($p<0,05$). BBR ve TAK-242 uygulaması ise; hücre sağ kalımındaki azalmayı anlamlı ölçüde önlemiştir ($p<0,05$). Hücrelerinin LPS ile muamelesinden sonra süpernatanda ölçülen insülin miktarı yükselmiştir. BBR ve TAK-242 uygulamasıyla ölçülen insülin miktarı azalmıştır (Y. Wang, 2014).

BBR'nin diyabetik nefropati üzerine etkilerini araştırmak amacıyla Sprague–Dawley türü sıçanlar kullanılarak 65 mg/kg streptozotosin ile diyabetik nefropati modeli oluşturulmuştur. Sekiz haftalık deney süresi boyunca BBR çeşitli konsantrasyonlarda (50, 100 ve 200 mg/kg/gün) gavaj yoluyla uygulanmıştır. Deney grupları kontrol, diyabetik nefropati ve diyabetik nefropati ile BBR'nin 3 farklı dozu uygulanan gruplar olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Çalışma sonunda BBR'nin 100 ve 200 mg/kg/gün uygulandığı gruplarda diyabetik nefropati grubuna göre açlık kan

glikozu, idrar total protein, serum kreatinin, kan üre azotu, IL-1 β ve IL-6 düzeylerinde anlamlı iyileşme gözlenmiştir ($p<0,05$). Aynı şekilde TLR4 ve ilgili yolaktaki bazı parametreler de BBR'nin belirtilen gruplarında anlamlı azalma görülmüştür ($p<0,05$). İn vitro diyabetik nefropati oluşturmak amacıyla fare podosit hücreleri 30 mM yüksek glikoz konsantrasyonu ile 24 saat inkübe edilmiştir. BBR (60 ve 90 μ M) gruplarında kontrol grubuna göre TLR4, IL-1 β , IL-6 ve apoptoz düzeylerinde belirgin azalma tespit edilmiştir. Ayrıca, podosit hücrelerinde BBR etkilerinin TAK-242 ile paralellik göstermesi ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) aktivatörü ile geri çevrilmesi nedeniyle BBR'nin TLR4/NF- κ B yolağı inhibitörü olabileceği düşünülmüştür (Zhu ve ark., 2018).

Vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu üzerine BBR'nin etkisini belirlemek amacıyla sıçanlarda karotid hasar modeli oluşturulmuştur. Sıçanlara balon anjiyografi yöntemiyle hasar oluşturulduktan sonra 14 gün AII veya epidermal büyüme faktörü uygulanarak vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu incelenmiştir. Hasar oluşturulmadan 14 gün önce BBR uygulamasına başlanan ve AII uygulaması sırasında devam eden BBR grubunda AII'nin indüklediği hücre migrasyonu BBR uygulanmayan gruba göre anlamlı ölçüde önlenmiştir ($p<0,05$)(Lee ve ark., 2006).

2.7. TLR4-Diyabet ilişkisi

Bir çalışmada, MIN-6 fare insülinoma hücreleri ile donörlerden elde edilen insan pankreatik beta hücrelerinde TLR4 aktivasyonunun insülin salınımı ve hücre sağ kalımı üzerine etkisi araştırılmıştır. Hücreler LPS'nin artan dozlarıyla (0-50 ng/ml) inkübe edilmiştir. LPS ile 48 saat inkübasyon yapılan grupta sağ kalım, kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azalmıştır ($p<0,05$). Ayrıca, insülin mRNA ve protein ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. LPS uygulaması beta hücre canlılığını da azaltmıştır. Bulgular MIN-6 hücrelerinde de benzerlik göstermiştir (Garay-Malpartida ve ark., 2011).

TLR4 aracılı enflamasyonun insülin rezistansı ve karaciğer yağlanması için yatıklaştırıcı faktör oluşturabileceği düşünülmüş ve bunu araştırmak amacıyla hepatosit TLR4 knockout fareler ile çalışılmıştır. On hafta kronik ve 3 hafta akut olmak üzere yüksek yağlı diyetle beslenen TLR4 knockout ve kontrol grubu fareler

insülin toleransı testlerine tabi tutulmuşlardır. İncelenen farelerde OGTT yönünden herhangi bir farklılık görülmemiştir. İnsülin hassasiyeti ise; glikoz infüzyon hızı, kaslarda glikoz geri alımı ve glikoz işlenmesi parametreleri ile değerlendirilmiş ve bu parametrelerde 3 hafta yüksek yağlı diyetle beslenen grupta anlamlı iyileşme kaydedilmiştir ($p<0,05$). TLR4 aracılı enflamatuvar yanıt olmadığında 10 haftalık kronik diyet ise, insülin rezistansını artırmıştır (Tao ve ark., 2017).

TLR4'ün pankreas beta hücreleri üzerine etkinliğini araştırmak üzere normal ve TLR4-knockdown sıçanlar normal ve yüksek yağlı diyetle beslenmiştir. İnsülin ve HOMA- β değerleri yağlı diyetle beslenen sıçanlarda normal diyetle beslenen kontrol grubu sıçanlara göre azalmıştır. HOMA-IR, insülin ve glikoz rezistansı artmıştır ($p<0,05$). Yağlı diyetle beslenen TLR4-knockdown grubundaki sıçanlarda ise, normal yağlı diyet alan sıçanlara göre bu etkiler anlamlı ölçüde önlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, B-TC6 fare adacık tümör hücresinde palmitik asit ve LPS ile indüklenen toksisite sonucu kontrol grubuna göre apoptoz düzeyi artmış, bazal ve glikoz ile indüklenen insülin salınımı anlamlı ölçüde azalmıştır ($p<0,05$). TLR4-knockdown grubunda ise bu etkiler anlamlı ölçüde engellenmiştir ($p<0,05$) (Yan ve ark., 2020).

Otoimmün diyabette TLR4 aktivasyonuna bağlı proenflamatuvar faktörlerin rolünü belirlemek amacıyla non-obez diyabetik fareler kullanılmıştır. Kontrol grubu ve TAK-242 uygulanan gruplarda doğumdan itibaren 8 ila 26 hafta arasında otoimmün diyabet gelişimi izlenmiştir. Süre sonunda TAK-242 uygulanan sıçanların %50'sinde diyabet gelişimi engellenirken, kontrol grubunun tamamı diyabet ile sonuçlanmıştır. Yapılan immünohistokimya analizinde enflamatuvar ajanların pankreas beta hücrelerine infiltrasyonu TAK-242 uygulamasıyla doza bağımlı olarak azalmıştır (Alibashe-Ahmed ve ark., 2019).

Tip II diyabet ile enflamasyonun ilişkisini araştıran bir çalışmada TLR4'ün diyabet patogenezindeki rolünü belirlemek amacıyla, insan donörlerden izole edilen pankreas adacıklarında TLR4'ün LPS ile indüklenmesi sonucunda IL-1 β , IL-8 ve TNF- α salınımının arttığı belirtilmiştir. Pankreas adacıklarının LPS ile 72 saatlik inkübasyonundan sonra beta hücrelerinde apoptoz ve kaspaz-3 seviyesinin anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir ($p<0,05$). Aynı zamanda glikozla indüklenmiş insülin salınımında da düşüş gözlenmiştir. LPS uygulanmış beta adacık hücrelerinde TLR4 inhibitörü TAK-242 varlığında ise, IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α 'nın mRNA

ekspresyonlarında azalma kaydedilmiştir. Kaspaz-3 düzeyindeki artış da TAK-242 uygulamasıyla önlenmiştir (He ve ark., 2019).

Sıçanlardan elde edilen pankreas adacıklarında TLR4'ün enflamatuvar yanıt üzerine bazı etkileri incelenmiştir. TLR4 düzeyinin LPS uygulamasıyla zamana bağlı olarak arttığı, 24 saat uygulamadan sonra başlangıca göre anlamlı düzeyde farklı olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Adacık hücrelerinde LPS uygulamasının reaktif oksijen türlerinin üretimini ve apoptozu ve kaspaz-3'ü artırdığı, anti-TLR4 ve TLR4 knockdown gruplarında ise, bu artışın anlamlı düzeyde azaltıldığı gözlenmiştir ($p>0,05$). Ayrıca, LPS glikoz ile indüklenen insülin salınımını kontrol grubuna göre azaltırken, anti-TLR4 ve TLR4 knockdown gruplarındaki azalma LPS'ye göre önemli ölçüde önlenmiştir ($p<0,05$) (X. Wang ve ark., 2017).

Başka bir çalışmada pankreas beta hücrelerine LPS uygulaması sonucu IL-6 ve TNF- α düzeyleri yükselmiştir. TLR4 inhibitörlerinden BBR ise, bu artışı doza bağımlı olarak azaltmıştır. TAK-242 uygulaması da benzer etkiler oluşturmuştur. LPS uygulamasıyla belirgin olarak düşüş gösteren hücre canlılığı, BBR'nin artan dozda uygulanmasıyla artış göstermiştir. Benzer şekilde LPS ile indüklenen pankreas beta hücrelerinde BBR uygulamasından sonra apoptoz düzeyinde düşüş izlenmiştir. Beta hücrelerinden insülin salınımı ise, LPS uygulanmasıyla artış göstermiştir. BBR uygulaması artan insülin salınımını doza bağımlı olarak azaltmıştır. TAK-242 de insülin salınımını azaltıcı yönde bir etki oluşturmuştur (Y. Wang, 2014).

2.8. AII-TLR4 ilişkisi

AII ile TLR4'ün ilişkilendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Hipertansiyonda artmış RAS sistemine TLR4'ün etkisini belirlemek amacıyla normal ve hipertansif sıçanlar kullanılmıştır. Ayrıca, bu sıçanlardan izole edilen vasküler düz kas hücrelerinden primer kültür elde edilmiştir. Normal ve hipertansif sıçanlardan izole edilen aort şeritlerinde TLR4 mRNA ekspresyonu incelendiğinde, hipertansif sıçanlarda TLR4 ekspresyonunun normale göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu artış losartan uygulaması ile anlamlı ölçüde azalmıştır. TLR4 antikoru uygulaması ise, fenilefrinle indüklenen kasılmayı azaltırken; asetilkoline bağlı vazodilatasyonu artırmıştır (De Batista ve ark., 2014).

AII, AT1 reseptörü aracılığıyla enflamatuvar olayları tetiklemektedir (Mehta ve Griendling, 2007). AII ve LPS'nin proenflamatuvar ve vazomotor etkilerini karşılaştırmak amacıyla fare mezenterik arteri izole edilmiştir. İzole edilen arterler LPS ve/veya AII ile inkübe edilmiştir. LPS, mezenterik arterlerde karbakol ile oluşturulan vazodilatasyonu anlamlı ölçüde inhibe etmiştir ($p<0,05$). Fenilefrin ile oluşturulan kasılma yanıtını AII anlamlı düzeyde artırırken; LPS ile alınan yanıt anlamlı düzeyde değildir. Dokularda IL-6 ekspresyonu yalnızca LPS inkübasyonu ile anlamlı ölçüde artış göstermiştir ($p<0,05$). AGTR1a mRNA ekspresyonu tüm inkübasyon gruplarında taze dondurulan arterlere göre belirgin azalma göstermiştir ($p<0,05$). TLR4 mRNA ekspresyonu ise, tüm inkübasyon gruplarında taze dondurulmuş arterlere göre anlamlı ölçüde artmıştır ($p<0,05$). NO ile ilgili ölçülen parametrelerde ise, herhangi bir farklılık izlenmemiştir (Outzen ve ark., 2017).

C57BL/6 cinsi farelere 28 gün boyunca AII infüzyonu ve LPS uygulamasının TLR4 ekspresyonu üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Uygulamanın son 14 günü ise, TLR4 antagonisti uygulanmıştır. Bu süre sonunda korpus kavernosum dokusu şerit halinde izole edilmiştir. Fenilefrin ile kasılma yanıtları alınan şeritlerde AII uygulanmış dokuların kasılma miktarı daha fazla ölçülmüştür. TLR4 antagonisti uygulaması bu kasılmayı anlamlı olarak önlemiştir ($p<0,05$). AII'ye ilaveten L-NAME ve atropin varlığında artan fenilefrin kasılmaları kronik TLR4 antagonisti uygulanan grupta önlenmiştir. AII uygulaması yapılan farelerde kontrol grubuna göre yüksek kan basıncı oluşmuş olup, bu durum, anti-TLR4 uygulaması ile nispeten azaltılmıştır (Nunes ve ark., 2017).

C57BL/6 cinsi farelerden izole edilen kavernoza vasküler düz kas hücreleri 12-24 saat negatif kontrol, AII ve pozitif kontrol (LPS) ile inkübe edilmiştir. AII veya LPS ile muamele gören dokularda TLR4 boyanması daha fazla izlenmiştir. Asetilkolinin 10^{-7} M konsantrasyonunda AII ve TLR4 antagonisti grubunda elde edilen gevşeme yanıtları sadece AII uygulanan gruba göre anlamlı olarak daha fazladır ($p<0,05$)(Nunes ve ark., 2017).

AII'nin indüklediği enflamatuvar yanıt ve aterosklerotik olaylar üzerine TLR4 sinyal yolağının etkilerini belirlemek amacıyla sıçan torasik aortundan izole edilen vasküler düz kas hücrelerinde AII uygulamasından önce TLR4 antikoru ile preinkübasyon yapılması AII'ye bağlı yanıtları önlemiştir. Hücrelere AII uygulaması

TNF- α miktarını kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseltmiştir. TLR4 antikoru uygulaması yapılan gruplarda TNF- α düzeyindeki artış doza bağımlı olarak engellenmiştir ($p<0,05$). Başka bir grupta vasküler düz kas hücreleri AII veya LPS ile 24 saat inkübe edilmiştir. TLR4 ekspresyonu immünofloresan boyama ve konfokal mikroskop ile değerlendirilmiştir. AII ve LPS inkübasyonu yapılan gruplarda kontrol grubuna göre TLR4 boyanması açısından doza bağımlı bir artış izlenmiştir ($p<0,05$)(Ji ve ark., 2009).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2020/2400 sayılı etik onayı ile yapılmıştır. Çalışmada, 01/02/2021-30/04/2021 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan sezaryen ve normal doğum sırasında tıbbi atık olarak ayrılan umbilikal kordlar kullanılmıştır.

Umbilikal kord örnekleri 7 normal gebe ve 7 GDM gebeden elde edilmiştir. Örnekler kuru buz yardımıyla soğuk KHS içinde Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarı'na getirilmiştir. Kordlardan buz üzerinde izole edilen arterler, yaklaşık 50 mg miktarında olacak şekilde qRT-PCR ile incelenmek üzere sıvı azot içerisinde taşınarak buzdolabında -80°C'de muhafaza edilmiştir.

İzole organ banyosundaki analizler için çevre dokulardan temizlenmiş 3-4 mm genişliğindeki arterlerden şerit şeklinde preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan şeritler sıcaklığı 37°C'de sabit tutulan %95 O₂-%5 CO₂ karışımı ile sürekli gazlandırılan KHS solüsyonu içeren 10 ml'lik izole organ banyolarına alınmıştır. Dokular 1 gram istirahat gerilimi altında 60 dakika dinlendirilmiş ve bu süre boyunca 15 dakika aralıklarla KHS ile yıkanmıştır. Dinlenme periyodunun bitiminde uygulanan ajanlara alınan cevaplar bir transdüser (BIOPAC MP36, California USA) yardımı ile izometrik olarak (Commat, Ankara, TÜRKİYE) kaydedilmiştir (Sahin ve Dagtekin, 2018).

3.1. Kimyasallar

Lipopolisakkarit L3129 (distile suda ile 0,3 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanmıştır),

TAK-242 614316 (10⁻² M stok konsantrasyonu dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlanmış distile su ile banyoda 10⁻⁶ M konsantrasyona ulaşacak şekilde seyreltilerek uygulanmıştır),

Berberin hidroklorür (BBR) (B3251 Sigma): DMSO-distile su (1:1) ile 10⁻⁵ M konsantrasyonda hazırlanmıştır,

N ω -Nitro-L-Arjinin Metil Ester Hidroklorür (L-NAME) N5751 (distile suda hazırlanmıştır) Sigma'dan,

Anjiyotensin II (human) (AII) 17150 (distile suda hazırlanmıştır) Cayman Chemical'dan temin edilmiştir.

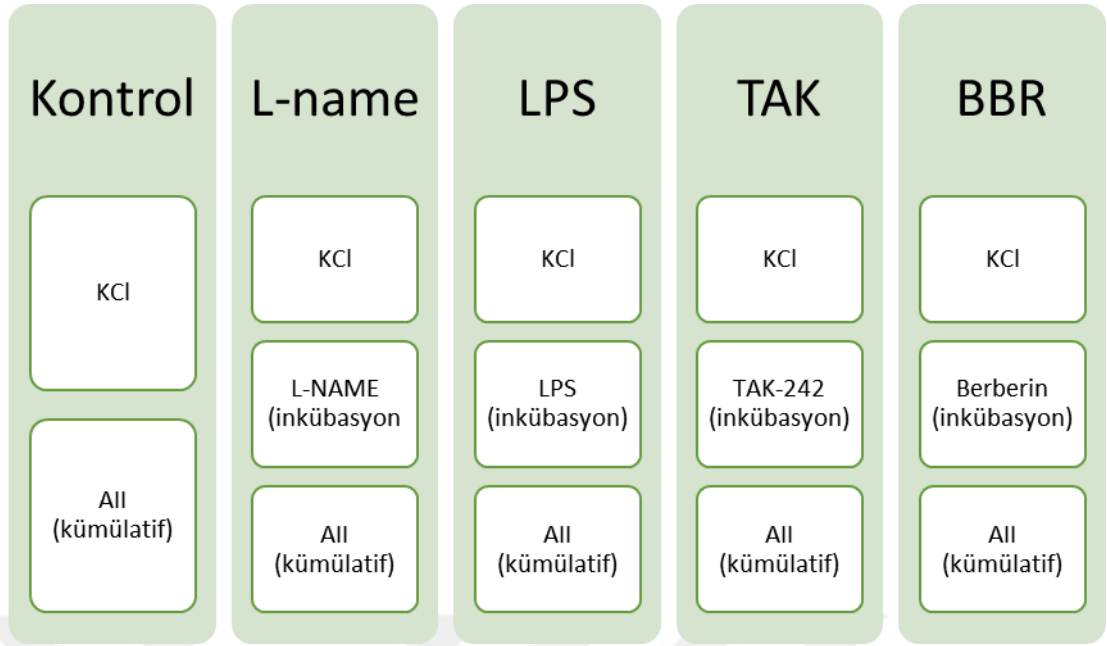
KHS [mM]: NaCl 118.30; KCl 4.69; KH₂PO₄ 1.18; CaCl₂.6H₂O 1.25; MgSO₄ 1.17; NaHCO₃ 25.00; Glikoz 11.10 ve 80 mM KCl [mM]: NaCl 4.37; KCl 80; KH₂PO₄ 1.2; CaCl₂.6H₂O 2.50; MgSO₄ 1.50; NaHCO₃ 25.00; Glikoz 11.10 çözeltileri belirlenen miktarlarda distile su ile hazırlanmıştır.

LPS grubunda dokular, distile su ile 0,3 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanmıştır. TAK-242 grubunda, DMSO ile TAK-242'nin 10⁻² M stok konsantrasyonu hazırlanmıştır. Ardından distile su ile banyoda 10⁻⁶ M konsantrasyona ulaşacak şekilde seyreltilerek uygulanmıştır. L-NAME distile su ile banyo konsantrasyonu 10⁻⁶ M olacak şekilde hazırlanmıştır. BBR, DMSO-distile su (1:1) ile 10⁻⁵ M konsantrasyonda hazırlanmıştır. AII, distile su ile 10⁻⁴ M konsantrasyonda hazırlanıp 10⁻⁹ M'a kadar distile su ile seri dilüsyonlar elde edilmiştir. Çözeltilerde kullanılan DMSO, vasküler herhangi bir etki oluşturmayacak miktardadır (<0,1) (De Batista ve ark., 2014) ve belirtilen tüm konsantrasyonlar banyo içi konsantrasyonlardır.

3.2. İzole Organ Banyosu Çalışmaları

Kontrol grubu olarak AII'nin umbilikal arter şeritlerinde bazal tonus üzerine etkileri araştırılmıştır. Dokular, 15 dakikalık yıkama peryotları olmak üzere toplam 30 dakika KHS solüsyonunda dinlendirilmiştir. Dinlenme peryodunun bitiminde organ banyosu içine 80 mM KCl ilave edilerek dokularda maksimum kasılma cevapları alınmış ve dokular yıkanarak bazal düzeye kadar gevşemesi sağlanmıştır. Daha sonra banyoya AII (10⁻⁹-10⁻⁴ M) kümülatif olarak uygulanarak kasılma cevapları kaydedilmiştir.

Diğer gruplarda ise AII ile kasılma cevapları alınmadan önce; dokular organ banyosuna ilave edilen LPS (0,3 µg/ml, 90 dk) (Barona ve ark., 2011), TAK-242 (10⁻⁶ M, 20 dk.) (Farzi ve ark., 2015), L-NAME (10⁻⁶ M, 20 dk) (Sahin ve Dagtekin, 2018) ve berberin (10⁻⁵ M, 30 dk.) (Bolle ve ark., 1998) ile inkübe edilmiştir.



Şekil 3. İzole organ banyosu uygulama grupları (n=7).

3.3. qRT-PCR analizi

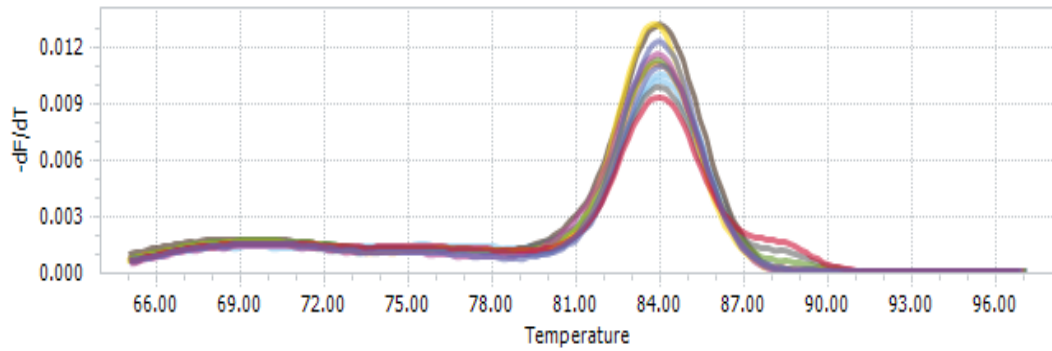
İzole edilen arterlerden alınan 25-50 mg'lık örnekler bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. RNA izolasyon kiti (SanPrep Column microRNA Miniprep Kit, Katalog numarası: SK8811, Bio Basic, Amerika Birleşik Devletleri) prosedürüne uygun olarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Parçalanmış örnekler 1 ml ekstraktör eklenip 10 dakika bekletilerek örneklerin homojen olması sağlanmıştır. Daha sonra 0,2 ml kloroform ilave edilip 12.000 g ile 10 dakika santrifüj edilmiştir. Ayrılan süpernatant etanol ilavesi ile muamele edilmiştir. Yapılan seri santrifüjler ile saf RNA eldesi amaçlanmıştır. Elde edilen RNA'ların kalite kontrolü ve konsantrasyonları spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. A260:A280 oranı saf RNA ile uyumlu olan örnekler çalışmada kullanılmıştır. Hemen kullanılmayacak örnekler cDNA sentezine kadar -80°C'de saklanmıştır.

cDNA analizi için çözünen örnekler kit (miRNA All-In-One cDNA Synthesis Kit, katalog numarası: G898, ABM, Amerika Birleşik Devletleri) uyarınca hazırlanan karışıma eşit yoğunlukta örnek içerecek şekilde normalize edilerek ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım termal cyclor (Bio Rad T100)'da kit talimatlarına uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilmiştir.

Elde edilen cDNA, Master Mix (Blastaq Green 2X qPCR MasterMix, katalog numarası: G891, ABM, Kanada) prosedüründe tavsiye edilen oranda nükleaz free distile su ile dilue edilerek qRT-PCR işlemleri için kullanılmıştır. qRT-PCR Master Mix, dilue edilmiş cDNA ve SYBR® Green boyası ile Tablo 1’de belirtilen primerler kullanılarak kitin protokolüne uygun şekilde LightCycler® 96 (Roche) qRT-PCR cihazında hedef genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. PCR koşulları ve siklus sayısı kullanılan kite uygun ayarlanarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 4). Çalışmada belirlenen her bir grup için veri analiz programları kullanılarak TLR4 ve AGTR1 genlerinin ekspresyon düzeyleri GAPDH housekeeping geni ile normalize edilerek belirlenmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubu baz alınarak, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak kat değişimi (fold-change) şeklinde ifade edilmiştir. Veriler duplike olarak elde edilmiştir.

Tablo 1. qRT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri

Genler	Primer dizileri
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3' forward 5'-CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT-3' reverse
TLR4	5'-GGCTTACTTTCACTTCCAAC-3' forward 5'-AGAAGTTGTTGTGGCTCATA-3' reverse
AGTR1	5'-CCAAATCCCACTCAAACCTTTC-3' forward 5'-GAACTCTCATCTCCTGTTGCTC-3' reverse



Şekil 4. GDM örnekleri üzerinde melting curve (erime eğrisi) analizi

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmada uygulanan ajanlara alınan cevaplar AII ile alınan maksimum kasılma cevabının yüzdesi (%) şeklinde değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler bilgisayar ortamına aktarılarak GraphPad Prism 5.0 paket programı yardımıyla analiz edilmiştir. Tamamı sürekli sayısal nitelikte olan verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile belirlenmiştir. Tümü normal dağılıma uygun olan verilerin özetlenmesinde aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma (SD) kullanılmıştır. E_{maks} (% maksimum kasılma) ve pD₂ (%50 oranında kasılma oluşturan konsantrasyonun negatif logaritması) değerleri hesaplanmıştır. Grup karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analiz (ANOVA) kullanılırken, anlamlı çıkan gruplar posthoc Dunnett's test ile değerlendirilmiştir. qRT-PCR analizi grupların $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerlerinin Mann Whitney yöntemiyle karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucu p değerinin 0,05'den küçük olması durumunda aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

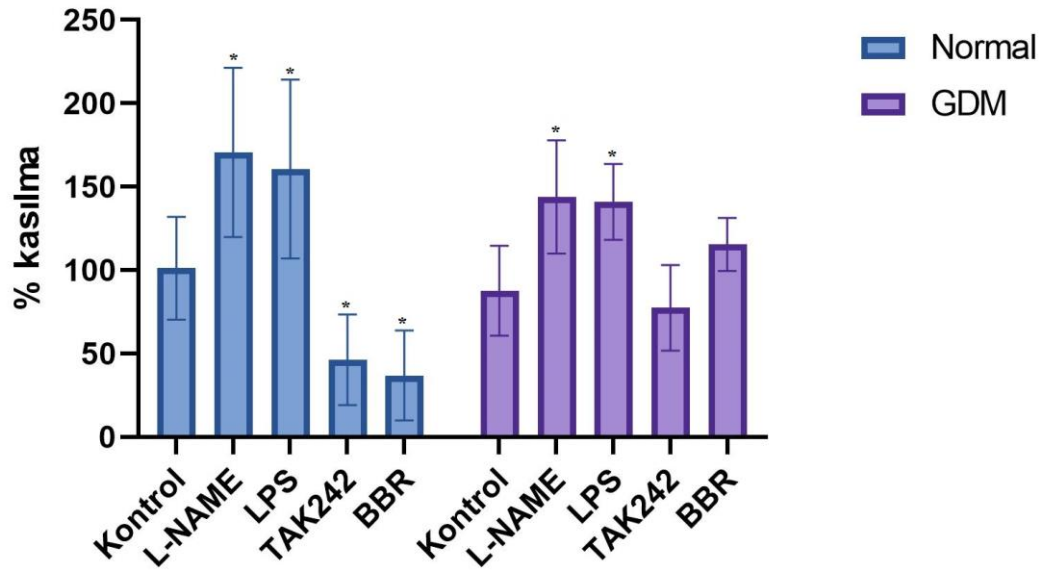
Normal ve GDM umbilikal arterlerde AII (10^{-9} - 10^{-4} M) ile alınan maksimum kasılma cevapları arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$ Şekil 5, Tablo 2); pD2 değerleri karşılaştırıldığında ise GDM grubunda AII'ye duyarlılık artışı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$ Şekil 6, Tablo 2).

Normal gebelerden alınan arterlerin L-NAME inkübasyonu E_{maks} 'ı ve pD2 değerini anlamlı olarak artırdı ($p<0,05$). GDM grubundan alınan arterlerde ise; E_{maks} anlamlı ölçüde artarken ($p<0,05$), pD2 değerinde anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0,05$ Şekil 5 ve 6, Tablo 2).

LPS ile inkübe edilen normal arterlerde kontrol grubuna göre E_{maks} ve pD2 değerlerinde anlamlı olarak artış gösterdi ($p<0,05$ Şekil 5 ve 6, Tablo 2). GDM arterlerde ise kontrol grubuna göre E_{maks} yanıtı anlamlı ölçüde artarken ($p<0,05$), pD2 değerlerinin değişmediği saptandı ($p>0,05$ Şekil 5 ve 6, Tablo 2).

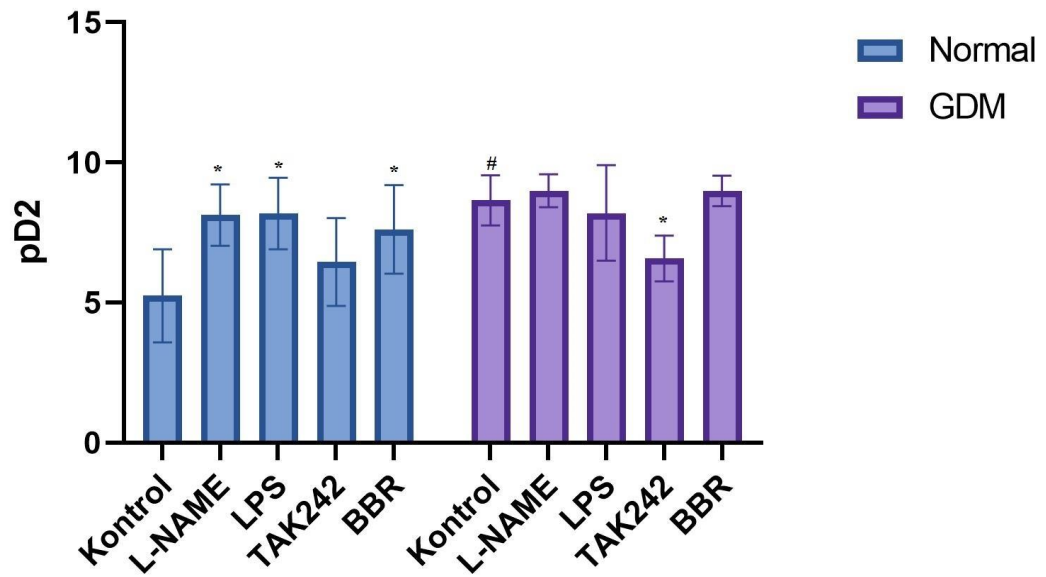
TAK-242 ile dokuların inkübe edilmesi, normal arterlerde kontrol grubuna göre AII ile elde edilen maksimum kasılma cevaplarını azalttı ($p<0,05$); ancak pD2 değerlerini anlamlı olarak değiştirmede ($p>0,05$ Şekil 5 ve 6, Tablo 2). GDM grubundan alınan arterlerde ise, kontrol grubuna göre AII'ye bağlı maksimum kasılmayı etkilemezken ($p>0,05$), AII'ye olan duyarlılığı anlamlı ölçüde azaltmıştır ($p<0,05$ Şekil 5 ve 6, Tablo 2).

Dokuların BBR ile inkübe edilmesi normal arterlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AII'nin E_{maks} değerini büyük ölçüde azaltmış ($p<0,05$), pD2 değerinde de artışa neden olmakla birlikte AII'ye olan duyarlılığı azaltmıştır ($p<0,05$). GDM grubunda ise AII'ye bağlı maksimum kasılma cevapları ve pD2 değerlerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$ Şekil 5 ve 6, Tablo 2).



Şekil 5. Grupların AII'ye verdiği cevapların yüzde kasılma cinsinden E_{max} değerleri.

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05



Şekil 6. Grupların AII'ye verdiği cevapların yüzde kasılma cinsinden pD₂ değerleri.

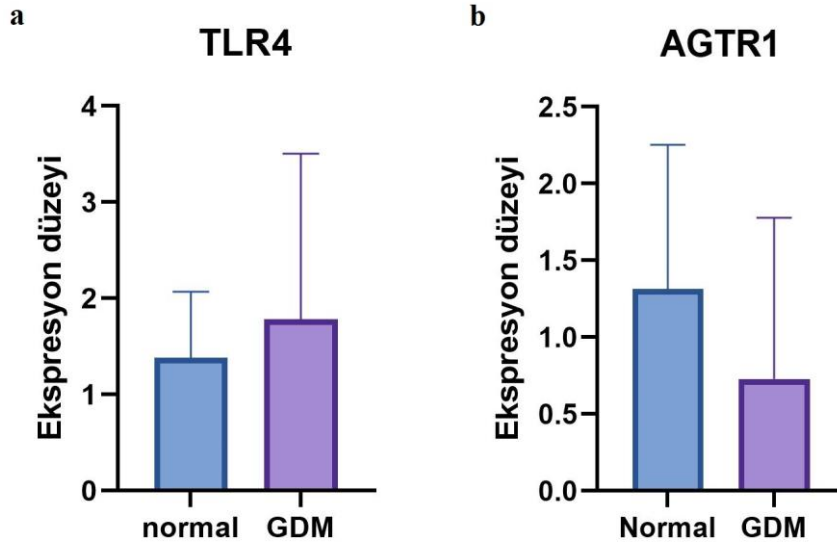
* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05, # Normal kontrol ile karşılaştırıldığında p<0,05

Tablo 2. Grupların E_{max} ve pD2 değerleri

	Gruplar (n=7)	E _{max}	pD2
Normal	Kontrol	101,10 ± 30,92	5,24 ± 1,66
	L-NAME	170,60 ± 50,82*	8,13 ± 1,09*
	LPS	160,54 ± 53,64*	8,18 ± 1,27*
	TAK-242	46,23 ± 27,10*	6,45 ± 1,56
	BBR	36,85 ± 26,96*	7,61 ± 1,57*
GDM	Kontrol	87,63 ± 26,98	8,65 ± 0,89 [#]
	L-NAME	143,85 ± 33,98 ⁺	8,99 ± 0,58
	LPS	140,91 ± 22,68 ⁺	8,20 ± 1,70
	TAK-242	77,37 ± 25,67	6,58 ± 0,82 ⁺
	BBR	115,44 ± 15,96	8,99 ± 0,54

*Normal kontrol ile karşılaştırıldığında p<0,05, [#]Normal kontrol ile karşılaştırıldığında p<0,05, ⁺GDM kontrol ile karşılaştırıldığında p<0,05. Değerler maksimum KCl kasılmasına oranlanarak % kasılma cinsinden verilmiştir.

qRT-PCR analizinde ise, normal ve GDM umbilikal arterlerde TLR4 ve AT1 reseptör geni AGTR1'in mRNA düzeyinde ekspresyonları ölçülmüştür. Yapılan ölçümlerde gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır (p>0,05 Şekil 7).



Şekil 7. Normal ve GDM umbilikal arterlerde TLR4 (a) ve AGTR1 (b) mRNA ekspresyon düzeyleri qRT-PCR analizleri duplike olarak ölçülmüştür (n=7) (p>0,05).

5. TARTIŞMA

Sunulan bu çalışmada normal ve GDM olan gebelerden alınan umbilikal arterlerde L-NAME ve LPS varlığında AII'nin maksimum kasılma cevapları artmış ancak, normal gebelerden alınan umbilikal arterlerden farklı olarak GDM grubunda AII'ye duyarlılık artışı oluşmamıştır. Dokuların TAK-242 ile inkübasyonu GDM'li arterlerde normal gruptan farklı olarak maksimum cevabı değiştirmemiş fakat AII'ye duyarlılığı azaltmıştır. BBR ise, GDM grubunda normal dokulardan farklı olarak maksimum cevap ve duyarlılıkta değişme oluşturmamıştır.

Fetal perfüzyonu sağlayan umbilikal damar tonusunun regülasyonu humoral vazoaaktif maddeler gibi otokrin mekanizmalar tarafından sürdürülmektedir. GDM olan gebelerde umbilikal arter rezistansının normal gebelere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (J. Li ve ark., 2014). GDM'nin preeklampsisi gelişiminde rolü olabileceği öngörülmektedir (Landon ve ark., 2009). Diğer bir çalışmada ise, normal ve GDM hastalarından alınan umbilikal arterlerde ATP bağımlı K⁺ kanallarının vazokonstriksiyona etkisi incelenmiş ve GDM hastalarında kontrole göre K⁺ kanal ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir. Araştırmacılar bunun GDM hastalarının umbilikal damarlarında patolojik değişiklik oluşmasında etkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (H. Li ve ark., 2018). Bu çalışmada literatürle uyumlu olarak GDM'li gebelerden alınan umbilikal arterlerin AII'ye duyarlılığı normal gebelerden alınan dokulara göre anlamlı olarak artmıştır.

NO endotel kaynaklı vazodilatör ajanlardan biridir. Vasküler endotel hücrelerinde NOS enzimi aracılığı ile L-arjininden NO oluştuğu ve lipofilik özellikte olan bu maddenin, düz kas tabakasında guanilat siklazı aktive ederek gevşeme oluşturduğu bilinmektedir. NO, bazal vasküler tonusun korunmasında etkili olan faktörlerden biridir (Pfeiffer ve ark., 1996; Leung ve ark., 2006).

L-NAME, L-arjinin analoglarından biri olup potent bir NOS inhibitörüdür. L-NAME 10⁻⁴ M konsantrasyonda NOS'un neredeyse tamamını inhibe etmektedir. NOS inhibisyonuyla vazodilatör etkili NO miktarı azalır ve damar perfüzyon basıncı artar. Bu yönden L-NAME deneysel farmakolojide NO aracılı etkisi olan ajanları araştırmak için sıklıkla kullanılan bir ajandır (Pfeiffer ve ark., 1996; Sandoo ve ark., 2015). Bu çalışmada normal gebelerden alınan arterlerin NOS inhibitörü L-NAME

ile inkübe edilmesi kümülatif uygulanan AII ile alınan maksimum kasılma cevaplarını ve dokuların AII'ye duyarlılığını artırmış, GDM'li dokularda ise maksimum kasılma cevabı artarken duyarlılıkta değişme gözlenmemiştir. Bu sonuçlar GDM kontrol grubuna bağlı olarak NO salınımı veya etkilerinde farklılık olduğunu göstermektedir. Endojen endotel kaynaklı NO'nun gebeliğe bağlı hastalıklardan etkilenen bir faktör olduğu diğer çalışmalarda da yayınlanmıştır (Leung ve ark., 2006; Tufiño ve ark., 2014).

AII'nin kas hücrelerinde insülin rezistansını artırdığı ve AT1 reseptör blokajının pankreas beta hücre fonksiyonunu olumlu etkilediği bildirilmiştir (Matsusaka ve Ichikawa, 1997; Ames ve ark., 2019). AII'nin artışına bağlı olarak gelişen hipertansiyon, nefropati, kardiyak hipertrofi gibi patolojik olaylara TLR4'ün aracılık ettiği çalışmalarda gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2015). Bir çalışmada hipertansiyonda artmış RAS ile TLR4'ün etkisini belirlemek amacıyla normal ve hipertansif sıçanlar kullanılmıştır. Bu sıçanlardan hazırlanan vasküler düz kas hücre kültürlerinde ve izole edilen aorta şeritlerinde TLR4 mRNA ekspresyonu incelendiğinde, hipertansif sıçanlarda TLR4 ekspresyonunun normale göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu artış AT1 reseptör blokörü losartan uygulaması ile anlamlı ölçüde azalmıştır. Araştırmacılar AII'nin TLR4 ekspresyonunu artırdığını yayınlamışlardır (De Batista ve ark., 2014). Ayrıca TLR4 diyabete bağlı vasküler disfonksiyon gelişimine de aracılık etmektedir (Carrillo-Sepulveda ve ark., 2015).

Bu çalışmada normal ve GDM'li gebelerden elde edilen umbilikal arter preparatlarında AII ile alınan kasılma cevaplarında TLR4'ün rolünü araştırmak için TLR4 antagonistleri TAK242 ve BBR ile TLR4 agonisti LPS kullanılmıştır.

Dokuların LPS ile inkübasyonu normal gebelerden alınan arterlerde AII'ye bağlı maksimum kasılma cevaplarını ve dokuların AII'ye duyarlılığını artırmış; GDM grubu arterlerde ise sadece AII'ye maksimum cevabı artırmıştır. LPS, çeşitli mikroorganizmalardan elde edilebilen bir endotoksindir. TLR4'ün eksojen agonistlerindendir ve proenflamatuvar faktörlerin salınımına aracılık etmektedir (Vidya ve ark., 2018). Vasküler düz kas hücrelerinde AII veya LPS ile muamele gören dokularda TLR4 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Ji ve ark., 2009). AII ve LPS'nin proenflamatuvar ve vazomotor etkilerini karşılaştırmak amacıyla fare mezenterik arteri izole edilmiştir. İzole edilen arterler LPS ve/veya AII ile inkübe

edilmiştir. LPS, mezenterik arterlerde karbakol ile oluşturulan vazodilatasyonu anlamlı ölçüde inhibe etmiştir. Fenilefrin ile oluşturulan kasılma yanıtını AII anlamlı düzeyde artırırken; LPS ile alınan yanıt anlamlı düzeyde değildir. İnsan primer endotel hücreleri ve vasküler düz kas hücrelerinde LPS'nin proenflamatuvar faktörlerin salınımını artırdığı ancak, AII'nin benzer etkiler göstermediği görülmüştür (Outzen ve ark., 2017).

TAK-242 ve BBR normal gebelerden alınan umbilikal arterlerde AII'nin oluşturduğu maksimum kasılma cevaplarını azalttı. GDM'li arterlerde ise her iki antagonist de maksimum cevapları değiştirmedi. Ancak, dokuların AII'ye duyarlılığı üzerine TAK-242 ve BBR'nin etkilerinin farklı olduğu gözlemlendi. TAK-242 normal arterlerde dokuların AII'ye duyarlılığı değiştirmedi; GDM'li arterlerde ise azalttı. BBR ile inkübe edilen normal dokularda AII'ye duyarlılıkta artış gözlenirken; GDM'li arterlerde duyarlılık değişmedi. TAK-242 ve BBR'nin normal arterlerde maksimum yanıtı azaltırken AII duyarlılığını da azaltması öngörülmesine rağmen, aksi yönde bulgular mevcuttur. GDM'li arterlerde TLR4 reseptör ekspresyonunun kısmen artışının maksimum kasılma yanıtlarını azaltmada başarısız olması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. GDM'li arterde TAK-242'nin duyarlılığı azaltırken, BBR'nin etkisiz kalması ise; BBR'nin TLR4 dışındaki dilatasyon mekanizmalarının negatif yönde etkilenme ihtimalini güçlendirmiştir. Kobay kolon dokusunun incelendiği bir çalışmada BBR'nin hücre içinde dinlenme durumundaki kalsiyum düzeyini etkilememiş fakat, yüksek KCl konsantrasyonunun indüklediği hücre içi kalsiyum artışını doza bağımlı şekilde önlemiştir. Benzer şekilde asetilkolin ile indüklenen kalsiyum hücre içi kalsiyum düzeyindeki artışı anlamlı ölçüde inhibe etmiştir. Verapamille karşılaştırılabilir ölçüde kalsiyum kanal blokajına neden olduğu gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada BBR'nin düz kas üzerinde vazodilatör etkisinde miyozin kinazın rolünü belirlemek amacıyla sıçanlardan izole edilen bağırsak ve gastrik şeritler kullanılmıştır. Miyozin kinaz fosforilasyonu miyozin filamentlerinin aktin filamentlerine doğru kaymasını kolaylaştırarak kasılmaya aracılık etmektedir. BBR doza bağımlı bir şekilde yüksek kalsiyum içeren ortamda dokuların kasılma miktarını anlamlı olarak azaltmıştır. Aynı şekilde BBR'nin doza bağımlı olarak miyozin fosforilasyonunu azalttığı da gözlenmiştir (Cao ve ark., 2001; Lee ve ark., 2006; Xu ve ark., 2017). Streptozosinle diyabet oluşturulmuş sıçanlarda farklı dozlarda BBR'nin kan basıncı ve vazodilatasyon üzerine etkilerinin araştırıldığı bir

çalışmada; BBR diyabet grubunda doza bağımlı olarak kan glikozu değerlerini anlamlı ölçüde azaltmıştır. Sıçanlardan izole edilen orta serebral arterlerde asetilkoline bağılı gevşeme cevaplarının 100 ve 200 mg/kg/gün BBR uygulanan diyabetik grupta diyabetik kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir. Serebral arterlerden izole edilen vasküler düz kas hücreleri ile yapılan ölçümlerde ise, 100 mg/kg/gün BBR uygulanan diyabet grubunda kalsiyum ile aktiflenen potasyum kanallarının fonksiyonelliği ve ekspresyonu diyabet kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artmıştır. Araştırmacılar BBR'nin diyabetli kişilerde hiperglisemi ve hipertansiyonun kontrolünde kombine tedavi sağlayabileceğini öne sürmüşlerdir (Ma ve ark., 2017).

Preeklampsia gelişiminde AII'nin etkili olduğu bilinmektedir. Normal ve preeklampşik gebelerde yapılan çalışmada plazma AII düzeyi preeklampsia grubunda artış göstermiştir. Plasenta veninde ise, AGTR1 mRNA ekspresyonu preeklampsia grubunda azalma göstermiştir (Gao ve ark., 2017). Bu çalışmada AT1 reseptör geni AGTR1'in mRNA düzeyinde normal örneklerle göre kısmen ekspresyon azalışı izlense de bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 7). TLR4 ve GDM'nin direkt olarak ilişkilendirilememiş olması GDM oluşumunda çalışmaya dahil edilen gebe bireylerde TLR4 inhibisyonunu etkinliğinin diyetle kontrol altına alınmış olması veya gebelik sürecinde tedavi ile kan glikozunun kontrol altında tutulmasının insülin rezistansını düzeltmesi gibi faktörlerin rolü olabileceğine dikkat çekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, normal ve GDM umbilikal arterleri arasında AII'nin vazokonstriktör etkisinin TLR4 reseptörü aracılığıyla kısmen modüle edilebileceği ve TLR4 aracılı bu etkilerin normal ve GDM'li gebelerden alınan arterlerde farklı olduğu gösterilmiştir.

TAK-242 ve BBR'nin AII'nin vazokonsriktör etkisine karşı etkilerinin yeni çalışmalarla valide edilmesi gerekmektedir.

BBR'nin literatürde TLR4 dışında vazodilatasyon mekanizmalarına sahip olduğunun görülmesi GDM ve preeklampsi gibi hastalıklardaki potansiyelinin incelenmesi konusuna dikkat çekmektedir.

GDM oluşumunda çalışmaya dahil edilen gebe bireylerde TLR4 inhibisyonunu etkinliğinin diyetle kontrol altına alınmış olması veya gebelik sürecinde tedavi ile kan glikozunun kontrol altında tutulmasının insülin rezistansını düzeltmesi gibi faktörlerden dolayı TLR4 ve GDM'nin direkt olarak ilişkisi tanımlanamamış olabilir.

Analizlerin daha fazla normal ve GDM gebeden sağlanacak örnekler ile gebelik sırasında LPS, TAK-242 ve BBR uygulanmasıyla etkilerinin daha iyi ortaya konulabileceği deney hayvanı çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, sadece TLR4 geni üzerinde değil tüm TLR gen paneli incelenerek çalışma kapsamı genişletilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(11):1–21.
- IDF. Hyperglycaemia in pregnancy (HIP) (20-49 y): Prevalence of gestational diabetes mellitus (GDM), % [Internet]. 2019 [kaynak 2020 Nis 2]; Available from: <https://diabetesatlas.org/data/en/indicators/14/>
- Johns EC, Denison FC, Norman JE, Reynolds RM. Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends Endocrinol Metab* 2018;29(11):743–54.
- Li J, Chen YP, Dong YP, Yu CH, Lu YP, Xiao XM, ve ark. The impact of umbilical blood flow regulation on fetal development differs in diabetic and non-diabetic pregnancy. *Kidney Blood Press Res* 2014;39(4):369–77.
- Fujiyama T, Yamaguchi R, Noda K. Nerve Distribution in Human Fetal Appendages, Particularly in the Umbilical Cord. *Tohoku J exp Med* 1971;105(2):111–21.
- Reilly FD, Russell PT. Neurohistochemical evidence supporting an absence of adrenergic and cholinergic innervation in the human placenta and umbilical cord. *Anat Rec* 1977;188(3):277–85.
- Gao Q, Tang J, Li N, Zhou X, Li Y, Liu Y, ve ark. A novel mechanism of angiotensin II-regulated placental vascular tone in the development of hypertension in preeclampsia. *Oncotarget* 2017;8(19):30734–41.
- Alibashe-Ahmed M, Brioudes E, Reith W, Bosco D, Berney T. Toll-like receptor 4 inhibition prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Sci Rep* 2019;9(1):1–8.
- De Batista PR, Palacios R, Martín A, Hernanz R, Médiçi CT, Silva MASC, ve ark. Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production. *PLoS One* 2014;9(8):1–13.
- Mack LR, Tomich PG. Gestational Diabetes: Diagnosis, Classification, and Clinical Care. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 2017;44(2):207–17.
- Stallabrass P. Observations on the muscular coat of the human umbilical blood vessels. *An Int J Obstet Gynaecol* 1963;70(6):1042–3.
- Spivack M. The anatomic peculiarities of the human umbilical cord and their clinical significance. *Am J Obstet Gynecol* 1946;52(3):387–401.
- Spurway J, Logan P, Pak S. The development, structure and blood flow within the umbilical cord with particular reference to the venous system. *Australas J Ultrasound Med* 2012;15(3):97–102.
- Muniraman H, Sardesai T, Sardesai S. Disorders of the umbilical cord. *Pediatr Rev* 2018;39(7):332–41.
- Fox SB, Khong TY. Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study. *Placenta* 1990;11(1):59–62.
- Walters WAW. Autacoids affecting vascular tone in the human fetal extracorporeal circulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992;19(1):3–8.
- Li X, Tan H, Zhou S, Hu S, Zhang T, Li Y, ve ark. Renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms in gestational hypertension and preeclampsia: A case-control gene-association study. *Sci Rep* 2016;6.
- Harvey R, Clark M, Finkel R, Rey J, Whalen K. Lippincott's illustrated reviews: Pharmacology. 7. baskı Walters Kluwer -- Medknow Publications; 2019.
- Matsusaka T, Ichikawa I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 1997;59:395–412.
- Barrett K, Barman S, Boitano S, Brooks HL. Ganong's review of medical physiology. 24. baskı Lange Medical Publications; 2012.
- Nehme A, Zouein FA, Zayeri ZD, Zibara K. An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *J Cardiovasc Dev Dis* 2019;6(2):14.
- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2007;292(1):82–97.
- Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int. Rev. Immunol.* 2018;37(1):20–36.
- Peri F, Calabrese V. Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds: An update. *J Med Chem* 2014;57(9):3612–22.
- Romerio A, Peri F. Increasing the Chemical Variety of Small-Molecule-Based TLR4 Modulators: An Overview. *Front Immunol* 2020;11(1210):1–16.
- Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. Berberine and barberry (*Berberis vulgaris*): A clinical review. *Phyther Res* 2019;33(3):504–23.

- BRENDA. Ligand view of Berberine [Internet]. 2021 [kaynak 2021 Ağu 14];Available from: https://www.brenda-enzymes.org/ligand.php?brenda_ligand_id=1612
- Molteni M, Bosi A, Rossetti C. Natural Products with Toll-Like Receptor 4 Antagonist Activity. *Int J Inflam* 2018;2018:1–9.
- Ma YG, Liang L, Zhang Y Bin, Wang BF, Bai YG, Dai ZJ, ve ark. Berberine reduced blood pressure and improved vasodilation in diabetic rats. *J Mol Endocrinol* 2017;59(3):191–204.
- Zhao J, Wang Y, Gao J, Jing Y, Xin W, Levy FO. Berberine Mediated Positive Inotropic Effects on Rat Hearts via a Ca^{2+} -Dependent Mechanism. *Front Pharmacol* 2020;11(821):1–14.
- Wang Y. Attenuation of berberine on lipopolysaccharide-induced inflammatory and apoptosis responses in β -cells via TLR4-independent JNK/NF- κ B pathway. *Pharm Biol* 2014;52(4):532–8.
- Zhu L, Han J, Yuan R, Xue L, Pang W. Berberine ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway. *Biol Res* 2018;51(9):1–12.
- Lee S, Lim HJ, Park HY, Lee KS, Park JH, Jang Y. Berberine inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and improves neointima formation after balloon injury in vivo. Berberine improves neointima formation in a rat model. *Atherosclerosis* 2006;186(1):29–37.
- Garay-Malpartida HM, Mourão RF, Mantovani M, Santos IA, Sogayar MC, Goldberg AC. Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis. *BMC Immunol* 2011;12(1):18.
- Tao C, Holland WL, Wang QA, Shao M, Jia L, Sun K, ve ark. Short-term versus long-term effects of adipocyte toll-like receptor 4 activation on insulin resistance in male mice. *Endocrinology* 2017;158(5):1260–70.
- Yan S, Jiang Z, Cheng L, Lin Y, Fan B, Luo L, ve ark. TLR4 knockout can improve dysfunction of β -cell by rebalancing proteomics disorders in pancreas of obese rats. *Endocrine* 2020;67(1):67–79.
- He W, Rebello O, Savino R, Terracciano R, Schuster-Klein C, Guardiola B, ve ark. TLR4 triggered complex inflammation in human pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2019;1865(1):86–97.
- Wang X, Ge QM, Bian F, Dong Y, Huang CM. Inhibition of TLR4 protects rat islets against lipopolysaccharide-induced dysfunction. *Mol Med Rep* 2017;15(2):805–12.
- Outzen EM, Zaki M, Mehryar R, Abdolalizadeh B, Sajid W, Boonen HCM, ve ark. Lipopolysaccharides, but not Angiotensin II, Induces Direct Pro-Inflammatory Effects in Cultured Mouse Arteries and Human Endothelial and Vascular Smooth Muscle Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2017;120(4):335–47.
- Nunes KP, Bomfim GF, Toque HA, Szasz T, Clinton Webb R. Toll-like receptor 4 (TLR4) impairs nitric oxide contributing to Angiotensin II-induced cavernosal dysfunction. *Life Sci* 2017;191:219–26.
- Ji Y, Liu J, Wang Z, Liu N. Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 2009;23(4–6):265–76.
- Sahin AS, Dagtekin E. Effects of Leptin on Hydrogen Peroxide Induced Contractions in Isolated Human Umbilical Artery. *Selcuk Tıp Derg* 2018;4(34):160–4.
- Barona I, Fagundes DS, Gonzalo S, Grasa L, Arruebo MP, Plaza MÁ, ve ark. Role of TLR4 and MAPK in the local effect of LPS on intestinal contractility. *J Pharm Pharmacol* 2011;63(5):657–62.
- Farzi A, Halicka J, Mayerhofer R, Fröhlich EE, Tatzl E, Holzer P. Toll-like receptor 4 contributes to the inhibitory effect of morphine on colonic motility in vitro and in vivo. *Sci Rep* 2015;5(9499):1–7.
- Bolle P, Cometa MF, Palmery M, Tucci P. Response of rabbit detrusor muscle to total extract and major alkaloids of *Hydrastis canadensis*. *Phyther Res* 1998;12(SUPPL. 1):1997–9.
- Landon MB, Spong CY, Thom E, Carpenter MW, Ramin SM, Casey B, ve ark. A Multicenter, Randomized Trial of Treatment for Mild Gestational Diabetes. *N Engl J Med* 2009;361(14):1339–48.
- Li H, Shin SE, Seo MS, An JR, Ha KS, Han ET, ve ark. Alterations of ATP-sensitive K^{+} channels in human umbilical arterial smooth muscle during gestational diabetes mellitus. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2018;470(9):1325–33.
- Pfeiffer S, Leopold E, Schmidt K, Brunner F, Mayer B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol* 1996;118(6):1433.
- Leung SWS, Quan A, Lao TT, Man RYK. Efficacy of different vasodilators on human umbilical arterial smooth muscle under normal and reduced oxygen conditions. *Early Hum Dev* 2006;82(7):457–62.

- Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten JJC., Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *Open Cardiovasc Med J* 2015;4(1):302–12.
- Tufiño C, Villanueva-López C, Ibarra-Barajas M, Bracho-Valdés I, Bobadilla-Lugo RA. Experimental gestational diabetes mellitus induces blunted vasoconstriction and functional changes in the rat aorta. *Biomed Res Int* 2014;2014(329634):1–12.
- Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J. Vet. Intern. Med.* 2019;33(2):363–82.
- Zhang Y, Peng W, Ao X, Dai H, Yuan L, Huang X, et al. TAK-242, a Toll-like receptor 4 antagonist, protects against aldosterone-Induced Cardiac and Renal Injury. *PLoS One* 2015;10(11):e0142456.
- Carrillo-Sepulveda MA, Spitler K, Pandey D, Berkowitz DE, Matsumoto T. Inhibition of TLR4 attenuates vascular dysfunction and oxidative stress in diabetic rats. *J Mol Med* 2015;93(12):1341–54.
- Cao JW, Luo HS, Yu BP, Huang XD, Sheng ZX, Yu JP. Effects of berberine on intracellular free calcium in smooth muscle cells of guinea pig colon. *Digestion* 2001;64(3):179–83.
- Xu Z, Zhang M, Dou D, Tao X, Kang T. Berberine Depresses Contraction of Smooth Muscle via Inhibiting Myosin Light-chain Kinase. *Pharmacogn Mag* 2017;13(51):454.



8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı - Soyadı	Esra Büyük
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Necmettin Erbakan Üniversitesi	2021
Lisans	Erciyes Üniversitesi	2016

İş deneyimi

Görevi	Kurum / Görev	Süre
Araştırma görevlisi	Mustafa Kemal Üniversitesi / Araştırma görevlisi	2020 – Devam ediyor
Araştırma görevlisi	Lokman Hekim Üniversitesi / Araştırma görevlisi	2018 - 2020

Yabancı dil	İngilizce
-------------	-----------

Yayımları

Pınar Neslihan, Topaloğlu Meyli, Seçinti İlke Evrim, Büyük Esra, Kaplan Halil Mahir (2021). Protective effect of dexpanthenol on cisplatin induced nephrotoxicity in rats. Biotechnic & Histochemistry. (Yayın No: 6971167)

Seçer Çelik Fatma, Çelen Esra, Yıldız Hatice Kübra, Altweish Safaa, Dönmez Hüseyin, Gürbüz Yasemin, Demirci Ayten, K Esra, Ün Arslan Esra, İlhan Merve, Şahin Ayşe Saide, Vural Hasibe (2018). Investigation of Leptin Receptor and Enos Gene Polymorphisms in Preeclamptic Umbilical Cords. World Journal of Gynecology Women's Health, 1(3), 1-5. (Yayın No: 4885269)



T.C.
NECMEETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
Meram Tıp Fakültesi Dekanlığı



Sayı : 14567952-050/ SLS
Konu :

Tarih : 07.04.2020

Sayın
Prof. Dr. Ayşe S. ŞAHİN
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı

İlgi:24.03.2020 tarihli dilekçeniz;
“Gestasyonel diyabetli ve normal gebelerden izole edilen umbilikal arterlerde Anjiyotensin II ve TLR4 ilişkisinin incelenmesi” başlıklı, Prof. Dr. Ayşe S. ŞAHİN’ in sorumluluğunda, Arş. Gör. Esra BÜYÜK’ ün yardımcı araştırmacısı olduğu doktora tez çalışması hakkında Fakültemiz İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulunun 03 Nisan 2020 tarihinde aldığı 2020/2400 sayılı karar ilişikte gönderilmiştir.
Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Ek: Etik Kurul Kararı

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı: 105

Toplantı Tarihi: 03 Nisan 2020

Karar Sayısı: 2020/2400: Fakültemiz Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşe S. ŞAHİN' in "Gestasyonel diyabetli ve normal gebelerden izole edilen umbilikal arterlerde Anjiyotensin II ve TLR4 ilişkisinin incelenmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 24.03.2020 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Arş. Gör. Esra BÜYÜK' ün doktora tez çalışmasının Fakültemiz Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşe S. ŞAHİN' in sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin ilaç ve tıbbi cihaz dışı araştırmalar etik kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Ayşe S. ŞAHİN

Yardımcı Araştırmacı: Arş. Gör. Esra BÜYÜK

ASLI GİBİDİR
03.04.2020

Ömer K

İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı

Kurul Sekreteri