

# ANJİYOTENSİN II'NİN YÜKSEK GLUKOZLU ORTAMDA VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRE PROLİFERASYONUNA ETKİSİ

## THE EFFECT OF ANGIOTENSIN II ON VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL PROLIFERATION IN HIGH GLUCOSE MEDIA

Mustafa KIRÇA

Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

### ÖZET

**AMAÇ:** Anjiyotensin II (Ang II)'nin damar duvarındaki asıl hedefi vasküler düz kas hücreleri (VDKH)'dir. Bu hücrelerin proliferasyonunu uyararak ateroskleroz ve hipertansiyon patogenezi katılır. Yüksek konsantrasyondaki glukoz (YG) da bu hücrelerde proliferasyonu artırarak diyabetlilerde görülen hızlandırılmış ateroskleroz sürecine katkıda bulunur. Bununla birlikte karşıt görüşte çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmada Ang II ve YG'un VDKH proliferasyonuna etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla düşük glukoz (DG, 5,5 mM) ve yüksek glukoz (YG, 25 mM) ortamında Ang II'nin 24, 48 ve 72 saat sonunda VDKH proliferasyonuna etkisi incelendi. Ayrıca Ang II uyarımlı proliferasyonda AT1R inhibitörleri telmisartan ve irbesartana ek olarak p38 ve ERK1/2 MAPK ve NF- $\kappa$ B rolleri araştırıldı. Son olarak proliferasyon verisini desteklemek için Ang II uyarımlı ERK1/2 MAPK fosforilasyonu ölçüldü.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Çalışmada sıçan aortundan izole edilen primer VDKH kullanıldı. Proliferasyon, Wst-1 tuzu kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. ERK1/2 MAPK fosforilasyonu western blot yöntemiyle belirlendi.

**BULGULAR:** Ang II ve YG tek başına uygulandığında en yüksek proliferasyon 24 saat sonunda gözlemlendi. DG ortamında Ang II'nin proliferasyonu yaklaşık 1.7 kat, YG'un ise 1.5 kat artırdığı belirlendi. Ang II'nin YG ile 48 saat uygulanması hücre proliferasyonunu %25 daha fazla artırdı. Telmisartan ve irbesartan Ang II uyarımlı artmış proliferasyonu baskıladı. NF- $\kappa$ B inhibisyonunun önemli oranda artmış VDKH proliferasyonu ile sonuçlandığı tespit edildi. P38 ve ERK1/2 MAPK inhibisyonu ile proliferasyonun azaldığı gözlemlendi. Son olarak proliferasyon ölçümlerine paralel şekilde Ang II ve YG'un ERK1/2 MAPK fosforilasyonunu artırdığı bulundu.

**SONUÇ:** Ang II ve YG uygulanması VDKH'nde proliferasyonu 48 saat sonunda sinerjistik olarak artırır. NF- $\kappa$ B inhibisyonu VDKH'nde artmış proliferasyon ile sonuçlanabilir. Kanseri ve inflamatuvar hastalıklar gibi farklı birçok alanda uygulama sahası bulan NF- $\kappa$ B inhibitörlerinin kullanımının aterosklerozda önemli rol oynayan VDKH proliferasyonu gibi istenmeyen etkileri olabileceği dikkate alınmalıdır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Anjiyotensin II, NF- $\kappa$ B, Proliferasyon, Vasküler düz kas hücresi, Yüksek glukoz

### ABSTRACT

**OBJECTIVE:** The main target of angiotensin II (Ang II) is vascular smooth muscle cell (VSMC) on the vascular wall. It contributes to atherosclerosis and hypertension pathogenesis by inducing the proliferation of these cells. Also, high glucose (HG) concentration contributes to accelerated atherosclerosis, observed in diabetics, by triggering the proliferation of these cells. However, studies those asserting an opposing argument are present. In this study, the aim was to determine the roles of Ang II and HG on VSMCs proliferation. To do this, Ang II's effect on VSMC proliferation under low glucose (LG) or HG for 24, 48, and 72 hours was investigated. Moreover, p38 and ERK1/2 MAPKs and NF- $\kappa$ B roles in addition to the effects of AT1R inhibitors telmisartan and irbesartan were explored in Ang II-induced proliferation. Lastly, Ang II-induced ERK1/2 MAPK phosphorylation was determined to support proliferation data.

**MATERIAL AND METHODS:** Primary VSMCs isolated from rat aorta were used in the study. Proliferation was spectrophotometrically measured by using Wst-1 salt. ERK1/2 MAPK phosphorylation was determined by the western blot method.

**RESULTS:** The highest proliferation rate was observed at the end of 24 h when Ang II and HG were applied individually. It was observed that Ang II increased the proliferation approx. 1.7 times, and HG 1.5 times under LG media. Application of Ang II with HG yielded 25% more proliferation after 48 h. Telmisartan and irbesartan suppressed Ang II-induced augmented proliferation. Inhibition of NF- $\kappa$ B resulted in a dramatic increase in VSMCs proliferation. Inhibition of p38 and ERK1/2 MAPKs decreased proliferation. Finally, Ang II and HG alone enhanced ERK1/2 MAPK phosphorylation.

**CONCLUSIONS:** Ang II and HG treatment synergistically increase VSMC proliferation after 48 h. The inhibition of NF- $\kappa$ B might result in augmented VSMC proliferation. NF- $\kappa$ B inhibitors could be applied in different areas like cancer and inflammatory diseases, hence it should be noted that they could have undesired effects such as VSMC proliferation which plays an essential role in atherosclerosis.

**KEYWORDS:** Angiotensin II, NF- $\kappa$ B, Proliferation, Vascular smooth muscle cell, High glucose

**Geliş Tarihi / Received:** 03.05.2021

**Kabul Tarihi / Accepted:** 18.12.2021

**Yazışma Adresi / Correspondence:** Arş. Gör. Dr. Mustafa KIRÇA

Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

**E-mail:** mustafa.kirca@ksbu.edu.tr

**Orcid No :** 0000-0002-2959-1735

**Etik Kurul / Ethical Committee:** Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (23.05.2016/38).

## GİRİŞ

Vasküler patolojilerle ilişkisi uzun yıllardır bilinen anjiyotensin II (Ang II) molekülünün ana hedefi damar yapısında yer alarak (patofizyolojik olaylara katılan vasküler düz kas hücreleridir (VDKH) (1, 2). Hücre membranındaki Ang II tip 1 reseptöre (AT1R) bağlanarak hücre içi sinyal yollarını uyarmak suretiyle VDKH proliferasyonuna yol açmakta ve ateroskleroz gelişimine katkı sunmaktadır. Diğer önemli bir husus ise diyabetli hastalardaki hızlandırılmış ateroskleroz sürecidir. Bu tablonun altında da artmış VDKH proliferasyonu yatmaktadır (3, 4). Yüksek kan glukozu bu etkiden sorumlu görülmekte ve ayrıca Ang II üretimini artırdığı da bilinmektedir (5). Dolayısıyla düşük glukoz (DG) yerine yüksek glukozun (YG) olduğu bir ortamda Ang II'nin VDKH proliferasyonuna etkisi daha güçlü olabilir.

Ang II ve yüksek glukoz hücrelerde proliferasyonu artırmakta, bu artışta mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) ailesi üyelerinden p38 ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar 1 ve 2 (ERK1/2) MAPK aktivasyonu rol oynuyor gözükmektedir (6). Ang II'nin Nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivasyonu yaptığı (7), benzer şekilde yüksek glukozun da NF-κB'yi uyardığı VDKH'nde gösterilmiştir (8). Fakat bu ilişkiler kesinlik kazanmamıştır. Ang II'nin hücrelerde bu etkiyi yaratmadığını söyleyen çalışmalar olduğu gibi YG'un proliferasyonu azalttığını söyleyen yayınlar da mevcuttur (9 - 11).

Bu amaçla çalışmamda DG ve YG ortamında Ang II'nin 24, 48 ve 72 saat sonunda VDKH proliferasyonuna etkisi incelendi. Ayrıca Ang II uyarımlı proliferasyonda AT1R antagonistleri telmisartan ve irbesartan etkisi ve bu iki ajanın proliferasyonu önleme yönünden birbirine karşı herhangi bir üstünlüğü olup olmadığı araştırıldı. Son olarak NF-κB, p38 ve ERK1/2 MAPK'ın proliferasyonda rol alıp almadığı inhibitörleri üzerinden sorgulandı. Ang II ve YG uyarımı sonrası ERK1/2 MAPK fosforilasyonu belirlenerek proliferasyon verileri desteklendi.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Kimyasallar

HEPES, elastaz, kollejenaz, penisilin-streptomisin, Tris-HCl, SDS, telmisartan, irbesartan, BSA ve

Ang II Sigma'dan (St. Louis, MO, ABD), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) hücre medyumunu ve fetal sığır serumu Pan Biotech'den (Aidenbach, Almanya), NF-κB inhibitörü JSH-23 Cayman Chemical'dan (Ann Arbor, MI, ABD), ERK1/2 (p44/42) MAPK inhibitörü PD98059 ve p38 MAPK inhibitörü SB203580 Invitrogen'den (Carlsbad, CA, ABD), ERK1/2 MAPK primer antikor (Thr202 ve Tyr204) ve HRP-bağlı sekonder antikor Cell Signaling Technology'den (Danvers, MA, ABD) satın alındı. Süt tozu Biorad'dan (Hercules, Kaliforniya, ABD), developer ve fiksatif solüsyonu Ilford'dan (Mobberley, İngiltere), hücre proliferasyon reaktifi Wst-1 tuzu Roche'dan (Basel, İsviçre) temin edildi.

### Hücre Kültürü

VDKH, erkek Wistar sıçan torasik aortundan daha önce tarif edildiği şekilde izole edilmiştir (12). VDKH %10 (v/v) fetal sığır serumu, 100 IU/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin ile desteklenen DMEM ile beslendi. 3-5 nolu pasajlar deneylerde kullanıldı. %80 doluluk oranına ulaşan hücreler deney öncesi gün en az gece boyu serum içermeyen medyum ile inkübasyona bırakıldı. Ang II steril su ile çözüldü ve deneylerde 100 nM konsantrasyonda kullanıldı. İnhibitörlü deneylerde uyarın verilmeyen en az 30 dakika önce inhibitörler uygulandı. İnhibitörlerin tamamı DMSO ile çözüldü ve şu konsantrasyonlarda kullanıldı: Telmisartan, irbesartan ve SB203580 10 µM; PD98059 ve JSH-23 20 µM. DG medyum 5,5 mM glukoz, YG medyum ise 25 mM glukoz içerir.

### Proliferasyon Ölçümü

Çözünür tetrazolyum tuzu Wst-1 ile hücre proliferasyon ölçümü kolorimetrik ve radyoaktif olmayan bir yöntemdir. 96 kuyucuklu plakada spektrofotometrik ölçüm yapılır. Wst-1 (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo]-1,3-benzen disülfonat) suda çözünen, açık kırmızı renkli ve kararlı bir tetrazolyum tuzudur.

Canlı hücre yüzeyinde gerçekleşen bir indirgenme reaksiyonu ile suda çözünen koyu renkli bir formazana dönüşür. Bu sebeple oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısı ile orantılıdır. 96 kuyucuklu plakada Wst-1 reaktifi ile yaklaşık 4 saat inkübe edilen hücrelerde oluşan formazan miktarı süre sonunda spektrofotometrede 440

nm'de okunur. Bu amaçla izlenen işlem basamakları şu şekildedir:

- Tripsin-EDTA ile toplanan hücreler santrifüjlenerek (200 g, 5 dk) pellet elde edilir.
- Pellet hücre medyumuyla resüspanse edildikten sonra 96 kuyucuklu plakaya yaklaşık 4 bin hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilir.
- 24 saat sonra hücre medyumunu serum içermeyen medyumla değiştirilerek 24 saat inkübasyona bırakılır.
- Bu süre sonunda hücreler DG ve YG grubu olmak üzere ikiye ayrılırlar. DG grubu hücreler DG medyumla, YG grubu hücreler YG medyumla ekilir.
- İnhibitör uygulanacak kuyucuklara inhibitörler eklendikten yarım saat sonra Ang II eklenir ve hücreler inhibitörlere bırakılır.
- İnkübasyon süreleri bitince hücre medyumları serum içermeyen medyumla değiştirilir ve üstüne Wst-1 reaktifi eklenerek 4 saat boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletilir.
- Renk oluşumu tamamlanınca 1 dk hafifçe çalkalanan plakada oluşan formazan miktarına ait absorbanslar hücre içermeyen köre karşı spektrofotometrede okunur ( $\mu$ Quant, Biotek, Agilent).
- Ölçümler her bir kuyucuğu temsilen en az üç tekrar içerecek şekilde çalışılır.

#### Western Blot

Hücreler 60 mm çapındaki petrilere ekildi ve proliferasyon ölçüm basamaklarında anlatıldığı gibi gerekli uygulamalar yapıldı. İnkübasyon sonunda hücreler buz soğukluğunda 1X PBS tamponu (pH:7,4) ile 2 kez yıkandıktan sonra yine buz soğukluğunda hücre lizis tamponu eklenerek buz üzerinde parçalandı. Hücreler petriden kazınarak toplandı ve 10 saniye boyunca sonike edildi (Bendelin, UW2070). Ele geçen sıvı santrifüj edilerek (10000 g, 4 °C, 30 dk) süpernatant ve pellet elde edildi. Süpernatant kısmı (lizat) sonraki işlemlerde kullanıldı, pellet atıldı. Mikro BCA ölçüm kiti kullanılarak (Pierce, Rockford, IL, ABD, kat. no:23225) lizatların protein konsantrasyonları belirlendi. Her bir numune için gerekli dilüsyonlar hesaplandı, 5X Laemmli örnek

tamponu ve distile suyla gerekli seyreltmeler yapılarak SDS-PAGE elektroforez için her kuyucuğa 40  $\mu$ l protein yüklendi.

Elektroforez işlemi tamamlanan jel nitroselüloz bir membrana transfer edildi. Transfer sonrası yağsız süt tozu ile bloke edilen membran, geceboyu 4°C'de primer antikora bırakıldı. Ertesi gün primer antikör ortamdan uzaklaştırılıp membran yıkandı ve 2 saat HRP bağlı sekonder antikora bırakıldı. Süre sonunda sekonder antikör çözeltisi uzaklaştırıldı, membranlar yıkandı ve kemilüminesans reaktifi (ECL, Thermo Scientific, Rockford, IL, ABD) ile muamele edilerek sinyaller tespit edildi.

#### Etik Kurul

Bu çalışmada "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"(www.nap.edu/catalog/5140.html) prensipleri doğrultusunda hayvan haklarının korunduğunu ve çalışmanın Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından uygun bulunduğunu beyan ederim (karar no:38, 23.05.2016).

#### İstatistiksel Analiz

Hücre proliferasyon ölçümleri en az 4 tekrar olacak şekilde yapıldı (n=4-12, ortalama 8), Gruplar arası anlamlılık One-Way ANOVA testi ile belirlendi (GraphPad Prism 8.0.1). Grupları karşılaştırmada Bonferroni post-hoc testinden yararlanıldı. Western blot görüntüleri ImageJ yazılımı ile analiz edildi (version 1.48), görüntüler en az 3 farklı deneyin temsilini ifade eder. Veriler ortalama  $\pm$  ss ve  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

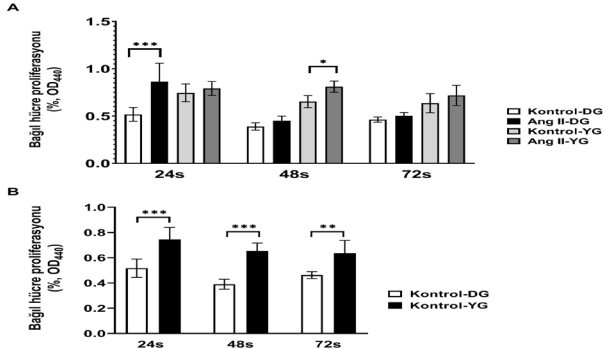
## BULGULAR

### Ang II ve yüksek glukoz düzeyinin VDKH proliferasyonuna etkisi

Primer VDKH proliferasyonunda Ang II ve yüksek glukozun etkisini belirlemek için hücreler gece boyu serum içermeyen medyumla inkübe edildi. Sonra DG ve YG'lu ortamda ve Ang II varlığında 24, 48 ve 72 sa inkübe edildikten sonra proliferasyon oranları belirlendi. Ang II'nin DG ortamında 24 sa sonra proliferasyonu anlamlı şekilde artırdığı ( $p < 0.01$ ), 48 ve 72. saatte ise artışların anlamlı olmadığı belirlendi (**Şekil 1-A**).

YG uygulamasının etkisini belirlemek için DG ve YG kontrol grupları mukayese edildiğinde YG

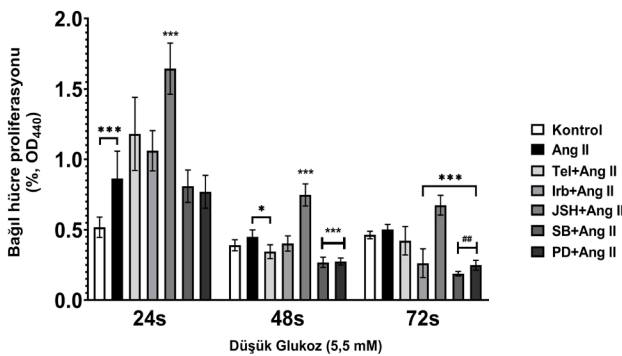
uygulanmasının 24, 48 ve 72 sa sonunda hücrelerde proliferasyonu anlamlı olarak artırdığı görüldü (sırasıyla  $p < 0.01$ ;  $0.01$ ;  $0.05$ ; **Şekil 1-B**).



**Şekil 1:** Ang II ve YG VDKH proliferasyonunu artırır. **A.** DG ve YG ortamında Ang II'nin (100 nM) 24, 48 ve 72 sa boyunca uygulanması sonucunda VDKH proliferasyonu ölçüldü. **B.** DG ve YG kontrol grubu hücrelerinin 24, 48 ve 72 sa sonunda VDKH proliferasyonları. Sonuçlar ortalama  $\pm$  ss olarak ifade edildi,  $n=4-12$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

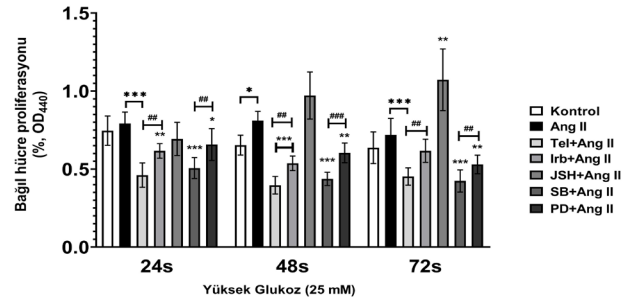
### NF- $\kappa$ B inhibisyonunun proliferasyona etkisi

Ang II'nin proliferasyona etkisi belirlendikten sonra DG ve YG ortamda AT1R antagonistleri telmisartan ve irbesartan, NF- $\kappa$ B inhibitörü JSH-23, p38 MAPK inhibitörü SB203580 ve ERK1/2 MAPK inhibitörü PD98059 varlığında proliferasyon ölçümleri yapıldı. Ang II'nin indüklediği hücre proliferasyonunu telmisartanın 48, irbesartanın ise 72 sa sonunda anlamlı şekilde azalttığı tespit edildi (sırasıyla  $p < 0.05$ ;  $0.01$ ). 24-72 saatte iki ilacın birbirine karşı herhangi bir üstünlüğü tespit edilemedi. Ang II uygulaması öncesinde JSH-23 uygulanan hücrelerde sadece Ang II uygulanan hücelere kıyasla 24, 48 ve 72 sa sonunda dramatik proliferasyon artışı gözlemlendi (tümü için  $p < 0.01$ ). Son olarak SB203580 ve PD98059 uygulamasının 48 ve 72 sa sonunda proliferasyonu anlamlı düzeyde azalttığı (hepsi için  $p < 0.01$ ), 24 saatteki azalma istatistikisi olarak anlamlı değildi ( $p > 0.05$ , **Şekil 2**).



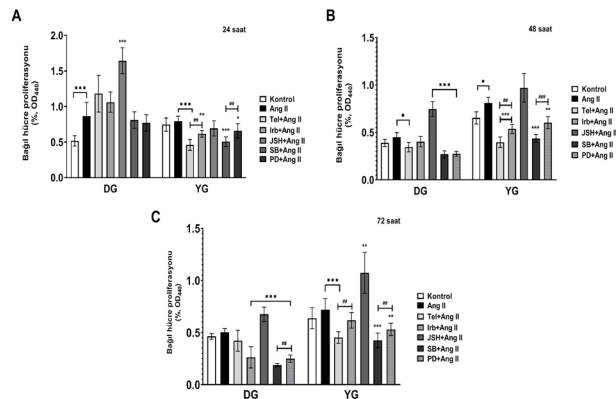
**Şekil 2:** DG ortamında Ang II'nin VDKH proliferasyonuna etkisi. İnhibitorler ortama Ang II (100 nM; 24, 48 ve 72 sa) eklenmeden en az 30 dk önce uygulandı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  ss olarak ifade edildi,  $n=4-12$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$ . Tel: telmisartan, Irb: irbesartan, JSH: JSH-23, SB: SB203580 ve PD: PD98059.

Aynı deneylerin YG ortamında yapılması sonucunda Ang II'nin sadece 48 saatte anlamlı proliferasyon artışı yaptığı ( $p < 0.05$ ) belirlendi. Telmisartanın YG ortamında Ang II uyarımlı proliferasyonu 24, 48 ve 72 saatte azalttığı (her üçü için  $p < 0.01$ ), irbesartanın ise 24 ( $p < 0.01$ ) ve 48 saatte ( $p < 0.01$ ) anlamlı olarak proliferasyonu azalttığı belirlendi. YG ortamında Ang II uyarımlı 24, 48 ve 72. saatteki proliferasyonu baskılamada irbesartana kıyasla telmisartan lehine anlamlı fark tespit edildi ( $p < 0.01$ ). YG ortamında JSH-23 uygulanan hücrelerde sadece 72 sa sonunda proliferasyon artışı gözlemlendi ( $p < 0.01$ ). SB203580 ve PD98059 uygulanmasının 24, 48 ve 72 saatte Ang II uyarımlı proliferasyonu azalttığı tespit edildi (SB203580 için 3 grupta  $p < 0.01$ ; PD98059 için sırasıyla  $p < 0.05$ ;  $0.01$ ;  $0.01$ ). Her üç zaman diliminde proliferasyonu baskılamada PD98059'a kıyasla SB203580 lehine anlamlı fark bulundu (sırasıyla  $p < 0.05$ ;  $0.01$ ;  $0.05$ ; **Şekil 3**).



**Şekil 3:** YG ortamında Ang II'nin VDKH proliferasyonuna etkisi. İnhibitorler ortama Ang II (100 nM; 24, 48 ve 72 sa) uygulanmadan en az 30 dk önce eklendi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  ss olarak ifade edildi,  $n=4-12$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ .

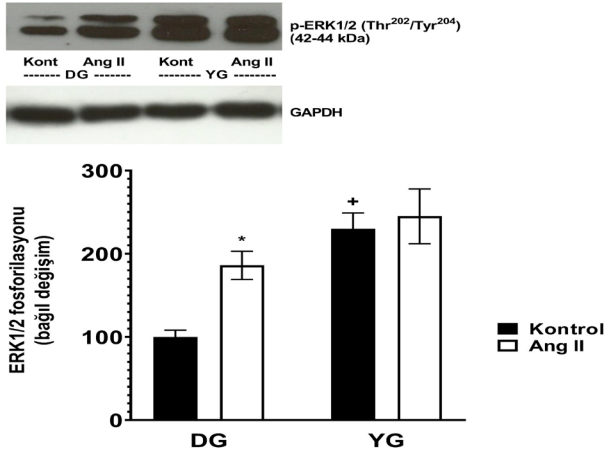
DG ve YG ortamında 24, 48 ve 72 saatte Ang II uyarımlı VDKH proliferasyonu ve inhibitörlerin etkisini daha detaylı incelemek için **Şekil 4**'e bakılabilir (Şekil 4A-C, veriler Şekil 2 ve 3'tekiler ile aynıdır).



**Şekil 4:** Ang II ve YG'un VDKH proliferasyonuna etkisi. **A.** 24 sa sonunda etkisi. **B.** 48 sa sonunda etkisi. **C.** 72 sa sonunda etkisi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  ss olarak ifade edildi,  $n=4-8$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ . Veriler Şekil 2 ve 3'tekiler ile aynıdır (24, 48 ve 72 saatlik sürelerle göre yeniden düzenlenmiştir).

## ERK1/2 MAPK fosforilasyonunda Ang II ve yüksek glukoz etkisi

Ang II ve YG uyarımlı artmış VDKH proliferasyonunun p38 ve ERK1/2 MAPK inhibitörü uygulandığında azaldığı görüldü. ERK1/2 MAPK fosforilasyonunun protein düzeyinde doğrudan göstermek ve proliferasyon verisini desteklemek amacıyla ERK1/2 MAPK fosforilasyonu ölçüldü. Sonuç olarak DG ve YG ortamında Ang II uygulanan VDKH'nde (48 sa, 100 nM) ERK1/2 MAPK fosforilasyonunun DG ortamında kontrole kıyasla yaklaşık 2 kat arttığını ( $p<0.05$ ), bu artışın YG ortamında hafif olmakla birlikte anlamlı olmadığı tespit edildi (**Şekil 5A-B**). Kontrol grupları karşılaştırıldığında YG'un DG'ya kıyasla hücrelerde ERK1/2 MAPK fosforilasyonunu 2 kattan daha fazla artırdığı belirlendi ( $p<0.05$ , Şekil 5A-B).



**Şekil 5:** Ang II ve YG ERK1/2 MAPK fosforilasyonunu artırır. VDKH'ne DG ve YG ortamında 100 nM Ang II'nin 48 sa uygulanması ERK1/2 MAPK fosforilasyonunu (Thr202 ve Tyr204) uyarır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  ss olarak ifade edildi, n=3, \* $p<0.05$ , + $p<0.05$ ; DG-kontrole karşı.

## TARTIŞMA

Hipertansiyon, ateroskleroz ve inme önde gelen kardiyovasküler hastalıklardandır. Bu hastalıkların gelişiminde rol oynayan patofizyolojik mekanizmaların kavşak noktalarından biri de VDKH'dir. Ang II bu hücrelerde proliferasyonu artırabilir. VDKH'nde proliferasyon dengesi hayatidir zira aterosklerotik plak oluşum basamaklarında artmış proliferasyon söz konusudur (2).

Ayrıca diyabetlilerde normal bireylere kıyasla çok daha hızlı şekilde ateroskleroz geliştiği bilinmekte olup bu durumdan kontrol altında olmayan yüksek glukoz konsantrasyonu ve ilişkili artmış VDKH proliferasyonu sorumlu görülmektedir (13). Diğer taraftan Ang II ve YG'un belli şartlar altında bu etkiye yol açmadığını iddia

eden yayınlar olduğu gibi (9, 14) birlikte hareket ederek proliferasyonu tek başına olduğundan daha fazla artırdığını söyleyen çalışmalar da mevcuttur (6). Burdan yola çıkarak bu çalışmada DG ve YG ortamında Ang II'nin VDKH'nde proliferasyon üzerine etkisi ve bu etkinin hangi yollardan kaynaklı olabileceğinin incelenmesi amaçlandı.

Deney sonuçları 100 nM derişimdeki Ang II'nin VDKH'nde proliferasyonu artırdığını daha önceki çalışmalarla (15) uyumlu bir şekilde gösterdi. Gao ve ark. aynı doz Ang II uygulaması sonrasında 24, 48 ve 72 saatlik proliferasyonlarda artan bir trend ve 72. saatte maksimum proliferasyon gözlemlerine rağmen (16) bulgularında bu durumu tespit edemedim. DG ortamında 24 saatten uzun süreler Ang II'nin etkinliğini azaltıyor gözükmektedir. Zira 24 saate kıyasla 48 ve 72 sa inkübasyonlarda Ang II'nin proliferatif etkisi azalmış ve anlamlı bulunamamıştır. Bunun nedeni ise Ang II'nin in vitro yarı ömrünün kısa olması olabilir (17). Diğer taraftan Yu ve ark. yapmış oldukları çalışmada 100 nM Ang II'nin 24, 48 ve 72 saatte proliferasyon üzerine herhangi bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir (18). Bu gözlem ile bulgularım uyuşmamaktadır. YG'un VDKH'nde proliferasyonu artırdığı diğer araştırmacılar tarafından da gösterilmiştir (19, 20). Çalışmamın sonuçları da bu bulguları destekler niteliktedir. AT1R antagonistleri telmisartan ve irbesartanın Ang II'nin etkilerini ortadan kaldırması beklenen sonuçlardır. Diğer taraftan YG ortamında telmisartanın Ang II'nin uyardığı proliferasyonu baskılamada irbesartana göre üstünlüğünü tespit ettim. Bu gözlemim başka çalışmalar tarafından da belirlenmiş ve gözlemlerimi destekler niteliktedir (21, 22). Özellikle stent takılan hastalarda restenozda arteriyel yeniden modellenme görülebilmektedir. Bu sebeple bu gözlemler tek başına yeterli olmasa ve in vivo çalışmalara gereksinim olsa da diyabetik hipertansif hastalarda ilaç seçiminde telmisartanın in vitro VDKH proliferasyonunu daha etkili şekilde baskılayabileceği akıldaki bulundurulmalıdır.

Çalışmamdaki en önemli bulgulardan birisi NF- $\kappa$ B inhibitörü JSH-23 uygulanan hücrelerdeki artmış proliferasyondur. Bu etki DG grubunda çok daha kuvvetli olmakla birlikte hem DG hem de YG ortamında tespit edildi. DG grubunda 24, 48 ve 72 sa sonunda bütün gruplarda anlamlılık varken ( $p<0.01$ , Şekil 2), YG grubunda sadece 72

saat anlamlı bulundu ( $p < 0.01$ , Şekil 3). Bunun nedeni ise YG ortamının bizatihi kendisinin NF- $\kappa$ B indüksiyonuna yol açabilmesi olabilir. P38 ve ERK1/2 MAPK inhibitörleri ile yapılan deneylerde proliferasyonun azalması umulan sonuçlardan biridir. Lu ve ark. ile Wang ve ark.'nın yaptıkları çalışmalar proliferasyonu önlemede bu iki inhibitörün birbirine üstünlüğünü tespit edemese de çalışmamda YG ortamında PD98059 kullanımına kıyasla SB203580 kullanılmasının proliferasyonu daha iyi baskıladığını gözledim (23, 24). Diğer çalışmalar bu çalışmadan farklı olarak YG ortamında bu etkiyi incelememişlerdir. YG ortamında bu etkinin görülme sebebi YG'un ERK1/2 MAPK'dan daha güçlü şekilde p38 MAPK aktivasyonuna yol açması ve bu etkinin 48. saat sonunda 24. saate göre daha fazla olması olabilir (25, 26). Ang II ve YG'un p38 ve ERK1/2 MAPK gibi proliferasyon yollarını aktive ettiği gösterilmiştir (27 - 29). Kim ve ark. yaptıkları çalışmada Ang II ve YG'un sinerjistik bir şekilde VDKH proliferasyonunu uyardığını ortaya koymuşlardır. Yine bu çalışmada ERK1/2 MAPK fosforilasyonunun hem Ang II hem de YG tarafından ayrı ayrı uyarıldığı, ikisinin kombine uygulanmasının ise ERK1/2 MAPK fosforilasyonunu daha fazla artırmadığı da gösterilmiştir (6). Çalışmamın bulguları Kim ve ark.'nın hem proliferasyon hem de ERK1/2 MAPK fosforilasyon verileri ile uyumludur. Kim ve ark. bir saat Ang II uyarımı sonrasında ERK1/2 MAPK fosforilasyonunu incelerken, bu çalışmada 48 saat sonundaki etki belirlendi. Ayrıca artmış ERK1/2 MAPK fosforilasyonu Ang II ve YG uyarımlı proliferasyon artışlarını doğrular niteliktedir.

Özetle, Ang II ve yüksek glukozun VDKH'nde proliferasyonu artırdığı, ERK1/2 MAPK fosforilasyonunu uyardığı mevcut çalışma ile ortaya konmuştur. Antihipertansif ilaç telmisartanın irbesartana göre YG ortamında Ang II uyarımlı proliferasyonu daha iyi baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca NF- $\kappa$ B inhibitörü JSH-23 uygulanan hücrelerde artmış proliferasyon tespit edilmiştir. Yüksek glukoz ortamında Ang II'nin atrogenez ve kardiyovasküler hastalıklar üzerine olan olumsuz etkileri daha fazla artmaktadır. Bu tablo diyabet hastası hipertansif bireylerde kan glukoz düzeyini kontrol altına almanın önemini vurgulamaktadır.

## TEŞEKKÜR

Çalışma için herhangi bir yerden maddi destek alınmamıştır. Çalışma esnasındaki her türlü desteklerinden dolayı Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA'ya teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

1. Eguchi S, Kawai T, Scalia R, et al. Understanding Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling in Vascular Pathophysiology. *Hypertension*. 2018;71(5):804-10.
2. St Paul A, Corbett CB, Okune R, et al. Angiotensin II, Hypercholesterolemia, and Vascular Smooth Muscle Cells: A Perfect Trio for Vascular Pathology. *International Journal Of Molecular Sciences*. 2020;21(12):4525.
3. Shaw S, Wang X, Redd H, et al. High Glucose Augments the Angiotensin II-induced Activation of JAK2 in Vascular Smooth Muscle Cells via the Polyol Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(33):30634-41.
4. Won SM, Park YH, Kim HJ, et al. Catechins inhibit angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Experimental & Molecular Medicine*. 2006;38(5):525-34.
5. Lavrentyev EN, Estes AM, Malik KU. Mechanism of High Glucose-Induced Angiotensin II Production in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*. 2007;101(5):455-64.
6. Kim YH, Han HJ. Synergistic effect of high glucose and ANG II on proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of PKC and MAPKs as well as AT1 receptor. *Journal of Cellular Physiology*. 2008;215(2):374-82.
7. Wolf G, Wenzel U, Burns KD, et al. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney International*. 2002;61(6):1986-95.
8. Hattori Y, Hattori S, Sato N, et al. High-glucose-induced nuclear factor kappaB activation in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*. 2000;46(1):188-97.
9. Li Y, Song Y-H, Mohler J, et al. Ang II induces apoptosis of human vascular smooth muscle via extrinsic pathway involving inhibition of Akt phosphorylation and increased FasL expression. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006;290(5):2116-23.
10. Wang J, Fu D, Senouthai S, et al. Critical roles of PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B survival axis in angiotensin II-induced podocyte injury. *Mol Med Rep*. 2019;20(6):5134-44.
11. Han X, Wang B, Sun Y, Huang J et al. Metformin Modulates High Glucose-Incubated Human Umbilical Vein Endothelial Cells Proliferation and Apoptosis Through AMPK/CREB/BDNF Pathway. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1266.

- 12.** Kırça M, Oğuz N, Çetin A, et al. Uric acid stimulates proliferative pathways in vascular smooth muscle cells through the activation of p38 MAPK, p44/42 MAPK and PDGFR $\beta$ . *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2017;37(2):167-73.
- 13.** Katakami N. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *J Atheroscler Thromb*. 2018;25(1):27-39.
- 14.** Jiao L, Jiang M, Liu J, et al. Nuclear factor-kappa B activation inhibits proliferation and promotes apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Vascular*. 2018;26(6):634-40.
- 15.** Yu C, Chen J, Guan W, et al. Activation of the D4 dopamine receptor attenuates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells through downregulation of AT1a receptor expression. *Hypertension Research*. 2015;38(9):588-96.
- 16.** Dengfeng G, Xiaolin N, Ning N, et al. Regulation of Angiotensin II-Induced Krüppel-Like Factor 5 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2006;29:2004-8.
- 17.** Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*. 2018;98(3):1627-738.
- 18.** Yu KY, Wang YP, Wang LH, et al. Mitochondrial KATP channel involvement in angiotensin II-induced autophagy in vascular smooth muscle cells. *Basic Research in Cardiology*. 2014;109:416.
- 19.** Xi G, Shen X, Wai C, et al. Hyperglycemia induces vascular smooth muscle cell dedifferentiation by suppressing insulin receptor substrate-1-mediated p53/KLF4 complex stabilization. *Journal of Biological Chemistry*. 2019;294(7):2407-21.
- 20.** Zhou D-M, Ran F, Ni H-Z et al. Metformin inhibits high glucose-induced smooth muscle cell proliferation and migration. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(6):5352-61.
- 21.** Benson SC, Iguchi R, Ho CI, et al. Inhibition of cardiovascular cell proliferation by angiotensin receptor blockers: are all molecules the same? *Journal of Hypertension*. 2008;26(5):973-80.
- 22.** Yamamoto K, Ohishi M, Ho C, et al. Telmisartan-induced inhibition of vascular cell proliferation beyond angiotensin receptor blockade and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2009;54(6):1353-9.
- 23.** Lu Q, Qiu T-Q, Yang H. Ligustilide inhibits vascular smooth muscle cells proliferation. *European Journal of Pharmacology*. 2006;542(1):136-40.
- 24.** Wang Y, Zhang X, Gao L et al. Cortistatin exerts antiproliferation and antimigration effects in vascular smooth muscle cells stimulated by Ang II through suppressing ERK1/2, p38 MAPK, JNK and ERK5 signaling pathways. *Annals of Translational Medicine*. 2019;7(20):561.
- 25.** Igarashi M, Wakasaki H, Takahara N, et al. Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. *J Clin Invest*. 1999;103(2):185-95.
- 26.** Xu ZG, Kim KS, Park HC, et al. High glucose activates the p38 MAPK pathway in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Kidney International*. 2003;63(3):958-68.
- 27.** Kırça M, Yeşilkaya A. Losartan inhibits EGFR transactivation in vascular smooth muscle cells. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2018;48(6):1364-71.
- 28.** Çağlar S, Çetin A, Uzuner F, et al. The role of AT1 receptor, Ras and NAD(P)H oxidase on p38 MAPK phosphorylation by angiotensin II stimulation in primary cultured vascular smooth muscle cells. *Turk J Bioch*. 2012;37(4):407-16.
- 29.** Montezano AC, Nguyen Dinh Cat A, Rios FJ, Touyz RM. Angiotensin II and Vascular Injury. *Current Hypertension Reports*. 2014;16(6):431.