

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SEÇİCİ RHO-KİNAZ İNHİBİTÖRÜ Y-27632'NİN PERİFERİK
İSKEMİ/REPERFÜZYONA BAĞLI HEDEF ORGAN İSKELET KASI
VE UZAK ORGAN BÖBREK HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Ecz. Ayşe Nihal SARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

MERSİN - 2010

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SEÇİCİ RHO-KİNAZ İNHİBİTÖRÜ Y-27632'NİN PERİFERİK
İSKEMİ/REPERFÜZYONA BAĞLI HEDEF ORGAN İSKELET KASI
VE UZAK ORGAN BÖBREK HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Ecz. Ayşe Nihal SARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP SBE EMB ANS 2008-9 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

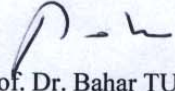
Tez No:

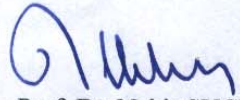
MERSİN - 2010

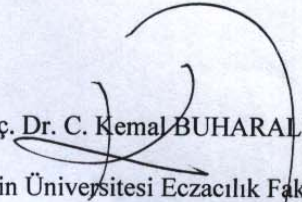
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

"Eczacılık Farmakoloji Anabilim Dalı Eczacılık Farmakoloji Yüksek Lisans Programı" çerçevesinde yürütülmüş olan "Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin periferik iskemi/reperfüzyona bağlı hedef organ iskelet kası ve uzak organ böbrek hasarı üzerine etkisi" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/01/2010


Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Nehir SUCU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı
Jüri Üyesi


Yrd. Doç. Dr. C. Kemal BUHARALIOĞLU
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun14.01.2010.... tarih ve18/2 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. LU

TEŞEKKÜR

Tez dönemim boyunca benden desteğini esirgemeyen, deneyimleri ile her türlü yardımda bulunan tez danışman hocam, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sn. Bahar TUNÇTAN'a teşekkür ederim.

Tez düşüncesinin ortaya çıkmasında emek veren ve şu an Amerika'da olan eski tez danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Sn. Seyhan ŞAHAN FIRAT'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Dr. Ecz. Sn. Belma KORKMAZ'a ve Uzm. Ecz. Sn. Tuba CÜEZ'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda sıçanlarda iskemi/reperfüzyon modelinin oluşturulması, biyokimyasal ölçümler ve histopatolojik incelemelere yaptıkları katkılardan dolayı Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Sn. Necmiye CANACANKATAN ve Yüksek Lisans Öğrencisi Sn. Ayşegül GÖRÜR'e, Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Sn. Nehir SUCU ve Dr. Özden VEZİR'e, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Sn. Ş. Nejat YILMAZ ve asistanlarına, Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Sn. Lülüfer TAMER ve Dr. Lokman AYZAZ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı BAP SBE EMB ANS 2008-9 YL nolu proje olarak destekleyen Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca sabır ve desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xx
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ÖZET	xx
ABSTRACT	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 İ/R Hasarı	3
2.1.1 Özellikleri	3
2.1.2 Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	4
2.2 Rho-Kinaz	9
2.2.1 Özellikleri	9
2.2.2 Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi	10
2.2.3 Fizyolojik Olaylardaki Rolü	12
2.2.4 Patolojik Olaylardaki Rolü	15
2.2.5 İnhibitörleri	17

2.3 NOS'ler	18
2.3.1 Özellikleri	18
2.3.2 Ekspresyon ve Etkinliklerinin Düzenlenmesi	22
2.3.3 Fizyolojik Olaylardaki Rolü	24
2.3.4 Patolojik Olaylardaki Rolü	26
2.4 Oksidatif Stres	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1 GEREÇ	30
3.1.1 Deney Hayvanı	30
3.1.2 Sarf Malzemesi	30
3.1.3 Teçhizat	32
3.1.4 Kimyasal Maddelerin Hazırlanmaları	33
3.2 YÖNTEM	34
3.2.1 İ/R Çalışmaları	34
3.2.2 Serum ve Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması	34
3.2.3 Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Toplam Protein Düzeyinin Ölçülmesi	35
3.2.4 Serum ve/veya Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Nitrit, MDA ve GSH Düzeyleri ile Rho-Kinaz, MPO, SOD ve Katalaz Etkinliklerinin Ölçülmesi	35
3.2.5 Histopatolojik İnceleme	37
3.2.6 Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1 Rho-Kinaz Etkinliği	38
4.1.1 Böbrek Rho-Kinaz Etkinliği	38
4.1.1.1 İ/R'nin Böbrek Rho-Kinaz Etkinliği Üzerindeki Etkisi	38
4.1.1.2 İ/R Sonucunda Artan Böbrek Rho-Kinaz Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	39

4.1.2 Gastroknemius Kası Rho-Kinaz Etkinliği	40
4.1.2.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası Rho-Kinaz Etkinliği	
Üzerindeki Etkisi	40
4.1.2.2 İ/R Sonucunda Azalan Gastroknemius Kası Rho-Kinaz	
Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	40
4.2 Nitrit Düzeyleri	41
4.2.1 Serum Nitrit Düzeyleri	41
4.2.1.1 İ/R'nin Serum Nitrit Düzeyleri Üzerindeki Etkisi	41
4.2.1.2 İ/R Sonucunda Artan Serum Nitrit Düzeyleri Üzerinde	
Y-27632'nin Etkisi	42
4.2.2 Böbrek Nitrit Düzeyleri	43
4.2.2.1 İ/R'nin Böbrek Nitrit Düzeyleri Üzerindeki Etkisi	43
4.2.2.2 İ/R Sonucunda Artan Böbrek Nitrit Düzeyleri Üzerinde	
Y-27632'nin Etkisi	43
4.2.3 Gastroknemius Kası Nitrit Düzeyleri	43
4.2.3.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası Nitrit Düzeyleri Üzerindeki	
Etkisi	43
4.2.3.2 İ/R Sonucunda Artan Gastroknemius Kası Nitrit Düzeyleri	
Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	44
4.3 MPO Etkinliği	45
4.3.1 Serum MPO Etkinliği	45
4.3.1.1 İ/R'nin Serum MPO Etkinliği Üzerindeki Etkisi	45
4.3.1.2 İ/R Sonucunda Artan Serum MPO Etkinliği Üzerinde	
Y-27632'nin Etkisi	46
4.3.2 Böbrek MPO Etkinliği	47
4.3.2.1 İ/R'nin Böbrek MPO Etkinliği Üzerindeki Etkisi	47
4.3.2.2 İ/R Sonucunda Artan Böbrek MPO Etkinliği Üzerinde	
Y-27632'nin Etkisi	47

4.3.3 Gastroknemius Kası MPO Etkinliği	47
4.3.3.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası MPO Etkinliği Üzerindeki Etkisi	47
4.3.3.2 İ/R Sonucunda Artan Gastroknemius Kası MPO Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	48
4.4 MDA Düzeyleri	49
4.4.1 Serum MDA Düzeyleri	49
4.4.1.1 İ/R'nin Serum MDA Düzeyleri Üzerindeki Etkisi	49
4.4.1.2 İ/R Sonucunda Artan Serum MDA Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	50
4.4.2 Böbrek MDA Düzeyleri	51
4.4.2.1 İ/R'nin Böbrek MDA Düzeyleri Üzerindeki Etkisi	51
4.4.2.2 İ/R Sonucunda Artan Böbrek MDA Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	51
4.4.3 Gastroknemius Kası MDA Düzeyleri	51
4.4.3.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası MDA Düzeyleri Üzerindeki Etkisi	51
4.4.3.2 İ/R Sonucunda Artan Gastroknemius Kası MDA Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	52
4.5 SOD Etkinliği	53
4.5.1 Böbrek SOD Etkinliği	53
4.5.1.1 İ/R'nin Böbrek SOD Etkinliği Üzerindeki Etkisi	53
4.5.1.2 İ/R Sonucunda Artan Böbrek SOD Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	54
4.5.2 Gastroknemius Kası SOD Etkinliği	55
4.5.2.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası SOD Etkinliği Üzerindeki Etkisi	55
4.5.2.2 İ/R Sonucunda Artan Gastroknemius Kası SOD Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	55

4.6 Katalaz Etkinliği	56
4.6.1 Böbrek Katalaz Etkinliği	56
4.6.1.1 İ/R'nin Böbrek Katalaz Etkinliği Üzerindeki Etkisi	56
4.6.1.2 İ/R Sonucunda Azalan Böbrek Katalaz Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	57
4.6.2 Gastroknemius Kası Katalaz Etkinliği	58
4.6.2.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası Katalaz Etkinliği Üzerindeki Etkisi	58
4.6.2.2 İ/R Sonucunda Azalan Gastroknemius Kası Katalaz Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	58
4.7 GSH Düzeyleri	59
4.7.1 Böbrek GSH Düzeyleri	59
4.7.1.1 İ/R'nin Böbrek GSH Düzeyleri Üzerindeki Etkisi	59
4.7.1.2 İ/R Sonucunda Artan Böbrek GSH Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	60
4.7.2 Gastroknemius Kası Katalaz Etkinliği	61
4.7.2.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası GSH Düzeyleri Üzerindeki Etkisi	61
4.7.2.2 İ/R Sonucunda Artan Gastroknemius Kası GSH Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	61
4.8 Histopatolojik İnceleme Sonuçları	62
4.8.1 Böbrek	62
4.8.1.1 İ/R'nin Böbrekte Neden Olduğu Histopatolojik Değişiklikler	62
4.8.1.2 İ/R Sonucunda Böbrekte Oluşan Histopatolojik Değişiklikler Üzerinde Y-27632'nin Etkisi	62

4.8.2 Gastroknemius Kası	64
4.8.2.1 İ/R'nin Gastroknemius Kasında Neden Olduğu	
Histopatolojik Değişiklikler	64
4.8.2.2 İ/R Sonucunda Gastroknemius Kasında Oluşan	
Histopatolojik Değişiklikler Üzerinde Y-27632'nin	
Etkisi	64
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	70
7. KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İ/R'ye maruz kalan postkapiler venüllerde gözlenen inflamatuvar yanıtları açıklayan endotele bağımlı mekanizmalar	6
Şekil 2.2. Hipoksi sırasında hücre içinde ATP derişiminin azalması ile ilgili olarak hücre metabolizması, iyonik denge ve yapısal proteinlerde ortaya çıkan değişiklikler	8
Şekil 2.3. Rho-kinaz etkinliğinin düzenlenmesi	10
Şekil 2.4. Küçük G proteininin etkinleşmesi sırasında gelişen olaylar	10
Şekil 2.5. Düz kas kasılmasının düzenlenmesinde Rho/Rho-kinaz sinyal ileti yolunun rolü	14
Şekil 2.6. ROCK'lerin çeşitli kardiyovasküler hastalıklardaki rolü	15
Şekil 2.7. Rho-kinazın çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patojenezindeki rolü	16
Şekil 2.8. NO'nun fizyolojik ve patofizyolojik olaylardaki rolü	25
Şekil 2.9. Oksidatif stres, hücre solunumu ve çevresel etkenler ile oluşumu artan süeroksit radikalının aracılık ettiği, protein oksidasyonu, DNA hasarı ve lipit peroksidasyonu ile sonuçlanan olaylar dizisi	29
Şekil 4.1. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknemius kası Rho-kinaz etkinliği üzerindeki etkisi	39
Şekil 4.2. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin serum, böbrek ve gastroknemius kası nitrit düzeyleri üzerindeki etkisi	42
Şekil 4.3. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin serum, böbrek ve gastroknemius kası MPO etkinliği üzerindeki etkisi	46

Şekil 4.4. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin serum, böbrek ve gastroknemius kası MDA düzeyleri üzerindeki etkisi	50
Şekil 4.5. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknemius kası SOD etkinliği üzerindeki etkisi	54
Şekil 4.6. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknemius kası katalaz etkinliği üzerindeki etkisi	57
Şekil 4.7. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknemius kası GSH düzeyleri üzerindeki etkisi	60
Şekil 4.8. (A) Kontrol grubu böbrek glomerüllerinde normal görünümlü bazal membran (ok başı), podositler (p), pediseller (ok), mezangiyal hücre (m) ve kapiler damar içerisinde eritrositler (e) (x5000). (B) İ/R grubunda böbrek glomerülünde genişlemiş kapiler damarlar içerisinde konjesyona yol açan eritrositler (e), bazı bölgelerde kaynaşarak silinmiş pediseller (ok) ve bir mezangiyal hücre (x4000). (C) Y-27632 grubuna ait böbrek dokusunda normal görünümlü bazal membran (ok başı), podositler (p), pediseller (ok), mezangiyal hücre (m) ve kapiler damar içerisinde bir adet nötrofil (n) (x5000). (D) İ/R+Y-27632 grubu böbrek glomerüllerinde pedisellerde kaynaşma (ok) ve konjesyonlu kapiler damarlarda eritrositler (e) (x10000)	63

Şekil 4.9. (A) Kontrol grubuna ait nükleusu olan (n) normal görünümlü iskelet kası hücresi (x6000). (B) İ/R grubuna ait iskelet kası hücrelerinde parçalanmış miyofibriller (ok başı), şişmiş ve krista yapısı bozulmuş mitokondriyonlar (ok), genişlemiş sarkoplazmik retikulum sisternaları (asterisk), apoptotik çekirdekler (n) (x5000). (C) Y-27639 grubuna ait normal görünümlü iskelet kası hücreleri (x10000). (D) İ/R+Y-27632 grubuna ait bir iskelet kası hücresinde miyofibrillerde parçalanma (ok başı), mitokondriyonlarda dejenerasyona bağlı vakuolizasyonlar ve krista kaybı (ok), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (asterisk) ve apoptotik çekirdek fragmanları (n) (x20000)	65
Şekil 5.1. Sıçanlarda oluşturulan periferik İ/R modelinde, İ/R'nin neden olduğu böbrek ve iskelet kası hasarında Rho-kinaz, MPO, SOD ve katalaz etkinliği ile nitrit, MDA ve GSH düzeylerindeki değişikliklerin rolü ile ilgili olarak önerilen mekanizma	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Rho-kinazın substratları	9
Çizelge 2.2. Memeli NOS izoformlarının özellikleri	19
Çizelge 4.1. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknemius kası Rho-kinaz etkinliği üzerindeki etkisi	38
Çizelge 4.2. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin serum, böbrek ve gastroknemius kası nitrit düzeyleri üzerindeki etkisi	41
Çizelge 4.3. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin serum, böbrek ve gastroknemius kası MPO etkinliği üzerindeki etkisi	45
Çizelge 4.4. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin serum, böbrek ve gastroknemius kası MDA düzeyleri üzerindeki etkisi	49
Çizelge 4.5. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknemius kası SOD etkinliği üzerindeki etkisi	53
Çizelge 4.6. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknemius kası katalaz etkinliği üzerindeki etkisi	56
Çizelge 4.7. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknemius kası GSH düzeyleri üzerindeki etkisi	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

20-HETE	20-Hidroksieikozatetraenoik asit (<i>20-hydroxyeicosatetraenoic acid</i>)
a/h	Ağırlık/hacim
ψ_m	Sarkoplazmik membran potansiyeli (<i>sarcoplasmic membrane potential</i>)
ψ_{mito}	Mitokondriyal membran potansiyeli (<i>mitochondrial membrane potential</i>)
ADP	Adenozin difosfat (<i>adenosine diphosphate</i>)
AP-1	Etkinleştirici protein-1 (<i>activating protein-1</i>)
Apaf-1	Apoptotik proteaz etkinleştirici faktör-1 (<i>apoptotic protease activating factor-1</i>)
AGEs	İleri glikosilasyon son ürünleri (<i>advanced glycosylation end products</i>)
ATP	Adenozin trifosfat (<i>adenosine triphosphate</i>)
BH ₄	Tetrahidrobiopterin (<i>tetrahydrobiopterin</i>)
Can-L	L türü kalsiyum kanalı (<i>L-type calcium channel</i>)
CAPON	<i>COOH-terminal postsynaptic density-95/discs large/zona occludens-1 ligand of neuronal nitric oxide synthase</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CPI-17	<i>17-kDa protein kinase C-potentiated inhibitory protein of protein phosphatase-1</i>
CRMP-2	<i>Collapsin response mediator protein-2</i>
CYP	Sitokrom P450 (<i>cytochrome P450</i>)
DAG	Diaçilgliserol (<i>diacylglycerol</i>)

DNA	Deoksiribonükleik asit (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz (<i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ERM	Ezrin-radiksin-moesin (<i>ezrin-radixin-moesin</i>)
ET	Endotoksin (<i>endotoxin</i>)
F	Farnesil (<i>farnesyl</i>)
FAD	Flavin adenin dinükleotit (<i>flavin adenine dinucleotide</i>)
FGF	Fibroblast büyüme faktörü (<i>fibroblast growth factor</i>)
FLC	Fosfolipaz C (<i>phospholipase C</i>)
FMN	Flavin mononükleotit (<i>flavin mononucleotide</i>)
Foxp3	<i>Forkhead box 3</i>
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GAP	Guanozin 5'-trifofosfatazi etkinleştirici protein (<i>guanosine 5'-triphosphatase-activating protein</i>)
GDI	Guanozin difosfat ayrışma inhibitörü (<i>guanosine diphosphate dissociation inhibitor</i>)
GDP	Guanozin difosfat (<i>guanosine diphosphate</i>)
GEF	Guanin nükleotit değişim faktörü (<i>guanine nucleotid exchange factor</i>)
GG	Geranilgeranil (<i>geranylgeranyl</i>)
GİS	Gastrointestinal sistem (<i>gastrointestinal system</i>)
GP _x	Glutatyon peroksidaz (<i>glutathione peroxidase</i>)
GRed	Glutatyon redüktaz (<i>glutathione reductase</i>)
GSH	İndirgenmiş glutatyon (<i>reduced glutathione</i>)
GSSG	Oksitlenmiş glutatyon (<i>oxidized glutathione</i>)
GTP	Guanozin 5'-trifofosfat (<i>guanosine 5'-triphosphate</i>)
GTPaz	Guanozin 5'-trifofosfataz (<i>guanosine 5'-triphosphatase</i>)
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit (<i>hydrogen peroxide</i>)

HIF1	Hipoksi ile indüklenebilen faktör 1 (<i>hypoxia-inducible factor 1</i>)
hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
HIV	İnsan immün yetersizlik virüsü (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HOCL	Hipokloröz asit (<i>hypochlorous acid</i>)
HOONO	Peroksinitröz asit (<i>peroxynitrous acid</i>)
[i]	Hücre içi iyon derişimi (<i>intracellular ion concentration</i>)
ICAM	İntraselüler adezyon molekülü (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
IGF1	İnsüline benzeyen büyüme faktörü (<i>insulin-like growth factor 1</i>)
IL	İnterlökin (<i>interleukin</i>)
IRF1	İnterferon düzenleyici faktör 1 (<i>interferon regulatory factor 1</i>)
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IFN	İnterferon (<i>interferon</i>)
IM	İntramüsküler (<i>intramuscular, intramuscularly</i>)
IP	İntraperitoneal (<i>intraperitoneal, intraperitoneally</i>)
İ/R	İskemi/Reperfüzyon (<i>ischemia/reperfusion</i>)
I/R	İskemi/Reperfüzyon (<i>ischemia/reperfusion</i>)
LPA	Lizofosfotidik asit (<i>lysophosphatidic acid</i>)
LPS	Lipopolisakkarit (<i>lipopolysaccharide</i>)
LTB ₄	Lökotrien B ₄ (<i>leukotriene B₄</i>)
m	Mezangiyal hücre (<i>mesangial cell</i>)
MDA	Malondialdehit (<i>malondialdehyde</i>)
MHZ	Miyozin hafif zincir (<i>myosin light chain</i>)
MHZK	Miyozin hafif zincir kinaz (<i>myosin light chain kinase</i>)
MPO	Miyeloperoksidaz (<i>myeloperoxidase</i>)
mRNA	Haberci ribonükleik asit (<i>messenger RNA</i>)
n	Nötrofil (<i>neutrophil</i>)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NAP110	Nitrik oksit sentaz ile ilişkili protein 110 (<i>nitric oxide synthase-associated protein 110</i>)

NED	N-1-Naftiletildiamin dihidroklorür (<i>N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride</i>)
NF-κB	Nükleer faktör-κB (<i>nuclear factor-κB</i>)
NO	Nitrik oksit (<i>nitric oxide</i>)
NO•	Nitrik oksit radikali (<i>nitric oxide radical</i>)
NO ₂ •	Nitrojen dioksit radikali (<i>nitrogen dioxide radical</i>)
NO ₂ ⁻	Nitrit (<i>nitrite</i>)
NO ₃ ⁻	Nitrat (<i>nitrate</i>)
NOS	Nitrik oksit sentaz (<i>nitric oxide synthase</i>)
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz (<i>neuronal nitric oxide synthase</i>)
NMDA	N-Metil-D-aspartik asit (<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>)
NOS I	Nöronal nitrik oksit sentaz (<i>neuronal nitric oxide synthase</i>)
NOS II	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
NOS III	Endotelial nitrik oksit sentaz (<i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
NOSIP	Endotelial nitrik oksit sentaz ile etkileşen protein (<i>endothelial nitric oxide synthase-interacting protein</i>)
NOSTRIN	<i>Endothelial nitric oxide synthase traffic inducer</i>
O ₂	Moleküler oksijen (<i>molecular oxygen</i>)
¹ O ₂	singlet oksijen (<i>singlet oxygen</i>)
OH•-	Hidroksil radikali (<i>hydroxyl radical</i>)
ONOO ⁻	Peroksinitrit (<i>peroxynitrite</i>)
OP	Oksidatif fosforilasyon zinciri (<i>oxidative phosphorylation chain</i>)
O ₂ • ⁻	Süperoksit radikali (<i>superoxide radical</i>)
P	Palmitoil (<i>palmitoyl</i>)
P	İstatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi (<i>probability</i>)
p	Podosit (<i>podocyte</i>)
PAF	Trombosit etkinleştirici faktör (<i>platelet activating factor</i>)
PARP	PoliADP-riboz polimeraz (<i>polyADP-ribose polymerase</i>)
PDZ	<i>Postsynaptic density-95/discs large/zona occludens-1</i>

Pi	İnorganik fosfat (<i>inorganic phosphate</i>)
PGI ₂	Prostasiklin (<i>prostacyclin</i>)
PIN	<i>Dynein light chain</i>
PFK	Fosfofruktokinaz (<i>phosphofructokinase</i>)
PG	Prostaglandin (<i>prostaglandin</i>)
PH	Plekstrin homoloji bölgesi (<i>plextrin holomology site</i>)
PKC	Protein kinaz C (<i>protein kinase C</i>)
PKG	Protein kinaz G (<i>protein kinase G</i>)
PI3K	Fosfoinozitol-3-kinaz (<i>phosphoinositide-3-kinase</i>)
PKC	Protein kinaz C (<i>protein kinase C</i>)
PKN	Protein kinaz N (<i>protein kinase N</i>)
PMCA	Plazma membranı kalsiyum/kalmoduline bağımlı Ca ²⁺ -ATPaz (<i>plasma membrane calcium/calmodulin-dependent Ca²⁺-ATPase</i>)
PSD	<i>Postsynaptic density</i>
PMNL	Polimorfonükleer lökosit (<i>polymorphonuclear leukocyte</i>)
PTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
RB	Rho bağlayıcı bölge (<i>Rho-binding site</i>)
ROT	Reaktif oksijen türleri (<i>reactive oxygen species</i>)
RNT	Reaktif nitrojen türleri (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROCK	Rho-kinaz (<i>Rho-kinase</i>)
ROK	Rho-kinaz (<i>Rho-kinase</i>)
S1P	Sfingosin-1-fosfat (<i>sphingosine-1-phosphate</i>)
SA	Sülfanilamid (<i>sulphonylamide</i>)
siklik AMP	Siklik adenosin 5'-monofosfat (<i>cyclic adenosine 5'-monophosphate</i>)
siklik GMP	Siklik guanozin 5'-monofosfat (<i>cyclic guanosine 5'-monophosphate</i>)
SOD	Süperoksit dizmutaz (<i>superoxide dismutase</i>)
SPC	Sfingofosforilkolin (<i>sphingophosphorylcholine</i>)
SSA	Sığır serum albumini (<i>bovine serum albumin</i>)
SSS	Santral sinir sistemi (<i>central nervous system</i>)
STAT-3	<i>Signal transducer and activator of transcription-3</i>

STAT-1 α	<i>Signal transducer and activator of transcription-1α</i>
TxA ₂	Tromboksan A ₂ (<i>thromboxane A₂</i>)
TEF	Trombosit etkinleştirici faktör (<i>platelet activating factor</i>)
TGF	Transforme edici büyüme faktörü (<i>transforming-growth factor</i>)
TNF- α	Tümör nekroze edici faktör- α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
UV	Ultraviyole (<i>ultraviolet</i>)
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülü (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
Y-27632	Trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit (<i>trans-4-[(1R)-1-aminoethyl]-N-4-pyridinylcyclohexanecarboxamide dihydrochloride</i>)
yNOS	Yapısal nitrik oksit sentaz (<i>constitutive nitric oxide synthase</i>)
ZIPK	<i>Zipper interacting-kinase</i>

ÖZET

Seçici Rho-Kinaz İnhibitörü Y-27632'nin Periferik İskemi/Reperfüzyona Bağlı Uzak Organ Böbrek Hasarı ve Hedef Organ İskelet Kası Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin sıçanlarda oluşturulan periferik iskemi/reperfüzyon (İ/R) sonrasında uzak organ olarak seçilen böbrekte ve hedef organ olarak seçilen gastroknemius kasında gelişebilecek hasar üzerindeki etkisi araştırıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmadı. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) dozunda madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmadı. İ/R ve İ/R+Y-27632 grubundaki sıçanların her iki arka bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açıldı ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenildi. Bu süre sonunda anestezi altındaki sıçanlardan alınan kandan ayrılan serum örneklerinde nitrit ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ile miyeloperoksidaz (MPO) etkinliği ölçüldü. Sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastroknemius kasında ise nitrit ve MDA düzeyleri ile Rho-kinaz ve MPO etkinliğinin yanında, süperoksit dizmutaz (SOD) ve katalaz enzimlerinin etkinliği ile indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri ölçüldü. Ayrıca, dokular histopatolojik açıdan incelendi. Rho-kinaz etkinliği İ/R grubundaki sıçanların böbreğinde artmasına karşın, gastroknemius kasında azaldı. Y-27632 yalnızca böbrekte İ/R grubundaki Rho-kinaz etkinliğindeki artmayı önledi. İ/R grubundaki sıçanların serum, böbrek ve gastroknemius kaslarında nitrit ve MDA düzeyleri ile MPO, SOD ve katalaz etkinliğinin artmasına karşın, GSH düzeyleri azaldı. Doku hasarı ile birlikte olan İ/R grubundaki bu değişiklikler ise Y-27632 ile önlendi. İncelenen parametreler üzerinde Y-27632 tek başına herhangi bir değişiklik oluşturmadı. Bu çalışmanın bulguları seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin sıçanlarda oluşturulan periferik İ/R sonrasında gastroknemius kası ve böbrek hasarına neden olabilecek Rho-A/Rho-kinaz yolunun aracılık ettiği olayları artmış olan NO oluşumu ile birlikte antioksidan enzimlerin etkinliğini, lipid peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu azaltabileceğini, böylece İ/R'ye bağlı olarak gelişen organ hasarının önlenmesinde yararlı olabileceğini gösterdi.

Anahtar kelimeler: Rho-kinaz, Y-27632, iskemi/reperfüzyon, gastroknemius kası, böbrek, sıçan

ABSTRACT

Effect of Selective Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 on End Organ Kidney and Target Organ Skeletal Muscle Depend on Peripheric Ischemia/Reperfusion Damage

In this study, it was investigated the effect of selective Rho-kinase inhibitor on peripheral ischemia/reperfusion (I/R)-induced injury in kidney as an end organ and gastrocnemius muscle as a target organ. Rats in control group did not receive any treatment. Rats in Y-27632 group only received Y-27632 at 100 µg/kg (IP) dose. A tourniquet was placed on right hindlimbs of the rats in I/R and I/R+Y-27632 groups. After 4 h ischemia, tourniquets were removed and the rats were released for reperfusion for 4 h thereafter. At the end of reperfusion period, sera prepared from blood samples of anesthetised rats were used for measurement of nitrite and MDA levels, and MPO activity. Levels of nitrite and MDA, and Rho-kinase and MPO activity as well as superoxide dismutase (SOD) and catalase activity and GSH levels were also measured in kidney and gastrocnemius muscle of rats. In addition, the tissues were examined histopathologically. In I/R group, Rho-kinase activity was increased in kidneys of rats, while it was decreased in gastrocnemius muscle. Y-27632 prevented the increase in Rho-kinase activity in kidney, but not in the muscle. The levels of nitrite and MDA as well as MPO, SOD and catalase activity were increased in the serum, kidney and gastrocnemius muscle of the rats in I/R group, however, GSH levels were decreased. The changes in I/R group associated with tissue damage were prevented by Y-27632. Y-27632 alone has no effect on all of the parameters. The results of the study demonstrated that selective Rho-kinase inhibitor, Y-27632, minimized the events mediated by Rho-A/Rho-kinase pathway leading to the injury of kidney and gastrocnemius muscle after peripheral I/R by decreasing NO production, activity of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and neutrophil infiltration, therefore, could have a beneficial effect to prevent I/R-induced organ damage.

Keywords: Rho-kinase, Y-27632, ischemia/reperfusion, gastrocnemius muscle, kidney, rat

1. GİRİŞ

İskeminin ardından gelişen reperfüzyon hasarı özellikle kardiyovasküler cerrahide sıklıkla karşılaşılan bir sorundur. İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı, travma, beyin ya da miyokart infarktüsü gibi beklenmeyen durumlarda ya da organ transplantasyonu gibi nedenler ile arteriyel sisteme klemp uygulanması gibi cerrahi işlem sırasında gözlenmektedir. İ/R hasarı yalnızca doğrudan etkilenen organ ile sınırlı kalmayıp, uzak organlarda da hasar oluşumuna neden olmaktadır. Uzak organ hasarı, İ/R'nin ilk ortaya çıktığı organ dışındaki dokularda özellikle böbrek ve akciğerde, gelişen önemli bir hasardır. Yapılan çalışmalarda, hastalarda yerel hasar ve sistemik inflamatuvar yanıt ile birlikte iskelet kası, bağırsak, karaciğer ve aortik oklüzyon reperfüzyonu durumlarında gelişen böbrek, akciğer veya karaciğer işlev bozukluğu ya da çoklu organ yetersizliğinin ölüme neden olduğu da bildirilmiştir (1-15).

Bir serin-treonin kinaz olan Rho-kinaz, monomerik guanozin 5'-trifosfataz (GTPaz)'ların Ras süperfamilyasının Rho alt familyasının üyesi olan küçük GTP'az Rho'nun bir alt efektörüdür. Rho/Rho-kinaz yolu aktin hücre iskeleti reorganizasyonu, sitokinez, hücre adezyonu ve migrasyonu, stres fibrillerinin oluşumu, trombosit agregasyonu, düz kas kasılması, hücre biçim değişikliği, proliferasyon ve hipertrofi gibi birçok hücresel işlevin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Moleküler düzeyde, inflamasyon, oksidatif stres ve trombus oluşumu gibi olayları tetiklerken; hücresel düzeyde, vasküler düz kas hücresi hiperkontraksiyonu ve proliferasyonuna aracılık etmekte, ayrıca inflamasyon gelişmesinde rol oynayan hücre motilitesini artırmaktadır. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda, Rho-kinazın vazospazm, arteriyoskleroz, İ/R hasarı, hipertansiyon, astım, pulmoner hipertansiyon, inme ve kalp yetersizliği gibi renal, pulmoner ve kardiyovasküler hastalıkların patojenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca, Rho-kinaz nötrofillerde NADPH oksidazı etkinleştirerek İ/R hasarının patojenezinde önemli rol oynayan reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminin

düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Y-27632 gibi Rho-kinaz inhibitörlerinin birçok kardiyovasküler hastalığın tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (16-37).

Daha önce yapılan çalışmalarda, sıçanlarda oluşturulan renal (38) ve hepatik (39) İ/R modellerinde, böbrek ve karaciğer malondialdehit (MDA) düzeyleri ve miyeloperoksidaz (MPO) etkinliğindeki artış ile birlikte görülen karaciğerde nötrofil infiltrasyonu, konjesyon, vakuolizasyon ve nekroz, böbrekte tübüler nekroz, medulla konjesyonu ve hemoraji gibi histopatolojik değişikliklerin Y-27632 ile önlenebildiği bildirilmiştir. Sıçanlarda oluşturulan çeşitli arka bacak İ/R modellerinde ise, böbrek (40, 41), akciğer (42-44) ve karaciğer (42) gibi organlar ile gastroknemius kası (42, 45, 46), hipokampus (47), serum (42, 47, 48) ve eritrosit membranında (48) nitrit, MDA, TNF- α ve makrofaj inflamatuvar protein-2 düzeyleri ile NOS ve MPO etkinliğindeki artma olduğu kadar, NO ve GSH düzeyleri ile süperoksit dizmutaz (SOD) etkinliğindeki azalmanın birlikte görüldüğü böbrekte tübüler nekroz, lökosit infiltrasyonu, vakuolizasyon, konjesyon, vasküler permeabilitede artış ve hemoraji, akciğerde lökosit infiltrasyonu, hipokampusta sinir ölümünün eşlik ettiği organ hasarı geliştiği bildirilmiştir. Öte yandan, sıçanların arka bacağına oluşturulan periferik İ/R modelinde ortaya çıkan gastroknemius kası ve böbrek hasarı üzerinde Rho-kinazın etkinliği ve seçici Rho-kinaz inhibitörü trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksan-karboksamid dihidroklorit (Y-27632)'nin oluşan hasar üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında, seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin sıçanlarda oluşturulan periferik İ/R sonrasında hedef organ olarak seçilen gastroknemius kasında ve uzak organ olarak seçilen böbrekte gelişebilecek hasar üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İ/R Hasarı

2.1.1 Özellikleri

Arterlerde herhangi bir nedene ağı olarak ortaya çıkan tıkanma sonucu, dokuya giden kan akımının bozulması iskemi olarak tanımlanmaktadır. Bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde, o dokudaki hücrelerin işlevlerinin bozulması ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşmektedir. Hücresel işlevlerin gerçekleşebilmesi için gerekli temel molekül oksijendir. Normal hücre işlevleri için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanmaktadır. Oksijen yetersizliği durumunda ise anaerobik metabolizma devreye girmektedir; bu olay da laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, ortaya çıkan asidoz nedeni ile normal enzim kinetiği değişmekte ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalmaktadır; bu durumda ise hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalmaktadır (49-51).

Reperfüzyon, iskemiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden düzenlenmesidir. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji gereksiniminin sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki olumlu etkisi vardır. Böylece, reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancak, oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü, o dokuda daha fazla hasara yol açan bir reaksiyon sürecini başlatmaktadır (5, 49, 52-54).

İskeminin ardından gelişen reperfüzyon hasarı özellikle kardiyovasküler cerrahide sıklıkla karşılaşılan bir sorundur. İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı, travma, beyin ya da miyokart infarktüsü gibi beklenmeyen durumlarda ya da organ

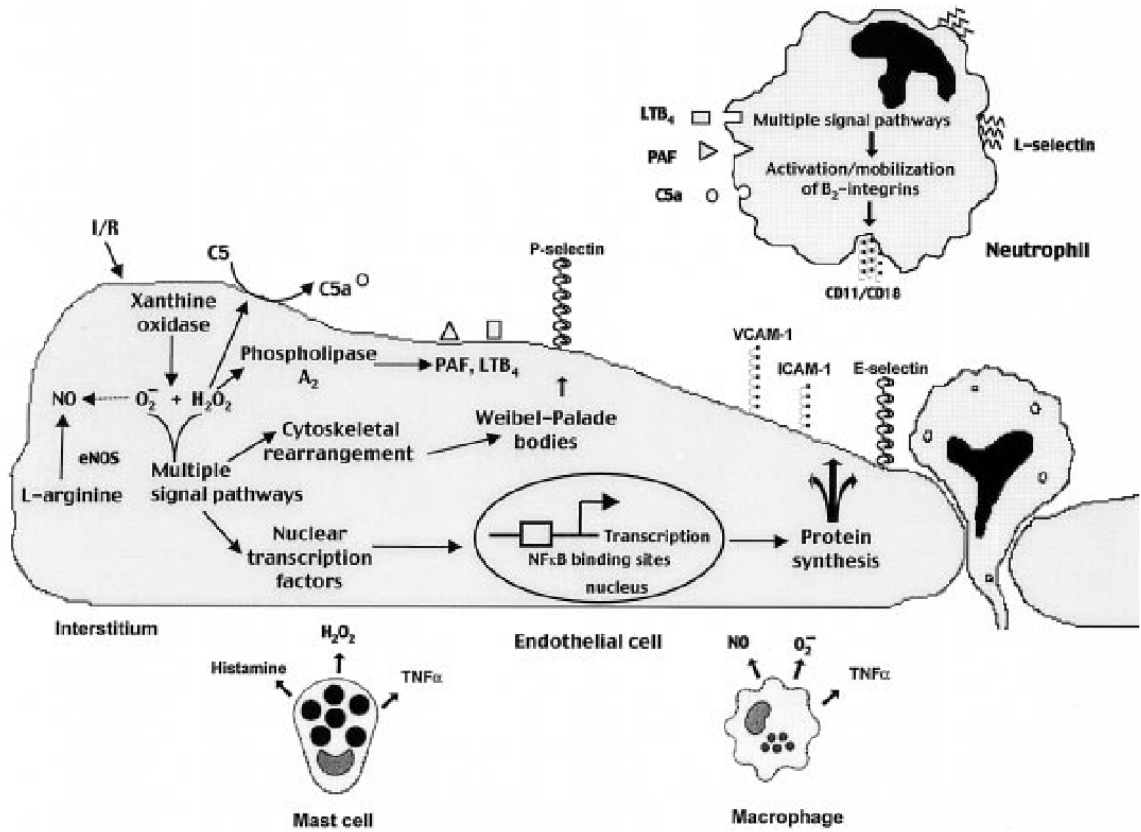
transplantasyonu gibi nedenler ile arteriyel sisteme klemp uygulanması gibi cerrahi işlem sırasında gözlenmektedir. İ/R hasarı yalnızca doğrudan etkilenen organ ile sınırlı kalmayıp, uzak organlarda da hasar oluşumuna neden olmaktadır. Uzak organ hasarı, İ/R'nin ilk ortaya çıktığı organ dışındaki dokularda özellikle böbrek ve akciğerde, gelişen önemli bir hasardır. Yapılan çalışmalarda, hastalarda yerel hasar ve sistemik inflamatuvar yanıt ile birlikte iskelet kası, bağırsak, karaciğer ve aortik oklüzyon reperfüzyonu durumlarında gelişen böbrek, akciğer veya karaciğer işlev bozukluğu ya da çoklu organ yetersizliğinin ölüme neden olduğu da bildirilmiştir. İ/R hasarının klinik yansımaları yerel, uzak ve sistemik düzeyde etkiler olmak üzere üç grupta incelenmektedir. Yerel düzeydeki etkiler hemen hemen tüm organlarda ortak bir etiyolojiden kaynaklanmaktadır; ortaya çıkan hücresel değişiklikler ise organa özgüdür. Genellikle sızıntılı kapiller yatakların yol açtığı sıvı ekstravazasyonu ve doku ödemi ile elirgin olan sistemik düzeydeki etkiler ve uzak organlarda işlev bozukluğu ise tam olarak açıklanamamış olup, genellikle "çoklu organ işlev bozukluğu sendromu" olarak da adlandırılan bir durum ile sonuçlanabilen son derece karışık süreçlerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Klinik olarak çoklu organ işlev bozukluğu sendromu renal yetersizlik ve ıveğen (akut) respiratuvar yetersizlik ile kendisini göstermektedir (1-15).

2.1.2 Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

Günlük uygulama içerisinde tıbbın pek çok dalında İ/R'nin rol oynadığı olgular bulunmaktadır. Şok, yanık, sepsis, pankreatit gibi olgularda ortaya çıkan hipovolemi ile iskemi ve bu durumların resüsite edilmesi ile de reperfüzyon hasarı ortaya çıkmaktadır. Serebrovasküler olaylarda, miyokart infarktüsünde, mezenteriyovasküler olaylarda uygulanan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon ameliyatları da yine reperfüzyon hasarına neden olmaktadır. Travmalarda ve travma cerrahilerinde hipovolemi ya da kanama kontrolü nedeni ile yapılan klemp ve tampon uygulamaları iskemiye neden olurken, resüsitasyon sonrası mutlak bir reperfüzyon ile yine İ/R hasarı ortaya çıkmaktadır. Kardiovasküler cerrahide aort ya da periferik arter klemp uygulaması sonrası ortaya çıkan tablo İ/R hasarı ile belirgindir. Transplantasyon cerrahisinde kaçınılmaz olarak transplante edilecek organın iskemi ve reperfüzyonu söz konusu olup,

oluşan hasar yama (*graft*) işlevlerini etkilemektedir. Sonuç olarak, bütün cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve sıklıkla bunu izleyen bir reperfüzyon periyodu bulunmaktadır (1-15).

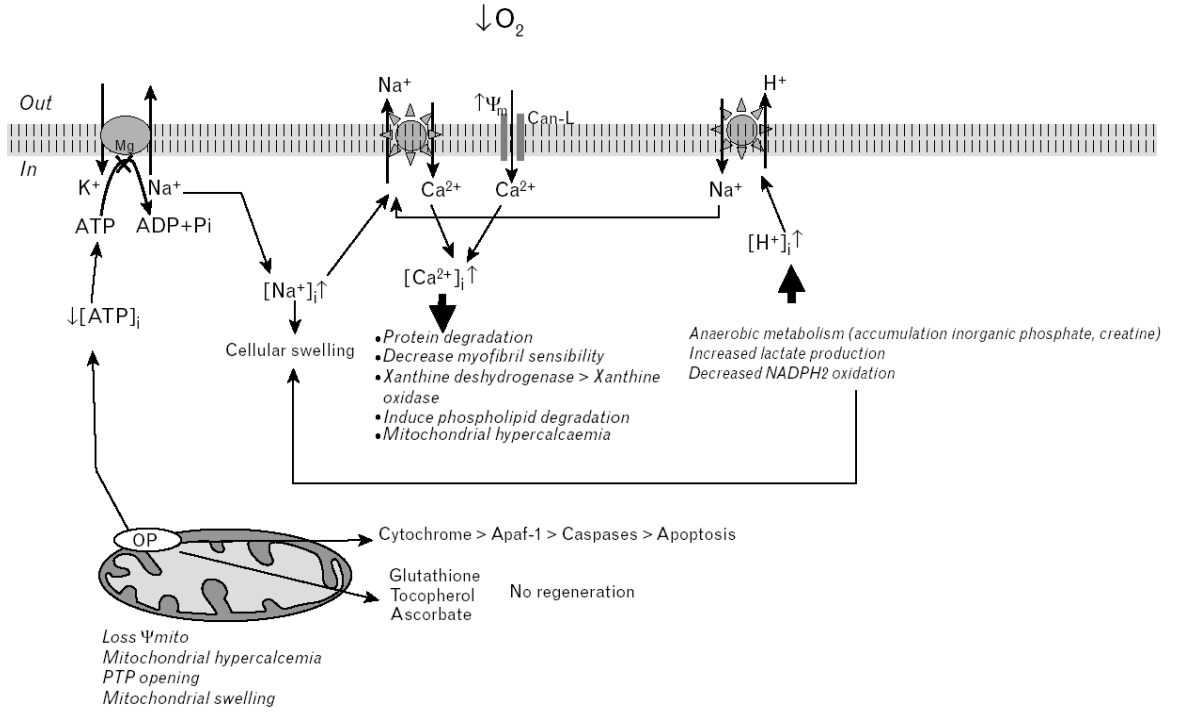
İ/R'ye maruz kalan postkapiler venüllerde gözlenen inflamatuvar yanıtları açıklayan endotele bağımlı mekanizmalar Şekil 2.1'de özetlenmiştir. eNOS aracılığı ile NO, ksantin oksidaz tarafından da süperoksit ve hidrojen peroksit oluşumunun artması İ/R ile sonuçlanmaktadır. Oluşumu artmış olan bu oksidan moleküller bir yandan NF- κ B gibi özgül nükleer faktörlerin transkripsiyonuna neden olurlarken, diğer yandan kompleman sisteminin bileşenlerinden C5'in etkinleşmesine ve fosfolipaz A₂ enzimi aracılığı ile lökotrien B₄ (LTB₄) ve trombosit etkinleştirici faktör (TEF) oluşumunda artmaya neden olmakta ve endotel hücrelerinde P-selektin ekspresyonundaki artışa aracılık etmektedirler. LTB₄, TEF ve C5a ise lökositlerin membranında bulunan reseptörleri aracılığı ile β_2 -integrinlerin (CD11/CD18) salıverilmesine ve böylece endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan E-selektin ve intraselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi adezyon molekülleri aracılığı ile lökositlerin adezyonuna neden olurlar. İ/R'ye yanıt olarak gelişen inflamatuvar yanıtlar mast hücreleri ve makrofajlardan salıverilen histamin, TNF- α , hidrojen peroksit, süperoksit radikali ve NO gibi moleküller ile daha da artırılmaktadır (1, 4, 6, 13).



Şekil 2.1. İ/R'ye maruz kalan postkapiler venüllerde gözlenen inflamatuvar yanıtları açıklayan endotele bağımlı mekanizmalar. CD, cluster of differentiation; eNOS, endotelial nitrik oksit sentaz; H_2O_2 , hidrojen peroksit; ICAM, intraselüler adezyon molekülü; İ/R (I/R), iskemi/reperfüzyon; LT, lökotrien; $NF-\kappa B$, nükleer faktör- κB ; NO, nitrik oksit; O_2^- , süperoksit; PAF, trombosit etkinleştirici faktör; TNF, tümör nekroze edici faktör; VCAM, vasküler hücre adezyon molekülü.

İ/R hasarında hipoksinin ilk etkisi hücrenin aerobik solunum, yani mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon üzerinedir (Şekil 2.2). Oksijen basıncının azalması sonucunda hücre içi adenosin trifosfat (ATP) oluşumu belirgin olarak azalmaktadır. ATP oluşumunun azalması ise hücre içindeki birçok sistemi etkilemektedir. İ/R hasarında hücre içindeki serbest kalsiyum düzeylerinin artmasına karşın, hücre membranındaki Na^+/K^+ -ATPaz pompasının etkinliğinin azalmasına bağlı olarak hücre içinde sodyum birikmekte, potasyum ise hücre dışına çıkmaktadır. Hücre içinde sodyum düzeylerinin artması ise, suyun izoozmotik artışı ile birlikte olup, hücrenin şişmesine neden olmaktadır. Hücresel şişme inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleozitleri gibi metabolitlerin birikmesi ile artan ozmotik yük ile daha da artmaktadır. Hücresel ATP düzeyindeki azalma ile birlikte, siklik adenosin 5'-monofosfat (siklik AMP) oluşumundaki artma da fosfofruktokinaz enzimini uyarak

glikojenden ATP üretimi ile hücrenin enerjisini sağlamak amacı ile gelişen anaerobik glikoliz hızında artmaya ve glikojenin hızla tükenmesine neden olmaktadır. Artan glikoliz ise fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfatların birikimine neden olarak hücre içi pH değerinin düşmesine yol açmaktadır. Bütün bu olayları ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinde azalma izlemektedir. Bu aşamadan sonra iskeminin sürmesi durumunda dönüşümsüz hasar gelişmektedir. Morfolojik olarak geri dönüşümsüz hasara mitokondrilerin vakuolizasyonu ve mitokondri matriksinde şekilsiz, kalsiyumdan zengin yoğunlukların birikimi eşlik etmektedir. İskemi sırasında ATP sentezi durmakta, ancak tüketimi sürmektedir. ATP önce AMP'ye, sonra da adenoze kadar parçalanmaktadır. Adenozin hızla hücre dışı ortama çıkarak burada inozin üzerinden hipoksantine çevrilmektedir. Normoksik durumlarda hipoksantin ksantin dehidrojenaz enzimi aracılığı ile ürik aside metabolize olmaktadır. Öte yandan, hipoksik durumlarda hipoksantin ürik aside metabolize olmadan iskemik dokuda birikmekte, ksantin dehidrojenaz enzimi ise ksantin oksidaza çevrilmektedir. Reperfüzyon ile moleküler oksijenin dokuya gelmesi ile hipoksantin, ksantin oksidaz enzimi ile ürik aside çevrilmesi sırasında serbest oksijen radikali oluşmaktadır. Serbest oksijen radikali SOD enziminin etkisi ile hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürülürken, hidrojen peroksit ise katalaz enziminin etkisi ile su ve oksijene çevrilmektedir. Serbest oksijen radikalleri hem dokuya doğrudan zarar vermekte, hem de polimorfonükleer lökositler (PMNL)'lerin hasarlı dokuda birikmesine neden olmaktadır. Dokuya gelen PMNL'ler miyeloperoksidaz, elastaz, proteaz, kolajenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimler ile moleküller açığa çıkmaktadır. Bu enzimler ise hem dokudaki hasarı artırmakta, hem de daha fazla radikal oluşmasına neden olmaktadır. Serbest oksijen radikalleri proteinler, polisakkaritler, nükleik asitler ve doymamış yağ asitleri gibi tüm biyolojik maddeler ile reaksiyona girebilmektedir. Oksijen radikalının en belirgin özelliği hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinden metilen hidrojen atomunu ayırmasıdır. Bu reaksiyon hücre membranında lipit peroksidasyonunu başlatması sonucunda lipit hidroperoksit radikalleri ve lipit hidroperoksitler gibi lipit türevi radikaller oluşmaktadır. Lipit peroksidasyonunun son ürünleri malondialdehit ve öteki aldehitler ile hidrokarbon gazlar ve konjüge dienlerdir (1-15).



Şekil 2.2. Hipoksi sırasında hücre içinde ATP derişiminin azalması ile ilgili olarak hücre metabolizması, iyonik denge ve yapısal proteinlerde ortaya çıkan değişiklikler. *ADP*, adenzin difosfat; *Apaf-1*, apoptotik proteaz etkinleştirici faktör-1; *ATP*, adenzin trifosfat; *Can-L*, L-türü kalsium kanalı; *NADPH₂*, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat; *Pi*, inorganik fosfat; *PTP*, mitochondrial permeability transition pore; *[i]*, hücre içi iyon derişimi; *ψ_m*, sarkoplazmik membran potansiyeli; *ψ_{mito}*, mitokondriyal membran potansiyeli.

2.2 Rho-Kinaz

2.2.1 Özellikleri

Rho-kinaz yaklaşık 1388 amino asit dizisinden oluşmuştur. Bu dizide, amino (N) ve karboksil (C) uçları bulunmaktadır. Rho-kinaz aynı zamanda Rho-kinaz α /ROK α /ROCK2 veya ROK α /ROCK-II ve Rho-kinaz β /ROK β /ROCK1 veya p160ROCK/ROCK β olarak da adlandırılmaktadır. İnsanda ROCK1 ve ROCK2 genleri sırası ile 18. kromozom (18q11.1) ve 2. kromozomda (2p24) yer almaktadır. Rho-kinaz enziminin hemen hemen her dokuda varlığı gösterilmiştir; ancak, ROCK2'nin beyin ve kalpte, ROCK1'in akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve testiste daha fazla eksprese edildiği de bildirilmiştir. Rho-kinazın N-terminalinde kinaz bölgesi, orta bölgesinde kuramsal olarak kangal gibi kıvrılmış (*coiled-coil*) bölge ve C-terminal bölgesinde plekstrin homoloji bölgesi bulunmaktadır. Etkinleşen Rho, Rho-kinazın kangal gibi kıvrılmış bölgesinin C-terminal parçası ile etkileşerek kinaz bölgesini etkinleştirir. Bu olay sonucunda etkinleşen Rho-kinaz Çizelge 2.1'de belirtilen substratlarını fosforile ederek çeşitli hücre içi olaylara katkıda bulunmaktadır (16-37).

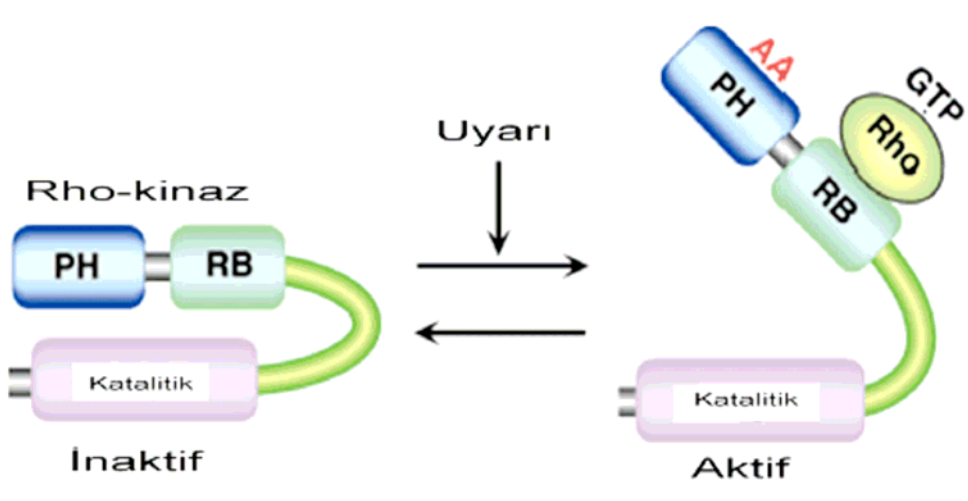
Çizelge 2.1. Rho-kinazın substratları.

Substratlar	İşlevleri	Hüresel Yanıtlar
Miyozin fosfatazın miyozin bağlayıcı alt birimi	Miyozin fosfatazın inhibisyonu	Düz kas kasılmasında kalsiyum duyarlaşması
Miyozin hafif zinciri	Miyozinin F aktine bağlanmasında artma	Stres lifleri oluşumu, fokal adezyon oluşumu, nörit retraksiyonu, hücre kasılması, hücre motilitesi
CPI-17 proteini	Miyozin fosfatazın etkisizleştirici özelliğinin uyarılması	Düz kas kasılmasında kalsiyum duyarlaşması
Kalponin	F aktine bağlanmada azalma	Düz kas kasılmasında kalsiyum duyarlaşması
ERM	ERM'nin etkinleşmesi	Mikrovilüs oluşumu
Aduşin	F aktine bağlanmada artma	Membran ile ilgili olaylar (<i>ruffling</i>), hücre motilitesi
İntermediyer filamentler (vimentin)	Filamentlerin dağılımı	Filamentlerin sitokinez için ayrılması
Na ⁺ /H ⁺ değiştiricisi	Değiştirici etkinliğin uyarılması	Stres lifleri oluşumu
LIM kinaz	Kinaz etkinliğinde artma	Kofilinin fosforilasyonu
CRMP-2	---	Büyüme konisi kolapsı
ZIPK	Miyozin fosfatazın inhibisyonu	Düz kas kasılmasında kalsiyum duyarlaşması

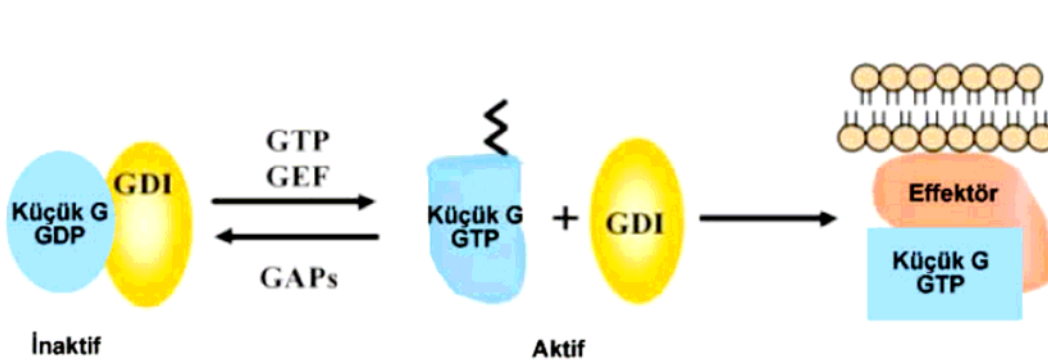
CPI-17, *17-kDa protein kinase C-potentiated inhibitory protein of protein phosphatase-1*; CRMP-2, *collapsin response mediator protein-2*; ERM, *e-zrin-radixin-moesin*; ZIPK, *zipper interacting-kinase*.

2.2.2 Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi

Küçük G proteinleri, öteki G proteinleri gibi, guanozin difosfat (GDP) ve guanozin 5'-trifosfat (GTP) ile özgül etkileşme ve GTP'az etkinliğinden sorumlu olan gerekli amino asit dizilimine, ayrıca efektörleri ile etkileşmek için ayrı bir bölgeye sahiptirler. Sentezlendikten sonra lipitler ile translasyon sonrası değişikliklere gereksinim duyarlar. Bu lipit yapıları genellikle, palmitoil (P), farnesil (F) ve geranilgeranil (GG)'dir. Küçük G proteinlerinin lipit modifikasyonu, bunların membrana ve düzenleyicilere bağlanmaları ve alt efektörlerini uyarabilmeleri için gereklidir. Küçük G proteinlerinin GDP'ye bağlıyken etkin olmayan ve GTP'ye bağlıyken etkin olan olmak üzere birbirine dönüşebilen iki biçimi bulunmaktadır (Şekil 2.3, Şekil 2.4).



Şekil 2.3. Rho-kinaz etkinliğinin düzenlenmesi. PH, plekstrin homoloji bölgesi; RB, Rho bağlayıcı bölge; AA, arakidonik asit; GTP, guanozin 5'-trifosfat; GTP-Rho, Rho'nun etkin biçimi.



Şekil 2.4. Küçük G proteininin etkinleşmesi sırasında gelişen olaylar. GDI, guanozin difosfat ayrıştırma inhibitörü; GEF, guanin nükleotit değişim faktörü; GAP, guanozin 5'-trifosfatazaı etkinleştirici protein, GTP, guanozin 5'-trifosfat.

Rho etkinliği siklik olarak dzenlenmektedir. Rho etkinliğinin GTP'az etkinleştirici protein (GAP) ve GDP ayrışma inhibitörü (GDI) olmak üzere iki negatif ve guanin nükleotit değiştirici faktör (GEF) olmak üzere bir pozitif dzenleyicisi bulunmaktadır. Dinlenme durumundaki hücrelerde Rho-GDP ayrışma inhibitörü (Rho-GDI), GDP-Rho'ya bağlandıktan sonra, onun membrandan ayrılmasına neden olarak sitozole geçmesini sağlamaktadır. Hücreler bazı agonistler ile uyarıldığında Rho'ya özel GEF'ler, GDP'nin ayrılmasını ve GTP'nin bağlanmasını başlatarak Rho'nun etkinliğini artırmaktadırlar. GTP-Rho C-terminali geranilgeranillenmiş kuyruğu ile hücre membranına hedeflendikten sonra özgül hedefleri ile etkileşmektedir. GAP, Rho'nun intrinsik GTPaz etkinliğini hızlandırarak ve onu etkin olmayan GDP-Rho'ya dönüştürerek negatif regülatörler gibi çalışmaktadırlar. GAP, Rho'nun intrinsik GTP'az etkinliğini artırarak GTP'ye bağlı etkin biçiminin etkinliğini önlemektedir. Bu GDP/GTP dönüşüm reaksiyonunun hız kısıtlayıcı basamağı GDP'ye bağlı olan biçiminden GDP'nin ayrılmasıdır. Bu reaksiyon oldukça yavaştır ve GEF tarafından edilmektedir. Rho'nun etkinliği G_{12} ve G_{13} proteinleri ile dzenlenmektedir. G_{12} ve G_{13} küçük moleköl ağırlıklı GTP bağlayıcı Rho proteinini etkinleştirir. G_{12}/G_{13} aynı zamanda, hücre iskeleti olaylarını da dzenleyebilen Na^+/H^+ değiş-tokuş proteinini de uyarmaktadır. Lipit yapısında kalsiyum duyarlaştırıcı moleküller olan sfingosin-1-fosfat (S1P), sfingofosforilkolin (SPC) ve lizofosfatidik asit (LPA) RhoA/ROCK yolunu etkinleştirmektedirler. Bir G proteini olan G_{13} 'ün, Swiss 3T3 kültür fibroblastlarında Rho'yu etkinleştirmek için LPA reseptörleri ile kenetlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, epidermal büyüme faktörü reseptörünün, G_{13} aracılığı ile Rho'nun etkinleşmesi ve stres lifleri oluşumu yolunda yer aldığına ilişkin veriler bulunmaktadır. Botulinum toksini C3, Rho'yu özgül olarak ADP-ribozillediğinden dolayı C3 toksini Rho'nun özgül inhibitörü olarak kabul edilmektedir. Rho, hücre bölünmesindeki bölünme yarığının oluşmasında yer alan miyozin II ve aktin filamentlerinin işlevleri için gereklidir. Bunun yanı sıra, sitokinez boyunca, hücrenin kasılma işlevi için de Rho sinyal yolu kullanılmaktadır. Rho-kinaz, aynı zamanda miyozin fosfatazı inhibe ederek de bölünme yarığının oluşmasına katkıda bulunabilir. Ayrıca, Rho'nun bazı işlevleri formin proteinleri aracılığı ile gerçekteşebilmektedir. Rho-kinaz, radiksin proteinini fosforilleyerek hücre iskeletinin plazma mebranına bağlanmasını dzenleyebilmektedir. Rho ve Cdc42'nin doğrudan formin proteinlerinin bazı bölgeleri ile etkileştiği ve

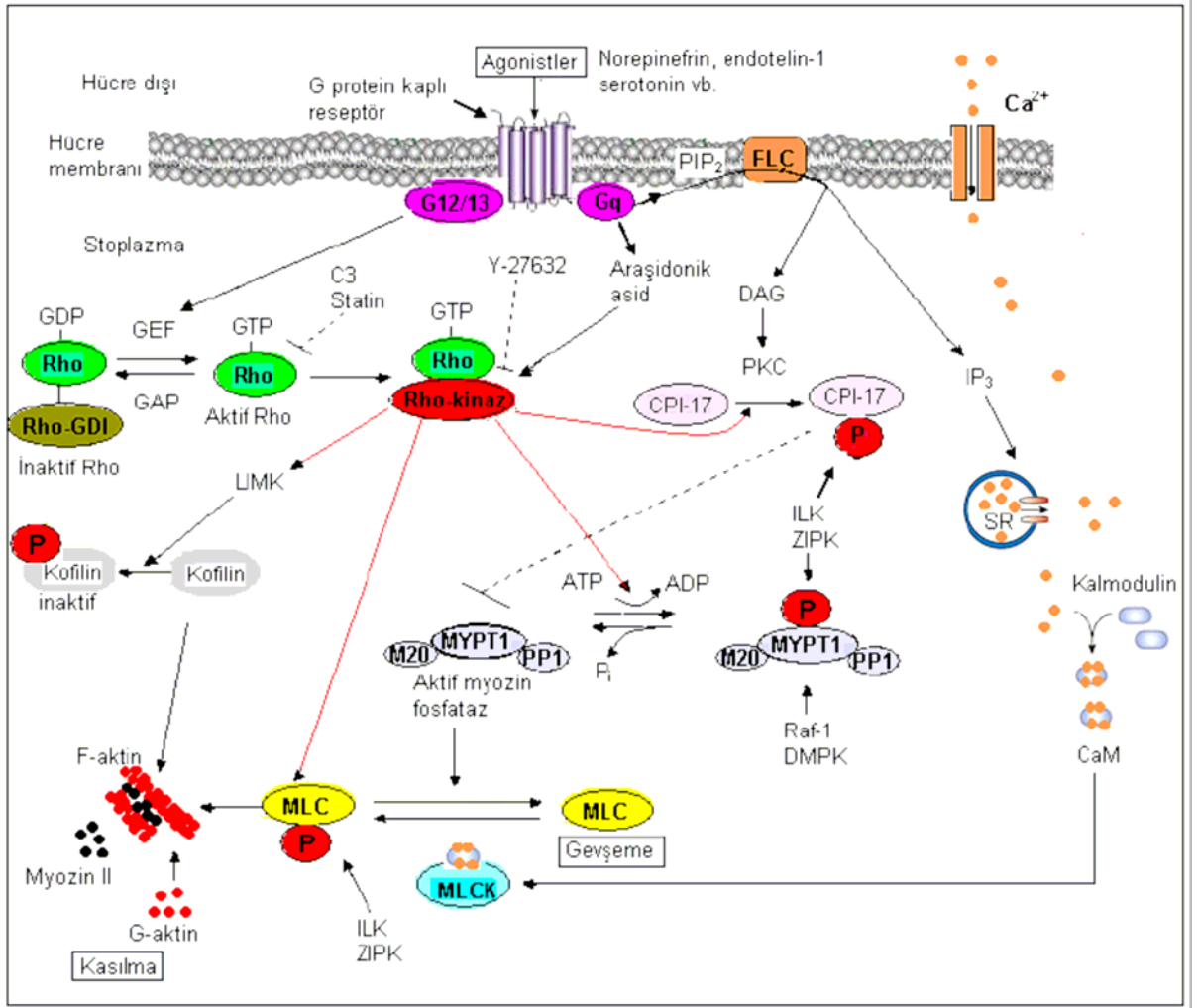
forminlerin yeni aktin polimerizasyonu ile sinyal yolu arasında bağlantı kurduğu da gösterilmiştir. Rho-kinaz enziminin, düz kas hücrelerinde F-aktin, kalmodulin ve tropomiyozin bağlayıcı bir protein olan kalponini fosforile ettiği ve böylece kalponin-F-aktin bağlanmasının engellediği bildirilmiştir. Kalponinin bazik izoformunun, miyozin fosfataz ile defosforile edildiği, bu olayın ise kasılma ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir. Fosforile olmamış kalponin F-aktine bağlanarak miyozin ATP'az etkinliğini önlemektedir; fosforile olduğunda ise bu özelliklerini kaybetmektedir. Ayrıca, Rho-kinaz ile miyozin ve adusun proteinlerinin fosforilasyonunun fibroblastlarda mikrovilüze benzeyen yapıların oluşmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (16-37).

2.2.3 Fizyolojik Olaylardaki Rolü

Küçük G proteinleri moleküler kütleleri 20-40 kilodalton olan monomerik G proteinleridir. Mayalardan insanlara kadar bütün ökaryot hücrelerde bulunan ve 100'den çok üyesi bulunan büyük bir aileyi oluşturmaktadırlar. Rho, Ras, Rab, Sar1/Arf ve Ran gibi küçük G proteinleri hücre içi sinyalleri düzenlemektedirler. Rho ailesinin üyeleri arasında RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoG, Rac1, Rac2 ve Cdc42 bulunmaktadır. RhoA, RhoB ve RhoC proteinlerinin efektör bölgelerinin amino asit dizilişleri aynıdır ve benzer hücresel işlevleri bulunmaktadır. RhoA, vücutta en bol bulunan ve eksprese edilen, ayrıca ve en çok çalışılan Rho proteini alt türüdür. RhoE'nin ise genotoksik stres sırasında ROCK1'i inhibe ettiği ve böylece apoptozu önlediği bildirilmiştir. (16-37).

Rho proteinleri, başlıca hücre iskeleti kontrolünden, stres liflerinin yapılanmasından, fibroblastların fokal adezyonundan ve düz kas kasılmasında kalsiyuma duyarlılığın düzenlenmesinden sorumludurlar. Ayrıca, aktin iskeletinin yapılanmasını sağlayarak hücrenin biçimi, motilitesi, adezyonu, göçü, kasılması ve sitokinez gibi birçok hücresel işlevde önemli rol oynamaktadırlar. Sitoplazmik serbest kalsiyum düzeyindeki artış düz kaslarda kasılmayı tetikleyen temel mekanizmadır. Bunun ile birlikte, düz kaslarda agonist ile indüklenen kontraksiyon, büyük oranda membran potansiyelinden bağımsız mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Serotonin ve

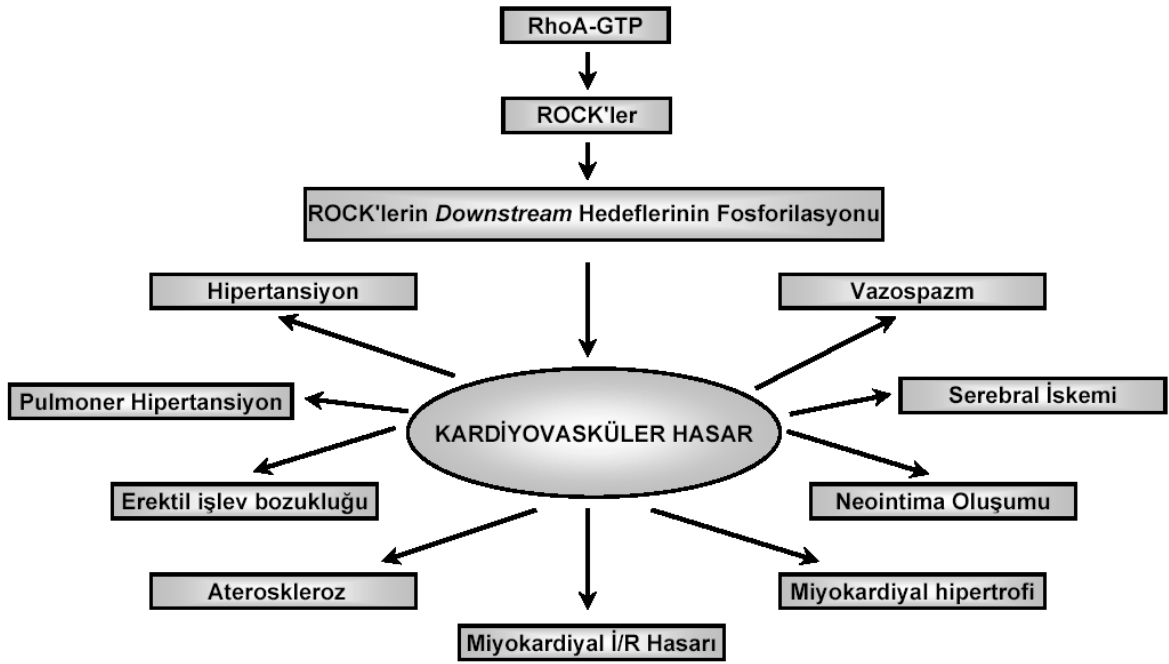
fenilefrin gibi agonistler, fosfotidil inozitol yolunu etkinleştirecek sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesinde artışa neden olmaktadır. Hücre içi kalsiyum düzeyindeki artış kalsiyumun kalmoduline bağlanmasını artırmakta, oluşan kalsiyum/kalmodulin kompleksi ise, miyozin hafif zincir (MHZ)'yi fosforile etmek için, MHZ kinaz (MHZK)'nin etkinleşmesine neden olmaktadır. Düz kaslarda kasılmanın büyüklüğünü belirleyen etkenin, MHZ'nin fosforilasyonunun derecesi olduğu düşünülmektedir. MHZ fosforilasyonu düz kaslarda kasılmaya neden olurken, hücre içi kalsiyum düzeyindeki azalmanın ardından gerçekleşen MHZ defosforilasyonu sonucunda gevşeme ortaya çıkmaktadır. Rho-kinaz yolu, miyozin II'nin MHZ'nin fosforilasyon düzeyini başlıca miyozin fosfatazi inhibe ederek düzenlemekte, ayrıca düz kas kasılmasında agonist ile uyarılan kalsiyum duyarlılığına katkıda bulunmaktadır. Öte yandan, hücre içi kalsiyum derişiminin MHZ'nin fosforilasyonu ve düz kas kasılması ile her zaman paralel olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak, yapılan çalışmalarda GTP bağlayıcı protein olan Rho'nun agonist aracılıklı kalsiyum duyarlılığında yer aldığı gösterilmiştir. Daha da önemlisi, belirli bir kalsiyum derişiminde artmış olan kasılmaların, etkinleşen Rho ile MHZ fosforilasyonu oranındaki artıştan çok, defosforilasyon oranındaki azalmadan kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Rho proteinleri bu etkiyi "*downstream*" efektörleri olan Rho-kinaz aracılığı ile oluşturmaktadırlar. Rho-kinaz için özgül inhibitörler kullanılarak daha sonra yapılan çalışmalarda, Rho-kinaz aracılıklı kalsiyum duyarlılığının hipertansiyon ve koroner arter spazmı gibi hastalıklarda rolü olduğu gösterilmiştir. Düz kas kasılmasının düzenlenmesinde Rho/Rho-kinaz sinyal ileti yolunun rolü Şekil 2.5'te özetlenmiştir (16-37).



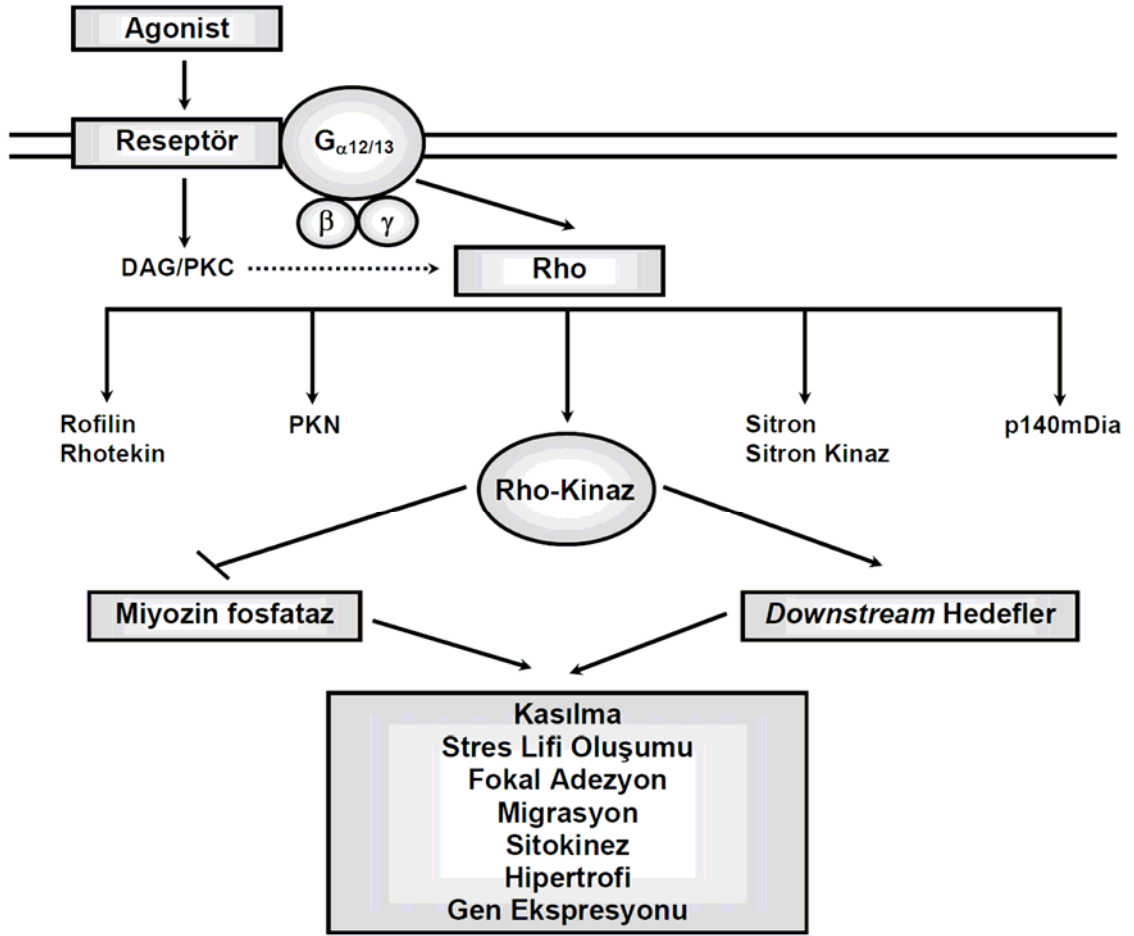
Şekil 2.5. Düz kas kasılmasının düzenlenmesinde Rho/Rho-kinaz sinyal ileti yolunun rolü. Çeşitli agonistler ile uyarılan reseptörler, Gq türü heterotrimerik G proteinleri aracılığı ile hücre içi kalsiyum düzeylerini artırarak MHZ'yi etkinleştirirken, aynı zamanda G12/13 alt birimleri aracılığı ile de GEF'leri etkinleştirirler. GEF'ler etkisiz olan Rho'yu (Rho-GDP) etkinleştirerek (Rho-GTP) onun membrana translokasyonunu sağlar. Etkin Rho da alt efektörlerden (downstream) biri olan Rho kinazı etkinleştirir. Rho kinaz MYPT1'yi fosforilleyerek miyozin fosfatazı inhibe eder. Rho kinaz aynı zamanda doğrudan MHZ'yi de fosforiller. Ayrıca Rho kinaz arakidonik asit ile de uyarılır. Bunlara ek olarak Rho kinaz, miyozin fosfatazın fosforilasyona bağımlı inhibitörü olan CPI-17'yi de, PKC gibi, fosforilleyerek etkinleştirir. Böylece, Rho kinaz başlıca miyozin fosfatazı inhibe ederek, ayrıca MHZ'yi doğrudan fosforilleyerek hücre içi kalsiyum düzeyinden bağımsız bir biçimde düz kasın kasılma derecesini artırır. CaM, kalsiyum-kalmodulin kompleksi; CPI-17, 17-kDa protein kinase C-potentiated inhibitory protein of protein phosphatase-1; DAG, diaçil gliserol; DMPK, miyotonik distrofi protein kinaz; FLC, fosfolipaz C; GEF, guanin nükleotid değişim faktörü; LIMK, LIM kinaz; M20, miyozin fosfatazın 20 kDa katalitik olmayan alt birimi; MHZ, miyozin hafif zincir; MHZK, miyozin hafif zincir kinaz; MYPT1, miyozin fosfatazın miyozin bağlayan alt birimi; P, fosforilasyon; PIP₂, fosfoinozitol (4,5) bifosfat; PKC, protein kinaz C; PPI, miyozin fosfatazın katalitik alt birimi; SR, sarkoplazmik retikulum; Y-27632, seçici Rho-kinaz inhibitörü; ZIPK, zipper interacting protein kinase;. Kesiksiz çizgiler uyarıcı, kesikli çizgiler inhibe edici etkileri göstermektedir.

2.2.4 Patolojik Olaylardaki Rolü

Fasudil ve Y-27632 gibi seçici Rho-kinaz inhibitörleri ile yapılan klinik öncesi ve klinik çalışmalarda Rho-kinazın kardiyovasküler, santral, jenitoüriner ve solunum sistemleri ile ilgili olarak ortaya çıkan çeşitli hastalıkların patojenezinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bunlar arasında damar düz kası hücrelerinin aşırı kasılması ile belirgin durumlardan serebral vazospazm, koroner vazospazm, hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon ve ani ölüm, arteriyosklerotik hastalıklardan anjina, miyokart infarktüsü, restenoz, inme (*stroke*), hipertansif vasküler hastalık, kalp yetersizliği, kardiyak allograft vaskülopatisi ve ven yama (*graft*) hastalığı ile ayrıca bronkiyal spazm, glokom, osteoporoz, erektil işlev bozukluğu ve bazı kanser türleri bulunmaktadır. ROCK'lerin çeşitli kardiyovasküler hastalıklardaki rolü Şekil 2.6'da, kardiyovasküler hastalıkların patojenezi ile ilişkili mekanizmalardaki rolü ise Şekil 2.7'de özetlenmiştir (16-37).



Şekil 2.6. ROCK'lerin çeşitli kardiyovasküler hastalıklardaki rolü. *ROCK'lerin downstream efektörleri arasında miyozin hafif zincir kinaz, miyozin hafif zincir, ezrin-radiksin-moesin proteinleri, LIM kinazlar ve adusin gibi moleküller bulunmaktadır. GTP, guanozin 5'-trifosfat; İ/R, iskemi/reperfüzyon; ROCK, Rho ile ilişkili kinaz.*



Şekil 2.7. Rho-kinazın çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patojenezindeki rolü. *Anjiyotensin II, serotonin, trombin, endotelin-1, noradrenalin, trombosit kökenli büyüme faktörü ve ürotensin II* gibi agonistler Rho-kinazın etkinleşmesine neden olmaktadır. Rho-kinazın downstream efektörleri arasında miyozin hafif zincir kinaz, miyozin hafif zincir, ezrin-radiksin-moesin proteinleri, LIM kinazlar ve adusin gibi moleküller bulunmaktadır. DAG, diaçilgliserol; GTP, guanozin 5'-trifosfat; PKC, protein kinaz C; PKN, protein kinaz N.

2.2.5 İnhibitörleri

Rho-kinazın etkinleşmesini önleyen çok sayıda bileşik geliştirilmiştir. ROCK1 ve ROCK2'yi seçici olmayan biçimde inhibe eden bileşikler arasında fasudil, Y-27632, Y-39983, Wf-536, SLx-2119, azabenzimidazol, aminofurazanlar, DE-104, olefinler, izokinolinler, piridilalken türevleri, H-1152P, bir ROK α inhibitörü, XD-4000, HMN-1152, 4-(1-aminoalkil)-N-4-piridil)sikloheksan-karboksamitler, rostatin, BA-210, BA-207, BA-215- BA-285, BA-1037, Ki-23095, VAS-012 ve kinazolin gibi maddeler bulunmaktadır. Bu bileşiklerden fasudil ile serebral vazospazm, ıveğen inme, anjina ve pulmoner hipertansiyon, Y-39983 ile glokom ve BA-210 ile maküler dejenerasyon, omurilik hasarı, glokom ve kanser tedavisine yönelik klinik çalışmalar sürmektedir. Fasudil, Y-39983 ve BA-210 dışındaki bileşikler ise reperfüzyon hasarı, ateroskleroz, hipertansiyon, serebrovasküler hastalık, inme, astım, kanser, glokom, maküler dejenerasyon, inflamasyon, erektil işlev bozuluuğu, insan immün yetersizlik virüsü (HIV) enfeksiyonu, osteoporoz, sa kaybı ve kulak çınlaması gibi durumların tedavisinde kullanılmak üzere geliştirmeye çalışılmaktadır (16-37).

2.3 NOS'ler

2.3.1 Özellikleri

NO, suda çözünebilen ve dayanıklı olmayan renksiz bir gazdır. NO moleküler oksijen, süperoksit anyonları ve hem proteinleri etkileşebildiğinde dolayı biyolojik sistemlerdeki yarılanma ömrü oldukça kısadır; örneğin kan gibi fizyolojik sıvılardaki yarılanma ömrü 10-20 saniye kadardır. NO yaklaşık 140 kDa molekül ağırlığında, sitokrom P450 redüktaz enzimine benzerlik gösteren karmaşık bir enzim olan NOS tarafından sentezlenmektedir. NOS enziminin nöronal NOS (nNOS, NOS I), endotelial NOS (eNOS, NOS III) ve indüklenebilir NOS (iNOS, NOS II) olmak üzere üç değişik izoformu bulunmaktadır. nNOS ve eNOS'un ikisi de yapısal NOS (yNOS)'yi oluşturan yapısal enzimlerdir; iNOS ise çeşitli uyarılar ile indüklenebilmektedir. NOS substrat olarak yarı esansiyel bir amino asit olan L-arjinini kullanır ve ürün olarak NO ile L-sitrülin oluşur. Bu olayda moleküler oksijen ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ise yardımcı faktörlerdir. Flavin adenin dinükleotit (FAD) ve flavin mononükleotit (FMN), NO sentezi için yardımcı faktörlerdendir. NOS enzimlerinin hücre içi dağılımları değişkenlik göstermektedir; yNOS'un hücre membranında bulunmasına karşın, iNOS sitozolde yerleşmiştir (Çizelge 2.2) (55-74).

Çizelge 2.2. Memeli NOS izoformlarının özellikleri.

Özellikleri	nNOS	eNOS	iNOS
Yerleşim	Sinir ve iskelet kası hücreleri	Trombositler ile endotel ve endokart/miyokart hücreleri	Makrofaj, lökosit, kondrosit, hepatosit, astrosit, fibroblast, nötrofil, eozinofil, lenfosit ve keratinositler ile damar düz kası, endotel, endokart/ miyokart, mast, mikroglia, lenfoit/miyeloit dendritik, Langerhans, Kupffer, bronkiyal epitel, mezangiyal, Schwann ve sinir hücreleri
Hücre içi yerleşim	Membrana bağımlı	Membrana bağımlı (etkisiz) veya sitozolik (etkin)	Sitozolik
Molekül ağırlığı	161 kDa ^a	133 kDa ^a	131 kDa ^a
Gen yapısı ve büyüklüğü	29 exon, 28 intron, > 200 kbp ^a	26 exon, 25 intron, 21-22 kbp ^a	26 exon, 25 intron, 37 kbp ^a
Kromozomal yerleşim	12 numaralı kromozom üzerinde 12q24.2-12q24.3 ^a	7 numaralı kromozom üzerinde 7q35-7q36 ^a	7 numaralı kromozom üzerinde 17cen-q11.2 ^a
Predominant durumda amino asit sayısı	1434 ^a	1203 ^a	1153 ^a
İndüklenebilirlik	Yapısal	Yapısal	İndüklenebilir
Yardımcı faktörler	BH ₄ , FAD, FMN, hem, çinko	BH ₄ , FAD, FMN, hem, çinko	BH ₄ , FAD, FMN, hem, çinko
Substratlar	L-Arjinin, NADPH, oksijen	L-Arjinin, NADPH, oksijen	L-Arjinin, NADPH, oksijen
Kalsiyuma bağımlılık	Bağımlı	Bağımlı	Bağımsız gibi görünmekte, ancak bazı hücrelerde < %20 veya %50-70 oranında bağımlı
Kalmoduline bağımlılık	Bağımlı	Bağımlı	Bağımsız gibi görünmekte, ancak bazı hücrelerde %50 oranında bağımlı
Protein varyasyonu	Dokuya özgü μ, α, β ve γ izoformları	---	---
Süperoksit oluşturma kaynakları	Hem <i>domain</i> , redüktaz <i>domain</i>	Genellikle hem <i>domain</i>	Genellikle redüktaz <i>domain</i>
Uyaranları	Eksitator amino asitler (glutamat, NMDA vd.)	Asetilkolin, ATP, ADP, bradikinin, trombin, <i>shear stress</i>	Endotoksin ve sitokinler
Salıverilme	Dakikalar içinde, geçici, pM düzeyde	Dakikalar içinde, geçici, pM düzeyde	Uzun süreli, sürekli, büyük miktarlarda (μM)
Başlıca fizyolojik işlevi	Sinirsel aşırım	Vazodilatasyon	Sitotoksosite
Patofizyolojik olaylardaki rolü	Müsküler distrofi, iskemi-reperfüzyon	Endotelial işlevsizlik, hiperkolesterolemi, hipertansiyon	İnflamatuvar hastalıklar

^a İnsan için. ADP, adenosin monofosfat; ATP, adenosin trifosfat; BH₄, tetrahidrobiyopterin; eNOS, endotelial nitrik oksit sentaz; FAD, flavin adenin dinükleotit; FMN, flavin adenin mononükleotit; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; NADPH, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat; NMDA, N-metil-D-aspartik asit; NOS, nitrik oksit sentaz; nNOS, nöronal nitrik oksit sentaz.

yNOS'un etkinliği hücre içine kalsiyum girişine bağlı olmasına karşın, iNOS'un etkinliğinin artması için dinlenme durumundaki hücrelerde hücre içi kalsiyum düzeyleri yeterlidir. yNOS etkinliği hücre içinde kalsiyum derişimindeki artış ile tetiklendiğinden dolayı etkinliği geçicidir ve düşük miktarlarda (pM düzeyde) NO oluşumuna neden olur. Tersine, iNOS etkinliği birkaç gün boyunca sürer ve daha büyük miktarlarda (nM düzeyde) NO oluşumuna neden olur. Kalsiyuma bağımlı yNOS ile oluşan az miktardaki NO, sinirsel aşırım ve vazodilatasyon gibi çeşitli fizyolojik olaylarda rol alır. Bazal düzeylerde NO oluşumu arterlerde venlere oranla ve küçük damarlarda büyük damarlara oranla daha çoktur. Asetilkolin, bradikinin, histamin, adenin nükleotitler ve serotonin gibi reseptöre bağımlı ve serbest yağ asitleri gibi reseptörden bağımsız agonistler ile eNOS aracılığı ile oluşan NO salıverilmesi uyarılabilir. iNOS ise akciğerde epitel hücreleri, trombositler ve ince bağırsak hücreleri gibi bazı hücre türlerinde eksprese edilmesine karşın normalde etkin değildir. Ancak, bazı hücreler endotoksin, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2 ve IL-6 gibi özgül maddeler tarafından uyarıldıklarında iNOS etkinliği artar (Çizelge 2.4) (55-74).

Kanda NO hızlı bir biçimde nitrit ve nitrata dönüşmektedir. Kandaki NO'nun asıl dayanıklı olan metaboliti nitrattır. Ayrıca, NO amino asit ve proteinlerdeki tiyol grupları ile de etkileşmekte ve nitrozotiyol bileşikleri biçiminde depolanabilmektedir. NO bir serbest radikal olmasından dolayı oldukça reaktiftir ve çeşitli yapılar ile etkileşmektedir. NO'nun serbest oksijen radikalleri ile de etkileşebilme özelliğinden dolayı, serbest radikal yakalayıcısı ve dolayısı ile hücre koruyucusu olduğu düşünülmektedir. Öte yandan, süperoksit anyonu ile NO'nun etkileşmesi sonucunda nükleik asitler, lipitler ve proteinler üzerinde toksik etki gösteren güçlü bir oksidan molekül olan peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit ve onun parçalanma ürünleri ise lipit peroksidasyonu, değişik moleküllerin nitrosilasyonu veya sodyum kanallarının etkisizleşmesine neden olarak hücre hasarına neden olabilir (55-74).

NO'nun doğrudan ve doğrudan olmayan etkileri bulunur. NO'nun doğrudan olan etkileri biyolojik bir molekül veya hedef ile etkileşmesi sonucunda ortaya çıkar; bu etkiler ise NO oluşumunun düşük olduğu fizyolojik koşullarda hızla oluşmaktadır. NO'nun bu etkileri hem demiri içeren veya içermeyen hedefler (guanilil siklaz, CYP,

COX, katalaz, sitokrom oksidaz, NOS, tromboksan sentaz ve hemoglobin) hipervalan metaller, mitokondriyal ve sitoplazmik akonitazlar ve lipit hidroperoksitler ile olan etkileşmeleri içerir. Bu etkileşmeler ise NO'nun vazodilatasyon, trombosit ve lökositlerin yapışmasında azalma, sinir sisteminde sinyal iletimi, steroid ve eikozanoit metabolizmasının düzenlenmesi, ilaç metabolizmasının değişmesi, inflamatuvar yanıtın değiştirilmesi, hidrojen peroksit aracılıklı toksisitenin artırılması, hücre solunumunun fizyolojik kontrolü, NO oluşumunun otoregülasyonu, iNOS veya nNOS aracılıklı endotelial işlev bozukluğu, hemoglobin tarafından oksijen salıverilmesinin alosterik düzenlenmesi, inflamasyon gelişmesinde rolü olan lökotrienlerin oluşumunda azalma, methemoglobin oluşumu, NO katabolizması, oksidatif stres, mitokondriyal solunum ile ferritin sentezinin azalması ve transferrin reseptör sentezinin artması gibi etkilerinin ortaya çıkması ile sonuçlanır (55).

NO'nun doğrudan olmayan etkileri, doğrudan etkilerini oluşturduğu derişimlerden daha yüksek derişimlerde olduğunda ortaya çıkar; NO'nun bu kadar yüksek derişimleri ise ekspresyonu artan iNOS aracılığı ile sürekli NO oluşumu ile sağlanır. NO'nun S-nitrozasyon tepkimeleri aracılığı ile ortaya çıkan doğrudan olmayan etkileri arasında NO'nun süperoksit radikali, reseptörler (glukokortikoid reseptörü gibi), iyon kanalları (riyanodin reseptörleri, kardiyak L türü kalsiyum kanalları ve kalsiyuma bağımlı potasyum kanalları gibi), metabolik proteinler (gliseraldehit-3-fosfataz dehidrojenaz, kreatin kinaz, alkol dehidrojenaz, ornitin dekarboksilaz ve indirgenmiş glutatyon metabolizmasında rol oynayan enzimler gibi), protein kinaz C (PKC) ve protein kinaz G (PKG) gibi sinyal artırıcı sistemler, transkripsiyon faktörleri (NF- κ B, etkinleştirici protein-1 [AP-1], c-jun ve cMyb gibi) ve kanda bulunan proteinler (hemoglobin ve faktör XIII gibi) ile olan etkileşmeleri bulunur. Bu etkileşmeler sonucunda ise NO'nun steroidlerin inflamasyonu önleyici etkilerinin azalması, kalp ve iskelet kasında sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesinin uyarılması, kardiyomiyositlerin elektriksel özelliklerinin değişmesi, vazodilatasyon, glikolizin önlenmesi, ATP'nin anaerobik koşullarda oluşumunun azalması, inotropik ilaçlara karşı miyokardın kasılabilirliğinin azalması, etanol metabolizması, poliamin ve indirgenmiş glutatyon oluşumunun azalması, PKC'ye bağımlı sinyalleme yolunun inhibisyonu, sinaptik modülasyon, kalp hızının düzenlenmesi, inflamasyona neden olan olayların

düzenlenmesi, transkripsiyonel etkinliğin azalması, hemoglobin tarafından oksijen salıverilmesinin alosterik modülasyonu, siklik GMP'ye bağlı biçimde olan trombosit kümelenmesinin inhibisyonu ve pıhtılaşmanın önlenmesi gibi etkileri ortaya çıkar. NO'nun peroksinitritin aracılık ettiği olaylar ile ortaya çıkan doğrudan olmayan etkileri deoksiribonükleik asit (DNA), tiyoller, lipitler ve mitokondriyel enzimlerin oksidasyonu ve çeşitli proteinlerin (mangan SOD, prostasiklin (PGI₂) sentaz, tirozin hidroksilaz, hücre iskeleti proteinleri ve kinaz substratları gibi) tirozin kalıntılarının nitrasyonu ile ilişkilidir. Peroksinitrit aracılığı ile oluşan bu etkiler ise poliADP-riboz polimeraz (PARP)'nin etkinleşmesi, mutajenez, antioksidan savunma sistemlerinin etkinliğinin azalması, transkripsiyon faktörlerinin ve DNA onarımının baskılanması, hücre membranı hasarı, sitokrom c salıverilmesi, demiyelinizasyon, düşük yoğunluklu proteinlerin oksidasyonu, hücre solunumunun baskılanması, PGI₂'nin trombosit kümelenmesini önleyici ve vazodilatör etkisinin engellenmesi, dopamin yetersizliği, hücre yapısının değişmesi ve sinyalleme yollarının baskılanmasına neden olur (55).

2.3.2 Ekspresyon ve Etkinliklerinin Düzenlenmesi

nNOS ekspresyonunu transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası aşamalarda düzenleyen fizyolojik ve patofizyolojik uyarılar arasında ışığa maruziyet, gebelik, hipoksi, hipoksi ile indüklenebilen faktör 1 (HIF1), *heat shock*, *shear stress*, iskemi/reperfüzyona bağlı hasar, hücre stres, iskemi, nörotransmitterler (glutamat), steroid hormonlar (östrojen, testosteron ve glukokortikoidler), bakteriyel ürünler (lipopolisakkarit [LPS]), interferonlar (IFN- γ), interleükinler (IL-12), anjiyotensin II, glukoz, büyüme faktörleri (fibroblast büyüme faktörü [FGF], insüline benzeyen büyüme faktörü 1 [IGF1] ve vasküler endotelial büyüme faktörü [VEGF]), melatonin, siklik GMP analogları ve çeşitli ilaçlar (steroid yapıda olmayan inflamasyona karşı kullanılan ilaçlar, statinler, siklosporin A ve AT₁ reseptör antagonistleri) bulunmaktadır. eNOS etkinliği ise fosforilasyon, dimerizasyon ve protein-protein etkileşmesi (kalmodulin, postsynaptic density-95/discs large/zona occludens-1 [PDZ] bölgesine bağlanan *postsynaptic density 95* [PSD95], *COOH-terminal PDZ ligand of nNOS* [CAPON], *dynein light chain* [PIN] ve fosfofruktokinaz [PFK], *heat shock protein 90* [hsp90],

kaveolin ve plazma membranı kalsiyum/kalmoduline bağımlı Ca^{2+} -ATPaz 4 [PMCA4]) gibi olaylar ile düzenlenmektedir (75-80).

eNOS ekspresyonunu transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası aşamalarda düzenleyen fizyolojik ve patofizyolojik uyarılar arasında *laminar shear stress*, döngüsel suş (*cyclic strain*), hücre büyümesi, hidrojen peroksit, TGF- β 1, lizofosfatidilkolin, okside düşük yoğunluklu lipoprotein, okside linoleik asit, TNF- α , bakteriyel ürünler (LPS), hipoksi, statinler, östrojen, PKC, trombin, Rho GTPaz, VEGF, histon deasetilaz inhibisyonu ve hiperkolesterolemi bulunmaktadır (75). eNOS etkinliği ise asilasyon, kalsiyum kalmodulin bağlanması, fosforilasyon, S-nitrosilasyon gibi olaylar, kaveolin ve endoglin gibi kaveolar proteinler, G proteinleri ile kenetli reseptörler, hsp90, fosfoinozitol-3-kinaz (PI3K), protein kinase B (PKB), eNOS ile etkileşen protein (NOSIP) ve *endothelial nitric oxide synthase traffic inducer* (NOSTRIN) gibi proteinler tarafından düzenlenmektedir (76, 77, 79-82).

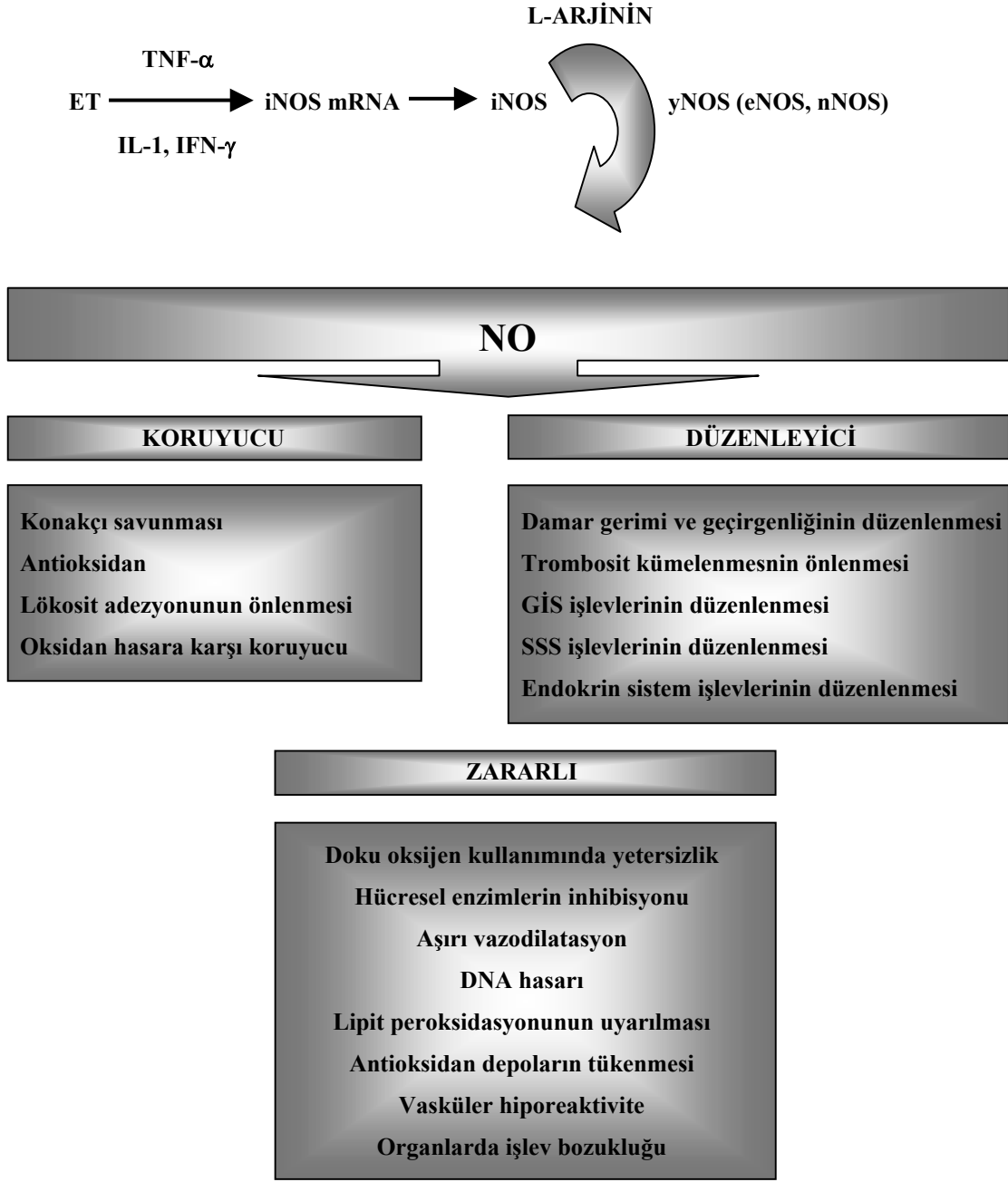
iNOS ekspresyonunu transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası aşamalarda düzenleyen fizyolojik ve patofizyolojik uyarılar arasında bakteriyel ürünler (LPS), transkripsiyon faktörleri (NF- κ B, oktamer faktör, PPAR, interferon düzenleyici faktör 1 [IRF1], *signal transducer and activator of transcription-1 α* [STAT-1 α], *signal transducer and activator of transcription-3* [STAT-3], siklik AMP yanıt elementini bağlayıcı protein [CREB], *CCAAT enhancer binding protein* [C/EBP], HIF-1, AP-1, *Forkhead box 3* [Foxp3] ve tümör baskılayıcı p53 geni), gebelik, ultraviyole (UV)-AB/ışığı, *heat shock*, oksidatif stres, NO vericileri, peroksinitrit, PKC'ler, ileri glikosilasyon son ürünleri (AGEs), hipoksi, TNF- α , interferonlar (IFN- γ ve - β), interlökinler (IL-1 β , -2, -4, -6, -8, -10, -12, -13 ve -17), insülin, glukagon, anjiyotensin II, endotelin, östrojen, projesteron, prostaglandinler (PGI₂, PGD₂ ve PGE₂) glukokortikoidler, etanol, glukoz ve çeşitli ilaçlar (siklosporin A, statinler ve steroid yapıda olmayan inflamasyona karşı kullanılan ilaçlar) bulunmaktadır. iNOS etkinliği ise fosforilasyon ve doğrudan (inhibitör proteinlerden kalirin ve nitrik oksit sentaz ile ilişkili protein 110 (NAP110) ile uyarıcı proteinlerden Rac GTPaz'lar, kaveolin-1 ve ezrin-radiksin-moezin bağlayıcı fosfoprotein 50 ile) ya da dolaylı (NF- κ B ve STAT

proteinleri ile) olarak protein-protein etkileşmesi gibi olaylar ile düzenlenmektedir (62, 76, 77, 79, 80, 83).

2.3.3 Fizyolojik Olaylardaki Rolü

Değişik hücre türleri tarafından sentezlenen NO'nun otokrin ya da parakrin hücrel mediyatör olarak işlevi bulunmaktadır. NO'nun çeşitli fizyolojik olaylardaki rolü Çizelge 2.2 ve Şekil 2.8'de özetlenmiştir (55-74).

NO birçok etkisini siklik GMP oluşumuna neden olan ve çözünebilir hem grubu taşıyan bir enzim olan guanilil siklaz enzimi aracılığı ile oluşturmaktadır. Siklik GMP oluşumundaki artma ise, hücre içi kalsiyum düzeyinin azalmasına neden olan olaylar zincirinin tetiklenmesine neden olmaktadır. Siklik GMP'nin aracılık ettiği olaylar arasında vazodilatasyon, miyokart kasının gevşemesi ve trombosit kümelenmesinin önlenmesi bulunur. NO'nun neden olduğu vazodilatasyonda, PKG çeşitli mekanizmalar aracılığı ile hücre içi kalsiyum derişiminin azalmasına neden olmaktadır. Bu mekanizmalar arasında fosfolipaz C (FLC)'nin inhibisyonu (84, 85), hücre içi kalsiyum depolarından inozitol-1,4,5-trifosfat (IP₃) reseptör aracılıklı kalsiyum çıkışının önlenmesi (86, 87), iyon kanallarından kalsiyumun hücre içine girişinin engellenmesi (88, 89) veya çıkışının artırılması (90, 91), sarkoplazmik retikuluma Ca²⁺-ATPaz aracılığı ile girişinin artırılması (92, 93) ve RhoA'ya bağımlı yolun inhibisyonu üzerinden miyozin hafif zincirin fosfataz etkinliğinin artırılması (94) bulunmaktadır.



Şekil 2.8. NO'nun fizyolojik ve patofizyolojik olaylardaki rolü. *DNA*, deoksiribonükleik asit; *eNOS*, endotelial nitrik oksit sentaz; *ET*, endotoksin; *GİS*, gastrointestinal sistem; *IL*, interlökin; *iNOS*, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; *mRNA*, haberci ribonükleik asit; *nNOS*, nöronal nitrik oksit sentaz; *NO*, nitrik oksit; *SSS*, santral sinir sistemi; *TNF*, tümör nekroze edici faktör; *yNOS*, yapısal nitrik oksit sentaz.

NO'nun siklik GMP aracılığı ile olmayan etkileri de bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak, NO'nun fizyolojik derişimlerde mitokondriyal sitokrom oksidazı inhibe ettiğinin (95, 96), yüksek derişimlerde ise damar düz kasında kalsiyuma bağımlı potasyum kanallarını etkinleştirerek düz kas gevşemesine neden olduğunun (97), Na⁺/K⁺-ATPaz etkinliğini artırarak (98), sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesini engelleyerek (99), 20-hidroksieikozatetraenoik asit (20-HETE) oluşumunu önleyerek (100-102) ve sarkoplazmik retikulumda Ca²⁺-ATPaz'ın etkinliğini artırarak düz kas gevşemesine neden olduğunun (103, 104), NF-κB'nin etkinleşmesini önlediğinin (105, 106), solunum yolları düz kasında miyozin gibi kasılmada yer alan proteinlerin tiyol gruplarını oksitleyerek gevşemeye neden olduğunun (107), DNA hasarına yol açarak PARP'nin etkinleşmesine ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) modifikasyonuna neden olarak hücre ölümüne yol açtığının bildirildiği çalışmalar (108-112) verilebilir.

2.3.4 Patolojik Olaylardaki Rolü

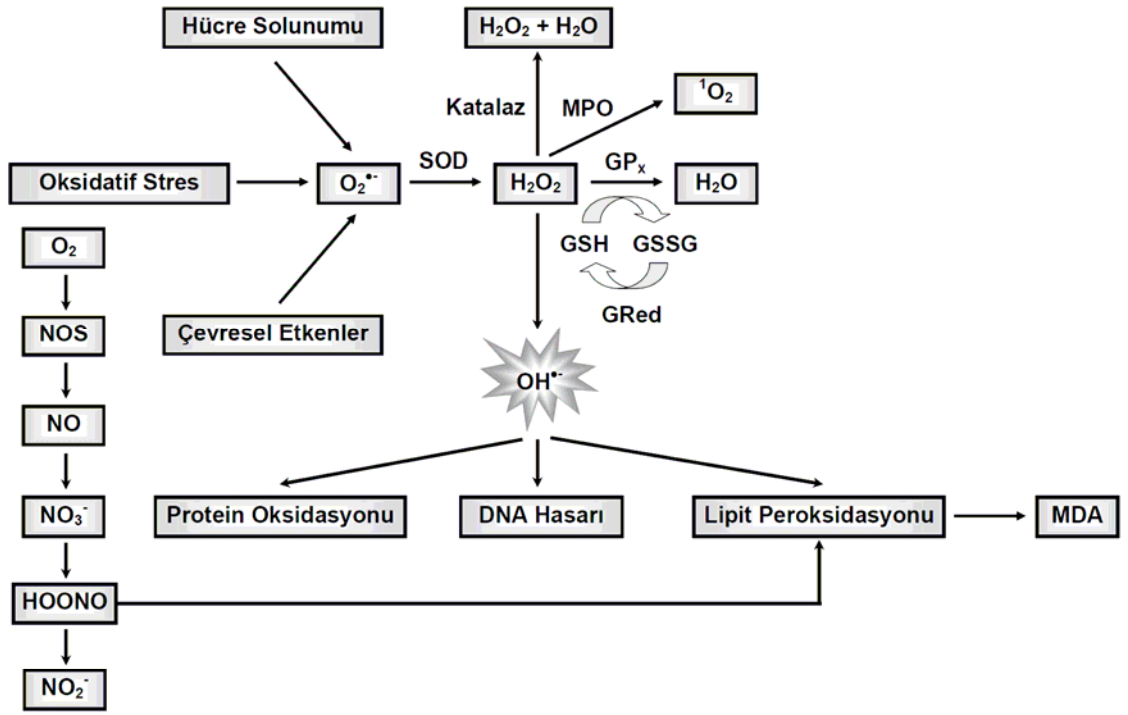
İskemi ve reperfüzyona bağılı hasar, inme, sepsis, nörotoksisite, makrofaj kaynaklı hücre hasarı, vasküler hastalıklar, diyabet, otoimmün hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar, ağrı, kanser, respiratuvar hastalıklar ve pulmoner hipertansiyon gibi çeşitli patolojik olaylarda NO önemli bir rol oynamaktadır. NO'nun çeşitli patofizyolojik olaylardaki rolü Çizelge 2.2 ve Şekil 2.8'de özetlenmiştir (55-74).

2.4 Oksidatif Stres

Oksidatif stres "olası bir hasara neden olabilen prooksidan/antioksidan dengede bozulma" veya "hücre içinde ROT oluşumunda artma ve/veya antioksidan savunma mekanizmalarının işlevinin bozulması" sonucunda ortaya çıkan bir durumdur. Oksidatif stres uyum sağlama, hasar, onarım ve/veya ölüm sırasında ortaya çıkabilmektedir. Astım, süreğen obstrüktif pulmoner hastalık, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, serebral vasküler hastalıklar, ateroskleroz, konjestif kalp yetersizliği, diyabet, dejeneratif retina hastalığı, hipertansiyon, miyokart infarktüsü, pnömoni, hepatit, kanser ve romatoit artrit ve glomerülonefrit gibi inflamatuvar hastalıklar ile septik, kardiyojenik ve sirkülatuvar şok gibi çeşitli şok türleri oksidatif stres ile ilişkili bozukluklar arasında sayılmaktadır (1, 2, 4-14, 113-120).

Oksidatif streste rol oynayan antioksidan savunma sistemleri arasında metal iyonlarını bağlayarak hidroksil radikali oluşumunu azaltan antioksidan proteinler (transferin, serüloplazmin ve albumin gibi), intraselüler antioksidan enzimler (SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz ve MPO gibi) ve ekstraselüler antioksidan maddeler (α - tokoferol, β -karoten, C vitamini ve E vitamini gibi) bulunmaktadır. Moleküler oksijen (O_2) ve NO gibi dayanıklı olan moleküller ile süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit (HOCl), peroksinitrit ($ONOO^-$), "singlet" oksijen (1O_2), NO radikali (NO^{\bullet}) ve nitrojen dioksit radikali (NO_2^{\bullet}) gibi reaktif ROT ve reaktif nitrojen türleri (RNT) oksidatif strese katkıda bulunmaktadır. Süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi ROT'nin oluşumu NADPH oksidaz, ksantin oksidaz veya CYP 4A etkinliğinde artma, mitokondriyal solunum, arakidonik asit metabolizması veya substrat ya da kofaktör eksikliğinden dolayı NOS etkinliğinde bir bozukluk sonucunda ortaya çıkabilir. Normal koşullarda süperoksit oluşumu endojen SOD enzimlerinin kontrolü altındadır: Süperoksit SOD tarafından hidrojen peroksit'e dönüştürülür, hidrojen peroksit de katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile su ve moleküler oksijene dönüştürülerek etkisizleştirilir. Öte yandan, serbest ferröz demir tarafından katalize edilen ve kendiliğinden olan bir reaksiyonda ise, hidrojen peroksit oldukça reaktif olan ve lipitler, proteinler ve nükleik asitler ile etkileşerek onları hasarlayan hidroksil radikaline

dönüştürülür. Hidroksil radikali başlıca hedefi olan çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileştiğinde ise oksidatif membran yıkılması ile sonuçlanan lipit peroksidasyonu başlatılır. Bir serbest radikal olarak NO da öteki serbest radikaller ile reaksiyona girerek prooksidan veya antioksidan etkilerini oluşturur. NO'nun lipit peroksidasyonu üzerindeki etkisi ile ilgili bulguların çelişkili olmasının çeşitli nedenleri bulunmaktadır: Aşırı veya eşit derişimde süperoksit ile NO aynı anda ve yerde bulduklarında güçlü bir oksidan molekül olan peroksinitrit oluşumuna neden olarak lipit peroksidasyonuna neden olurken, aşırı miktarda oluşan NO ise süperoksit ve lipit peroksit radikallerini nötralize ederek, SOD'u etkinleştirerek ve NADPH oksidaz veya sitokrom P450 gibi süperoksit kaynaklarını inhibe ederek oksidatif strese karşı koruma da sağlamaktadır. Öte yandan, damar endotel hücrelerinde oluşumu artan süperoksit radikali ile NO'nun reaksiyona girmesi ile oluşan peroksinitritin prostaglandin H sentaz etkinliğini artırması sonucunda sentezi artan TxA_2 'nin damar düz kasında vazokonstriksiyona neden olduğu gösterilmiştir. Süperoksit radikali aynı zamanda vazodilatör bir prostanoit olan PGI_2 oluşumunun azalmasına neden olan lipit peroksidasyonunu da başlatabilmektedir. Oksidatif stres, hücre solunumu ve çevresel etkenler ile oluşumu artan süperoksit radikalinin aracılık ettiği, protein oksidasyonu, DNA hasarı ve lipit peroksidasyonu ile sonuçlanan olaylar dizisi Şekil 2.9.'da özetlenmiştir (1, 2, 4-14, 113-120).



Şekil 2.9. Oksidatif stres, hücre solunumu ve çevresel etkenler ile oluşumu artan süeroksit radikalının aracılık ettiği, protein oksidasyonu, DNA hasarı ve lipit peroksidasyonu ile sonuçlanan olaylar dizisi. DNA, deoksiribonükleik asit; GP_x , glutatyon peroksidaz; GRed, glutatyon redüktaz; GSH, indirgenmiş glutatyon; GSSG, oksitlenmiş glutatyon; H_2O , su; H_2O_2 , hidrojen peroksid; $HOONO$, peroksinitröz asit; MDA, alondialdehit; MPO, miyeloperoksidaz; NO, nitrik oksit; NO_2^{\bullet} , nitrit; NO_3^- , nitrat; NOS, nitrik oksit sentaz; O_2 , moleküler oksijen; $O_2^{\bullet-}$, süeroksit radikali; 1O_2 , singlet oksijen; SOD, süeroksit dizmutaz.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇ

3.1.1 Deney Hayvanı

Deneylerde 250-300 g ağırlığında erkek ve on iki saat aydınlık on iki saat karanlık periyodunda senkronize edilen otuz iki adet Wistar sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezi'nden sağlanmıştır. Bu tezde sıçanlar üzerinde yapılan tüm işlemler için Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (10/04/2009 tarihli ve 2009/10 sayılı karar).

3.1.2 Sarf Malzemesi

β -Gliserofosfat (G9891, Sigma, Amerika)

Aprotinin (A2132, AppliChem, Almanya)

Benzamidin (B6506, Sigma, Amerika)

Bradford rejanı (B6916, Sigma, Amerika)

Ditiyotreytol (A2948, AppliChem, Almanya)

Düz tabanlı, 96 kuyucuklu kültür plakları (655160, Greiner, Almanya)

Enjektör (1, 2, 5 ve 10 ml)

Eppendorf tüp (1.5 ml) (616201, Greiner, Almanya)

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (A2937, AppliChem, Almanya)

Gluteraldehit

HEPES (A3724, AppliChem, Almanya)

Kauçuk turnike

Ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer, Türkiye)
Ksilazin (Rompun, Bayer, Türkiye)
Kurşun sitrat
Kültür plağı için yapışkanlı kapak (676001, Greiner, Almanya)
Löpeptin (L9783, Sigma, Amerika)
N-1-Naftiletilediamin dihidroklorür (NED) (N9125, Sigma, Amerika)
Orto-fosforik asit (H₃PO₄) (100564, Merck, Almanya)
Pipet ucu (685290, Greiner, Almanya)
Pipet ucu (686290, Greiner, Almanya)
Potasyum klorür (KCl) (1.04936, Merck, Almanya)
Recombinant Rho-kinase-II positive control (CY-E1160-1, CycLex, Japonya)
Rho-kinase assay kit (CY-1160, CycLex, Japonya)
Serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter, Türkiye)
Sığır serum albumini (SSA) (A7906, Sigma, Amerika)
Sodyum florür (A3904, AppliChem, Almanya)
Sodyum nitrit (S2252, Sigma, Amerika)
Sodyum ortovanadat (A2196, AppliChem, Almanya)
Sodyum pirofosfat (A2197, AppliChem, Almanya)
Spektrofotometre kuvars kuveti (Silika-quartz) (S-10, Sigma, Amerika)
Sülfanilamit (SA) (1.11799, Merck, Almanya)
Toluidin mavisi
Tris (A2264, AppliChem, Almanya)
Üranil asetat
Y-27632 (1254, Tocris, Amerika)

3.1.3 Teçhizat

- Cerrahi forseps (World Precision Inst., Commat İletişim Ltd., Türkiye)
- Cerrahi makas (World Precision Inst., Commat İletişim Ltd., Türkiye)
- Cerrahi pens (World Precision Inst., Commat İletişim Ltd., Türkiye)
- Derin donduruculu buzdolabı (Model 1060 T, Arçelik, Türkiye)
- Derin donduruculu buzdolabı (Model 4240 T FH, Arçelik, Türkiye)
- Hassas terazi (AY220, Shimadzu Sci. Inst. Inc., Amerika)
- Hassas terazi (Model APX 200, Denver, Almanya)
- Homojenizatör (Ultra-Turrax, T25 Basic, Ika)
- Işık mikroskobu
- Otomatik pipet (0-200 µl) (Rainin Pipet-Lite, Rainin, Amerika)
- Otomatik pipet (100-1000 µl) (Labart, Almanya)
- Otomatik pipet (2-20 µl) (Eagle, Amerika)
- Otomatik pipet (5-50 µl) (Boeco, Almanya)
- pH metre (Orion 3 Star, Thermo, Amerika)
- Plak okuma cihazı (405, 450, 490, 550 ve 630 nm olmak üzere beş adet filtrelili)
(ELX800, Biotek, Türkiye)
- Santrifüj (18.000 RPM [36.220 x g], 23907 RCF, sıcaklık: -20 - +40 °C) (Model Mikro 22R, Hettich, Almanya)
- Su banyosu (sıcaklık: 0-100° C, hacmi: 5 L) (Model Precistern, JP Selecta, İspanya)
- Transmisyon elektron mikroskobu (Jeol JEM 1011, Jeol Ltd., Japonya)
- Ultramikrotom (Leica UCT-125, Leica Microsystems GmbH, Avusturya)
- Üstten kefeli terazi (Model SPB 52, Scaltec, Almanya)
- Vorteks (RX3, VELP Scientifica, İtalya)

3.2.4 Kimyasal Maddelerin Hazırlanmaları

Y-27632 derişimi 25 µg/ml (ağırlık/hacim, a/h) olacak biçimde enjeksiyondan hemen önce serum fizyolojik içinde çözümlenerek hazırlanmıştır. Dokuların homojenizasyonunda kullanılan HEPES tamponunun bileşimi 20 mM HEPES (pH 7.5), 20 mM β-gliserofosfat, 20 mM sodyum pirofosfat, 10 mM benzamidin, 1 mM ditiyotreytol, 0.2 mM sodyum ortovanadat, 20 mM sodyum florür, 2 mM EDTA, 20 mM löpeptin ve 10 mM aprotinin biçimindedir (Tunctan ve ark., 06). SSA % 0.1 (a/h) derişimde olacak biçimde distile su ile çözümlenerek kullanılmadan hemen önce hazırlanmıştır. SA ve NED %2.5'luk H₃PO₄ içinde çözümlenerek, %2.5 H₃PO₄ distile su ile seyreltilerek ve sodyum nitrit distile su ile çözümlenerek kullanılmadan hemen önce hazırlanmıştır. MPO etkinliği ve MDA düzeyleri ile ilgili ölçümler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Elemanları, SOD ve katalaz etkinliği ile GSH düzeyleri ile ilgili ölçümler Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Elemanları tarafından yapılmıştır. Histopatolojik incelemeler ise Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Elemanları tarafından yapılmıştır.

3.2 YÖNTEM

3.2.1 İ/R Çalışmaları

Sıçanlarda arka bacak İ/R modeli daha önce tanımlanan yöntemlere dayanarak oluşturulmuştur (41). Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) dozunda Y-27632 verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. İ/R+Y-27632 grubundaki sıçanlara ise reperfüzyondan bir saat önce Y-27632 uygulanmıştır. İ/R veya İ/R+Y-27632 grubundaki sıçanların her iki arka bacağına *trochanter major* düzeyinde dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda ketamin hidroklorür (90 mg/kg, IM) ve ksilazin (10 mg/kg, IM) uygulanan sıçanlardan kardiyak kan, sağ böbrek ve sağ gastroknemius kası alınmıştır. Alınan kanlardan hazırlanan serum örnekleri nitrit ve MDA düzeyleri ile MPO etkinliğinin ölçülmesine kadar -20 °C'de dondurularak saklanmıştır. Böbrek ve gastroknemius kasının birer parçası histopatolojik incelemelerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır; kalan parçaları ise nitrit, MDA ve GSH düzeyleri ile Rho-kinaz, MPO, SOD ve katalaz ölçümü amacı ile doku homojenatı süpernatantları hazırlanmaya kadar -20 °C'de dondurularak saklanmıştır.

3.2.2 Serum ve Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması

Deneyler sonunda anestezi altındaki sıçanların kalbinden alınan kanlar oda sıcaklığında otuz dakika bekletildikten sonra cam bir baget ile defibrinize edilip, 36.000 x g'de on beş dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir (121). Ayrılan serum örnekleri kullanılmaya kadar -20° C'de dondurularak saklanmıştır. Dondurulmuş dokular çözüldükten sonra üzerine HEPES tamponu eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenatlar 36.000 x g'de on dakika 4 °C'de santrifüj edildikten sonra, süpernatantlar toplanmış, üzerlerine 50 µl tris (50 mM, pH 8.0)+KCl (0.5 M) çözeltisi eklenmiş, ardarda iki kez on beş saniye su banyosu sonikatöründe bekletilmiş ve 36.000 x g'de on

beş dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar toplam protein, nitrit, MDA ve GSH düzeyleri ile Rho-kinaz, MPO, SOD ve katalaz etkinliği ile ilgili ölçümler yapılmaya kadar dondurularak saklanmıştır.

3.2.3 Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Toplam Protein Düzeyinin Ölçülmesi

Doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda toplam protein miktarı Coomassie mavisi yöntemi ile ölçülmüştür (121, 122). Standart olarak kullanılan SSA'nın %1'lik stok çözeltisinden, 0-50 µl SSA içeren dizi dilüsyonları (0-50 µg/ml) hazırlanmış ve toplam hacimleri distile su ile 800 µl'ye ayarlanmıştır. Aynı biçimde, 5 µl süpernatant üzerine 795 µl distile su eklenerek 800 µl hacimde çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler üzerine 200 µl Bradford rejanı eklenmiş, bu çözeltilerden alınan 100 µl örnek (aynı örnekten iki kez olmak üzere) kültür plağına aktarılmış ve örneklerin verdikleri absorbanslar, kültür plağı okuyucuda, 630 nm'de okunmuştur. SSA derişimlerine karşı elde edilen absorbanslardan yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, SSA'nın kalibrasyon doğru denklemleri belirlenmiştir. Bu denklemlerden yararlanılarak, örneklerde okunan absorbans değerlerinden toplam protein miktarları bulunmuştur.

3.2.4 Serum ve/veya Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Nitrit, MDA ve GSH Düzeyleri ile Rho-Kinaz, MPO, SOD ve Katalaz Etkinliklerinin Ölçülmesi

NO oluşumunun bir göstergesi olarak NO'nun dayanıklı metabolitlerinden biri olan serum ve doku nitrit derişimleri, nitrit iyonlarına duyarlı olan Griess reaksiyonu temeline dayanan diazotizasyon yöntemi ile dolaylı olarak ölçülmüştür (121, 123). Serum ve doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlar ölçümden hemen önce 1:5 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır. Standart olarak kullanılacak sodyum nitritin 2 mM derişimde distile suda hazırlanan stok çözeltisinden, distile su ile 1 ml

hacimde seri dilüsyonları (0.25-100 µM) hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden veya serum ya da doku homojenatı süpernatantlarından alınan 50 µl örnek, 50 µl SA (25 µl) ve NED (25 µl) çözeltileri ile düz tabanlı 96 kuyucuklu kültür plağında karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika bekleyen örneklerin verdikleri absorbanslar, kültür plağı okuyucuda 550 nm'de okunmuştur. Sodyum nitrit miktarlarına karşı elde edilen absorbanslardan yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, sodyum nitritin kalibrasyon doğru denklemleri belirlenmiştir. Bu denklemlerden yararlanılarak, örneklerde okunan absorbans değerlerinden nitrit düzeyleri hesaplanmıştır.

Lipit peroksidasyonu ve hücre hasarının bir göstergesi olarak doku MDA düzeyleri, lipit peroksidasyon ürünü olan MDA'nın tiyobarbütirik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe rengin 553 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanan yöntem ile belirlenmiştir (124).

Oksidatif hasarın göstergelerinden olan antioksidan enzimlerden GSH düzeyleri, GSH biçiminde bulunan tüm protein olmayan sülfidril gruplarının, bir disülfid bileşiği olan 5,5'-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit]'i indirgemesi sonucunda oluşan sarı rengin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanan yöntem ile belirlenmiştir (125).

Doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda Rho-kinaz etkinliği Rho-kinase assay kit kullanılarak prospektüsünde yazıldığı biçimde *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yöntemi ile ölçülmüştür.

Nötrofil infiltrasyonu ve inflamasyonun bir göstergesi olarak doku MPO etkinliği, hidrojen peroksidin homojenat tarafından oksitlenerek o-dianozidini indirgemesi ve indirgenmiş o-dianozidinin 410 nm'de ölçülmesi prensibine dayanan yöntem ile belirlenmiştir (126).

Oksidatif yol ile enerji üretimi sırasında oluşan endojen veya egzojen kaynaklı toksik süperoksit radikallerinin suya ile moleküler oksijene dizmutasyonunu hızlandıran oksidatif hasarın göstergelerinden olan antioksidan enzimlerden SOD etkinliği, ksantin

varlığında ksantin oksidazın açığa çıkardığı süperoksit radikallerinin 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorit ile 505 nm'de absorblanan kırmızı renkli formazon boyası oluşturmasının, ortamda bulunan SOD enzimi ile inhibisyonu prensibine dayanan yöntem ile ölçülmüştür (127).

Hidrojen peroksidi su ile moleküler oksijene yıkımını katalizleyen ve oksidatif hasarın göstergelerinden olan antioksidan enzimlerden katalaz etkinliği, hidrojen peroksidin ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak 230 nm'de enzimin yıkım hızı spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanan yöntem ile belirlenmiştir (125).

3.2.5 Histopatolojik İnceleme

Deeneyler sonunda anestezi altındaki sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastroknemius kası dokuları %2.5'lik gluteraldehit çözeltisinde dört-altı saat kadar tespit edildikten sonra, rutin elektron mikroskopi takibine alınmış ve rezin bloklara gömülmüştür. Elde edilen bloklardan ultramikrotom ile önce 1 µm'lik yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyanmasının ardından ışık mikroskobu ile incelenerek ultra ince kesitler almak için doğru yerler belirlenmiştir. Daha sonra alınan 70 nm'lik ince kesitler kurşun sitrat ve uranil asetat ile kontrastlandıktan sonra transmisyon elektron mikroskobu ile resimlenerek incelenmiştir.

3.2.6 Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. Kullanılan sıçan sayısı n ile ifade edilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için Student's t testi veya Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. GraphPad Prism version 3.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, Amerika) paket programı kullanılarak istatistiksel analizler yapılmış ve grafikler çizilmiştir. İstatistiksel olarak 0.05'ten küçük *P* değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Rho-Kinaz Etkinliği

4.1.1 Böbrek Rho-Kinaz Etkinliği

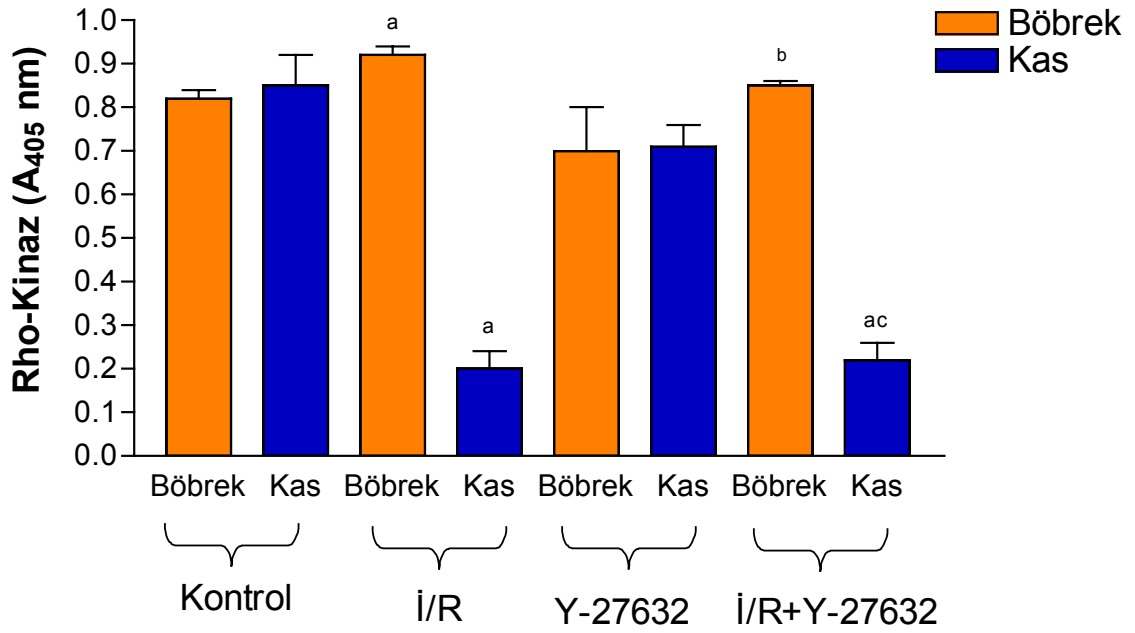
4.1.1.1 İ/R'nin Böbrek Rho-Kinaz Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen Rho-kinaz etkinliğinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür ($P = 0.0014$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknekius kası Rho-kinaz etkinliği üzerindeki etkisi.

	Rho-Kinaz Etkinliği (A_{405} nm)
Böbrek	
Kontrol	0.82±0.02 (n= 7)
İ/R	0.92±0.02 (n= 7) ^a
Y-27632	0.70±0.10 (n= 7)
İ/R+Y27632	0.85±0.01 (n= 7) ^b
Gastroknekius kası	
Kontrol	0.85±0.07 (n= 7)
İ/R	0.20±0.04 (n= 7) ^a
Y-27632	0.71±0.05 (n= 7)
İ/R+Y27632	0.22±0.04 (n= 7) ^{ac}

İ/R, iskemi/reperfüzyon; Y-27632, trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. İ/R veya İ/R+Y-27632 grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezi altındaki sıçanlardan doku örnekleri alınarak Rho-kinaz etkinliği ölçülmüştür. Doku Rho-kinaz etkinliği, her bir örnekteki miyozin fosfatazın miyozin bağlayıcı alt biriminin etkinliğininin 405 nm'de ölçülen absorbans değeri üzerinden değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama=ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. ^a Kontrol, ^b İ/R veya ^c Y-27632 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t testi veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.1. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknemius kası Rho-kinaz etkinliği üzerindeki etkisi. *İ/R*, iskemi-reperfüzyon; Y-27632, *trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit*. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. *İ/R* veya *İ/R+Y-27632* grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezisi altındaki sıçanlardan doku örnekleri alınarak Rho-kinaz etkinliği ölçülmüştür. Doku Rho-kinaz etkinliği, her bir örnekteki miyozin fosfatazın miyozin bağlayıcı alt biriminin etkinliğinin 405 nm'de ölçülen absorbans değeri üzerinden değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 7. ^a Kontrol, ^b *İ/R* veya ^c Y-27632 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t testi veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

4.1.1.2 *İ/R* Sonucunda Artan Böbrek Rho-Kinaz Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların böbreğinde ölçülen Rho-kinaz etkinliği kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen Rho-kinaz etkinliği kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), *İ/R* grubuna göre daha azdır ($P= 0.0041$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

4.1.2 Gastroknemius Kası Rho-Kinaz Etkinliği

4.1.2.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası Rho-Kinaz Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen Rho-kinaz etkinliğinin kontrol grubuna göre daha az olduğu görölmüştür ($P < 0.0001$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

4.1.2.2 İ/R Sonucunda Azalan Gastroknemius Kası Rho-Kinaz Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların gastroknemius kasında ölçülen Rho-kinaz etkinliği kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen Rho-kinaz etkinliği kontrol ve Y-27632 gruplarına göre daha azken (P değerleri sırası ile 0.0001 ve 0.0001), İ/R grubundan farklı değildir ($P > 0.05$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

4.2 Nitrit Düzeyleri

4.2.1 Serum Nitrit Düzeyleri

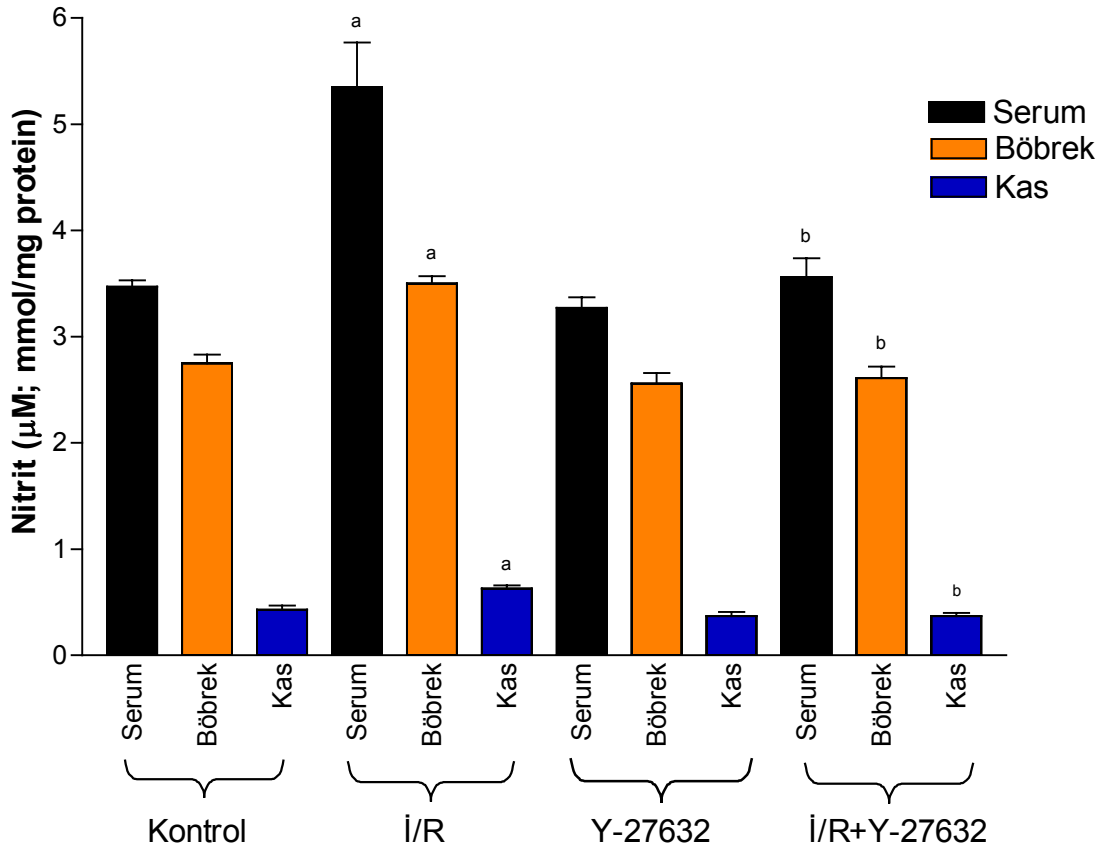
4.2.1.1 İ/R'nin Serum Nitrit Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından serumda ölçülen nitrit düzeylerinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür ($P= 0.0011$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin serum, böbrek ve gastroknemius kası nitrit düzeyleri üzerindeki etkisi.

	Nitrit (μM)
Serum	
Kontrol	3.47±0.06 (n= 8)
İ/R	5.35±0.42 (n= 8) ^a
Y-27632	3.27±0.10 (n= 8)
İ/R+Y27632	3.56±0.18 (n= 8) ^b
Böbrek	
Kontrol	2.75±0.08 (n= 8)
İ/R	3.50±0.07 (n= 8) ^a
Y-27632	2.56±0.10 (n= 8)
İ/R+Y27632	2.61±0.11 (n= 8) ^b
Gastroknemius kası	
Kontrol	0.43±0.04 (n= 8)
İ/R	0.63±0.03 (n= 8) ^a
Y-27632	0.37±0.04 (n= 8)
İ/R+Y27632	0.37±0.03 (n= 8) ^b

İ/R, iskemi/reperfüzyon; Y-27632, trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. İ/R veya İ/R+Y-27632 grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezi altındaki sıçanlardan kan ve doku örnekleri alınarak nitrit düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. ^a Kontrol veya ^b İ/R grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t testi veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.2. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin serum, böbrek ve gastrocnemius kası nitrit düzeyleri üzerindeki etkisi. *İ/R*, iskemi-reperfüzyon; Y-27632, trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. *İ/R* veya *İ/R+Y-27632* grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezi altındaki sıçanlardan kan ve doku örnekleri alınarak nitrit düzeyleri ölçülmüştür. Serum nitrit düzeyleri µM, doku nitrit düzeyleri mmol/mg protein olarak verilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 8. ^a Kontrol veya ^b *İ/R* grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t testi veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

4.2.1.2 *İ/R* Sonucunda Artan Serum Nitrit Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların serumunda ölçülen nitrit düzeyleri kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından serumda ölçülen nitrit düzeyleri kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), *İ/R* grubuna göre daha azdır ($P = 0.0047$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

4.2.2 Böbrek Nitrit Düzeyleri

4.2.2.1 İ/R'nin Böbrek Nitrit Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen nitrit düzeylerinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür ($P < 0.0001$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

4.2.2.2 İ/R Sonucunda Artan Böbrek Nitrit Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların böbreğinde ölçülen nitrit düzeyleri kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen nitrit düzeyleri kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), İ/R grubuna göre daha azdır ($P < 0.0001$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

4.2.3 Gastroknemius Kası Nitrit Düzeyleri

4.2.3.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası Nitrit Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen nitrit düzeylerinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür ($P = 0.0011$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

4.2.3.2 İ/R Sonucunda Artan Gastroknemius Kası Nitrit Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların gastroknemius kasında ölçülen nitrit düzeyleri kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen nitrit düzeyleri kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), İ/R grubuna göre daha azdır ($P < 0.0001$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

4.3 MPO Etkinliği

4.3.1 Serum MPO Etkinliği

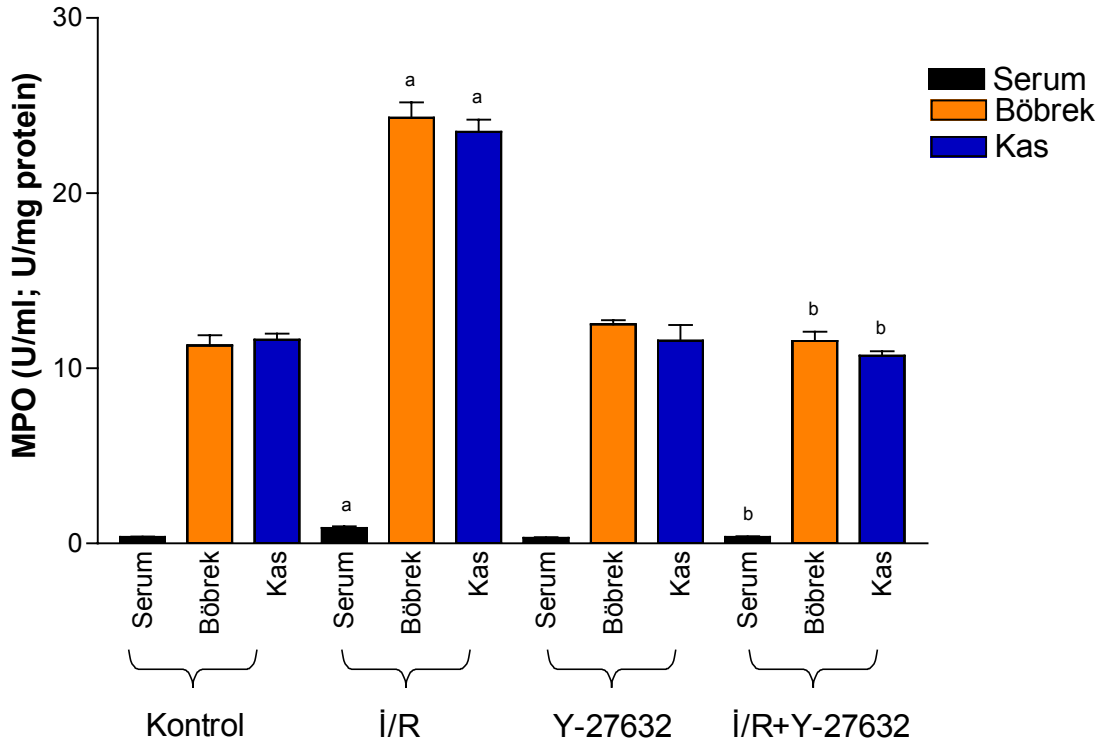
4.3.1.1 İ/R'nin Serum MPO Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından serumda ölçülen MPO etkinliğinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görölmüştür ($P= 0.0002$) (Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

Çizelge 4.3. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin serum, böbrek ve gastroknemius kası MPO etkinliği üzerindeki etkisi.

	MPO Etkinliği (U/ml)
Serum	
Kontrol	0.37±0.03 (n= 8)
İ/R	0.89±0.08 (n= 8) ^a
Y-27632	0.32±0.03 (n= 8)
İ/R+Y27632	0.37±0.05 (n= 8) ^b
Böbrek	
Kontrol	11.31±0.58 (n= 8)
İ/R	24.31±0.87 (n= 8) ^a
Y-27632	12.51±0.25 (n= 8)
İ/R+Y27632	11.56±0.54 (n= 8) ^b
Gastroknemius kası	
Kontrol	11.63±0.36 (n= 8)
İ/R	23.51±0.68 (n= 8) ^a
Y-27632	11.59±0.88 (n= 8)
İ/R+Y27632	10.73±0.24 (n= 8) ^b

İ/R, iskemi-reperfüzyon; MPO, miyeloperoksidaz; Y-27632, trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. İ/R veya İ/R+Y-27632 grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezi altındaki sıçanlardan kan ve doku örnekleri alınarak MPO etkinliği ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. ^a Kontrol veya ^b İ/R grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t testi veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.3. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin serum, böbrek ve gastroknemius kası MPO etkinliği üzerindeki etkisi. *İ/R*, iskemi-reperfüzyon; MPO, miyeloperoksidaz; Y-27632, *trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksan-karboksamit dihidroklorit*. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. *İ/R* veya *İ/R+Y-27632* grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezisi altındaki sıçanlardan kan ve doku örnekleri alınarak MPO etkinliği ölçülmüştür. Serum MPO etkinliği U/ml, doku MPO etkinliği U/mg protein olarak verilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 8. ^a Kontrol veya ^b *İ/R* grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t testi veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

4.3.1.2 *İ/R* Sonucunda Artan Serum MPO Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların serumunda ölçülen MPO etkinliği kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından serumunda ölçülen MPO etkinliği kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), *İ/R* grubuna göre daha azdır ($P < 0.0001$) (Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

4.3.2 Böbrek MPO Etkinliği

4.3.2.1 İ/R'nin Böbrek MPO Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen MPO etkinliğinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görölmüştür ($P < 0.0001$) (Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

4.3.2.2 İ/R Sonucunda Artan Böbrek MPO Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların böbreğinde ölçülen MPO etkinliği kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen MPO etkinliği kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), İ/R grubuna göre daha azdır ($P < 0.0001$) (Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

4.3.3 Gastroknemius Kası MPO Etkinliği

4.3.3.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası MPO Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen MPO etkinliğinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görölmüştür ($P < 0.0001$) (Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

4.3.3.2 İ/R Sonucunda Artan Gastroknemius Kası MPO Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların gastroknemius kasında ölçülen MPO etkinliği kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen MPO etkinliği kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), İ/R grubuna göre daha azdır ($P= 0.0002$) (Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

4.4 MDA Düzeyleri

4.4.1 Serum MDA Düzeyleri

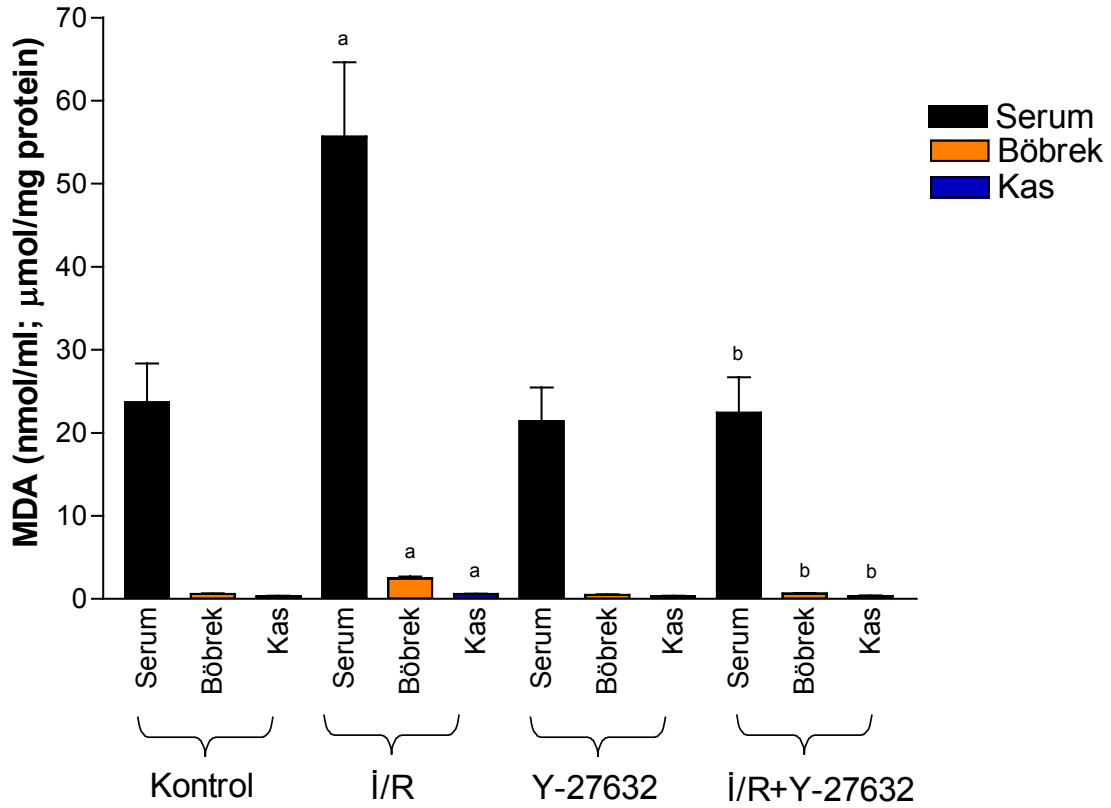
4.4.1.1 İ/R'nin Serum MDA Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından serumda ölçülen MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür ($P = 0.0069$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin serum, böbrek ve gastroknemius kası MDA düzeyleri üzerindeki etkisi.

Serum	MDA Düzeyi (nmol/ml)
Kontrol	23.62±4.72 (n= 8)
İ/R	55.67±8.97 (n= 8) ^a
Y-27632	21.37±4.10 (n= 8)
İ/R+Y27632	22.41±4.29 (n= 8) ^b
Böbrek	
Kontrol	0.59±0.08 (n= 8)
İ/R	2.44±0.26 (n= 8) ^a
Y-27632	0.47±0.08 (n= 8)
İ/R+Y27632	0.61±0.10 (n= 8) ^b
Gastroknemius kası	
Kontrol	0.29±0.08 (n= 8)
İ/R	0.57±0.06 (n= 8) ^a
Y-27632	0.31±0.08 (n= 8)
İ/R+Y27632	0.33±0.08 (n= 8) ^b

İ/R, iskemi-reperfüzyon; MDA, malondialdehit; Y-27632, trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. İ/R veya İ/R+Y-27632 grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezi altındaki sıçanlardan kan ve doku örnekleri alınarak MDA düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. ^a Kontrol veya ^b İ/R grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t testi veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.4. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin serum, böbrek ve gastrocnemius kası MDA düzeyleri üzerindeki etkisi. *İ/R*, iskemi-reperfüzyon; *MDA*, malondialdehit; *Y-27632*, *trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksanokarboksamid dihidroklorit*. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. *Y-27632* grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. *İ/R* veya *İ/R+Y-27632* grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezisi altındaki sıçanlardan kan ve doku örnekleri alınarak MDA düzeyleri ölçülmüştür. Serum MDA düzeyleri µM, doku MDA düzeyleri µmol/mg protein olarak verilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. $n=8$, ^a Kontrol veya ^b *İ/R* grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's *t* testi veya Mann-Whitney *U* testi; $P < 0.05$).

4.4.1.2 İ/R Sonucunda Artan Serum MDA Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların serumunda ölçülen MDA düzeyleri kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından serumda ölçülen MDA düzeyleri kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), *İ/R* grubuna göre daha azdır ($P=0.0047$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

4.4.2 Böbrek MDA Düzeyleri

4.4.2.1 İ/R'nin Böbrek MDA Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür ($P= 0.0002$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

4.4.2.2 İ/R Sonucunda Artan Böbrek MDA Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların böbreğinde ölçülen MDA düzeyleri kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen MDA düzeyleri kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), İ/R grubuna göre daha azdır ($P= 0.0002$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

4.4.3 Gastroknemius Kası MDA Düzeyleri

4.4.3.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası MDA Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür ($P= 0.0098$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

4.4.3.2 İ/R Sonucunda Artan Gastroknemius Kası MDA Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların gastroknemius kasında ölçülen MDA düzeyleri kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen MDA düzeyleri kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), İ/R grubuna göre daha azdır ($P= 0.0269$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

4.5 SOD Etkinliği

4.5.1 Böbrek SOD Etkinliği

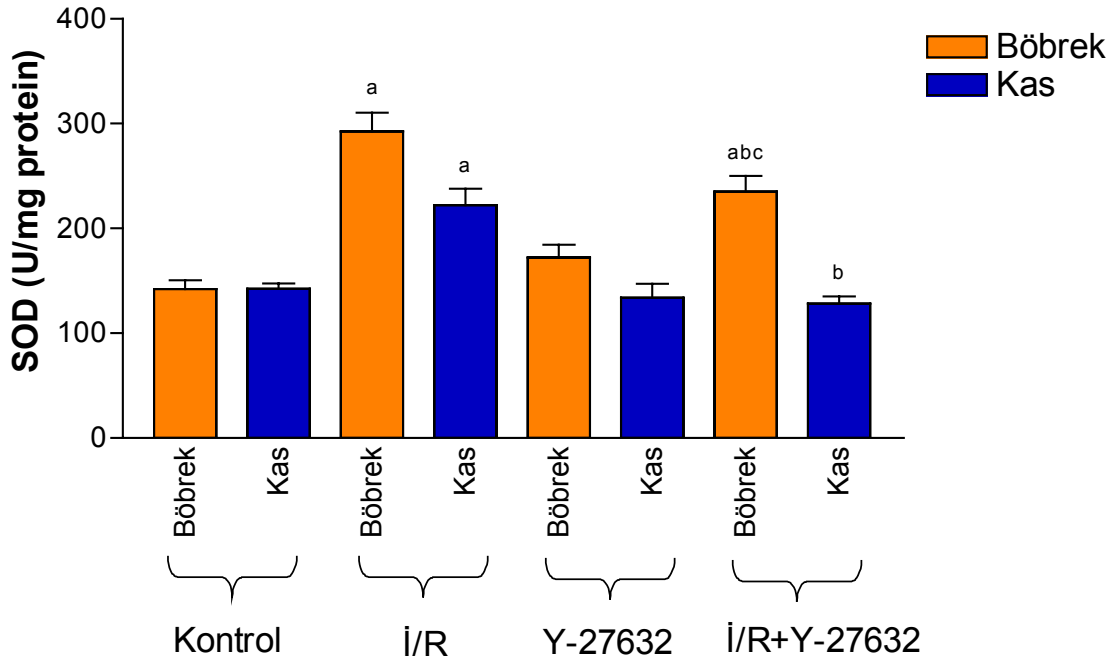
4.5.1.1 İ/R'nin Böbrek SOD Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen SOD etkinliğinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görölmüştür ($P= 0.0003$) (Çizelge 4.5, Şekil 4.5).

Çizelge 4.5. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknemius kası SOD etkinliği üzerindeki etkisi.

	SOD Etkinliği (U/mg protein)
Böbrek	
Kontrol	142.20±8.36 (n= 8)
İ/R	292.60±17.89 (n= 7) ^a
Y-27632	172.30±12.13 (n= 8)
İ/R+Y27632	235.30±14.74 (n= 8) ^{abc}
Gastroknemius kası	
Kontrol	142.60±4.81 (n= 8)
İ/R	222.20±15.52 (n= 7) ^a
Y-27632	133.80±13.34 (n= 8)
İ/R+Y27632	128.20±7.02 (n= 8) ^b

İ/R, iskemi-reperfüzyon; SOD, süperoksit dismutaz; Y-27632, trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. İ/R veya İ/R+Y-27632 grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezi altındaki sıçanlardan doku örnekleri alınarak SOD etkinliği ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. ^a Kontrol, ^b İ/R veya ^c Y-27632 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t testi veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.5. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknemius kası SOD etkinliği üzerindeki etkisi. *İ/R*, iskemireperfüzyon; *SOD*, süperoksit dismutaz; Y-27632, trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksan-2-karboxamit dihidroklorit. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. İ/R veya İ/R+Y-27632 grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezisi altındaki sıçanlardan doku örnekleri alınarak SOD etkinliği ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 7-8. ^a Kontrol, ^b İ/R veya ^c Y-27632 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t testi veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

4.5.1.2 İ/R Sonucunda Artan Böbrek SOD Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların böbreğinde ölçülen SOD etkinliği kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen SOD etkinliği kontrol ve Y-27632 gruplarından daha fazlayken (P değerleri sırası ile < 0.0001 ve 0.0053), İ/R grubuna göre daha azdır ($P = 0.0267$) (Çizelge 4.5, Şekil 4.5).

4.5.2 Gastroknemius Kası SOD Etkinliği

4.5.2.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası SOD Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen SOD etkinliğinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görölmüştür ($P= 0.0012$) (Çizelge 4.5, Şekil 4.5).

4.5.2.2 İ/R Sonucunda Artan Gastroknemius Kası SOD Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların gastroknemius kasında ölçülen SOD etkinliği kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen SOD etkinliği kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), İ/R grubuna göre daha azdır ($P= 0.0006$) (Çizelge 4.5, Şekil 4.5).

4.6 Katalaz Etkinliği

4.6.1 Böbrek Katalaz Etkinliği

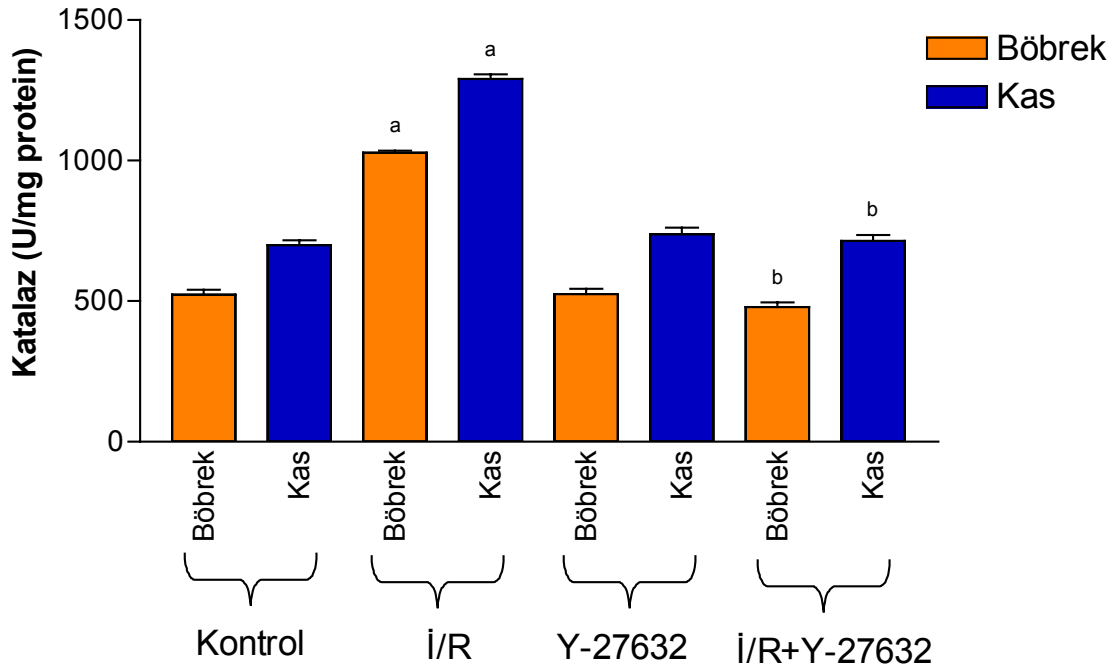
4.6.1.1 İ/R'nin Böbrek Katalaz Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen katalaz etkinliğinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görölmüştür ($P = 0.0003$) (Çizelge 4.6, Şekil 4.6).

Çizelge 4.6. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastroknekius kası katalaz etkinliği üzerindeki etkisi.

	Katalaz Etkinliği (U/mg protein)
Böbrek	
Kontrol	522.90±17.59 (n= 8)
İ/R	1028.00±7.40 (n= 7) ^a
Y-27632	525.40±18.44 (n= 7)
İ/R+Y27632	479.30±16.91 (n= 7) ^b
Gastroknekius kası	
Kontrol	699.70±17.18 (n= 8)
İ/R	1291.00±15.70 (n= 8) ^a
Y-27632	738.50±23.52 (n= 7)
İ/R+Y27632	714.50±20.84 (n= 8) ^b

İ/R, iskemi-reperfüzyon; Y-27632, trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. İ/R veya İ/R+Y-27632 grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezi altındaki sıçanlardan doku örnekleri alınarak katalaz etkinliği ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. ^a Kontrol, ^b İ/R veya ^c Y-27632 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t testi veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.6. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastrocnemius kası katalaz etkinliği üzerindeki etkisi. *İ/R*, *iskemi-reperfüzyon*; Y-27632, trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. *İ/R* veya *İ/R+Y-27632* grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezisi altındaki sıçanlardan doku örnekleri alınarak katalaz etkinliği ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 7-8. ^a Kontrol veya ^b *İ/R* grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student t testi veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

4.6.1.2 *İ/R* Sonucunda Artan Böbrek Katalaz Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların böbrekte ölçülen katalaz etkinliği kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen katalaz etkinliği kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), *İ/R* grubuna göre daha azdır ($P = 0.0006$) (Çizelge 4.6, Şekil 4.6).

4.6.2 Gastroknemius Kası Katalaz Etkinliği

4.6.2.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası Katalaz Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen katalaz etkinliğinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür ($P < 0.0001$) (Çizelge 4.6, Şekil 4.6).

4.6.2.2 İ/R Sonucunda Artan Gastroknemius Kası Katalaz Etkinliği Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların gastroknemius kasında ölçülen katalaz etkinliği kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen katalaz etkinliği kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), İ/R grubuna göre daha azdır ($P < 0.0001$) (Çizelge 4.6, Şekil 4.6).

4.7 GSH Düzeyleri

4.7.1 Böbrek GSH Düzeyleri

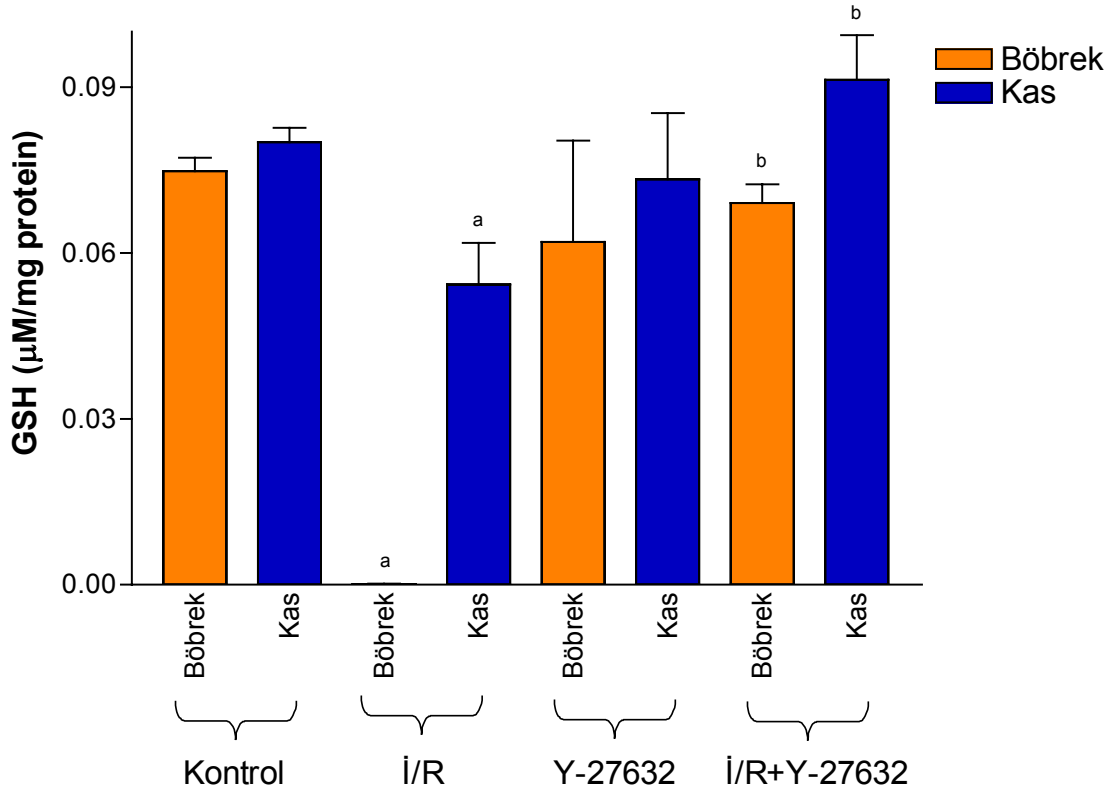
4.7.1.1 İ/R'nin Böbrek GSH Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre daha az olduğu görülmüştür ($P= 0.0003$) (Çizelge 4.7, Şekil 4.7).

Çizelge 4.7. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastrokneumus kası GSH düzeyleri üzerindeki etkisi.

	GSH Düzeyi ($\mu\text{mol/mg protein}$)
Böbrek	
Kontrol	0.0748 \pm 0.0024 (n= 8)
İ/R	0.0001 \pm 0.0001 (n= 7) ^a
Y-27632	0.0620 \pm 0.0183 (n= 5)
İ/R+Y27632	0.0690 \pm 0.0034 (n= 6) ^b
Gastrokneumus kası	
Kontrol	0.0800 \pm 0.0026 (n= 6)
İ/R	0.0543 \pm 0.0075 (n= 7) ^a
Y-27632	0.0733 \pm 0.0120 (n= 6)
İ/R+Y27632	0.0913 \pm 0.0081 (n= 8) ^b

GSH, indirgenmiş glutatyon; İ/R, iskemi-reperfüzyon; Y-27632, trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 $\mu\text{g/kg}$ (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. İ/R veya İ/R+Y-27632 grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezi altındaki sıçanlardan doku örnekleri alınarak GSH düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama \pm ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. ^a Kontrol, ^b İ/R veya ^c Y-27632 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t testi veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.7. Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin böbrek ve gastrocnemius kası GSH düzeyleri üzerindeki etkisi. *GSH*, indirgenmiş glutatyon; *İ/R*, iskemi-reperfüzyon; Y-27632, trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Y-27632 grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. İ/R veya İ/R+Y-27632 grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezisi altındaki sıçanlardan doku örnekleri alınarak GSH düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 5-8. ^a Kontrol veya ^b İ/R grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t testi veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

4.7.1.2 İ/R Sonucunda Azalan Böbrek GSH Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların böbrekte ölçülen GSH düzeyleri kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından böbrekte ölçülen GSH düzeyleri kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), İ/R grubuna göre daha fazladır ($P = 0.0012$) (Çizelge 4.7, Şekil 4.7).

4.7.2 Gastroknemius Kası GSH Düzeyleri

4.7.2.1 İ/R'nin Gastroknemius Kası GSH Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre daha az olduğu görülmüştür ($P= 0.0116$) (Çizelge 4.7, Şekil 4.7).

4.7.2.2 İ/R Sonucunda Azalan Gastroknemius Kası GSH Düzeyleri Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanların gastroknemius kasında ölçülen GSH düzeyleri kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından gastroknemius kasında ölçülen GSH düzeyleri kontrol ve Y-27632 gruplarından farklı değilken ($P > 0.05$), İ/R grubuna göre daha fazladır ($P= 0.0057$) (Çizelge 4.7, Şekil 4.7).

4.8 Histopatolojik İnceleme Sonuçları

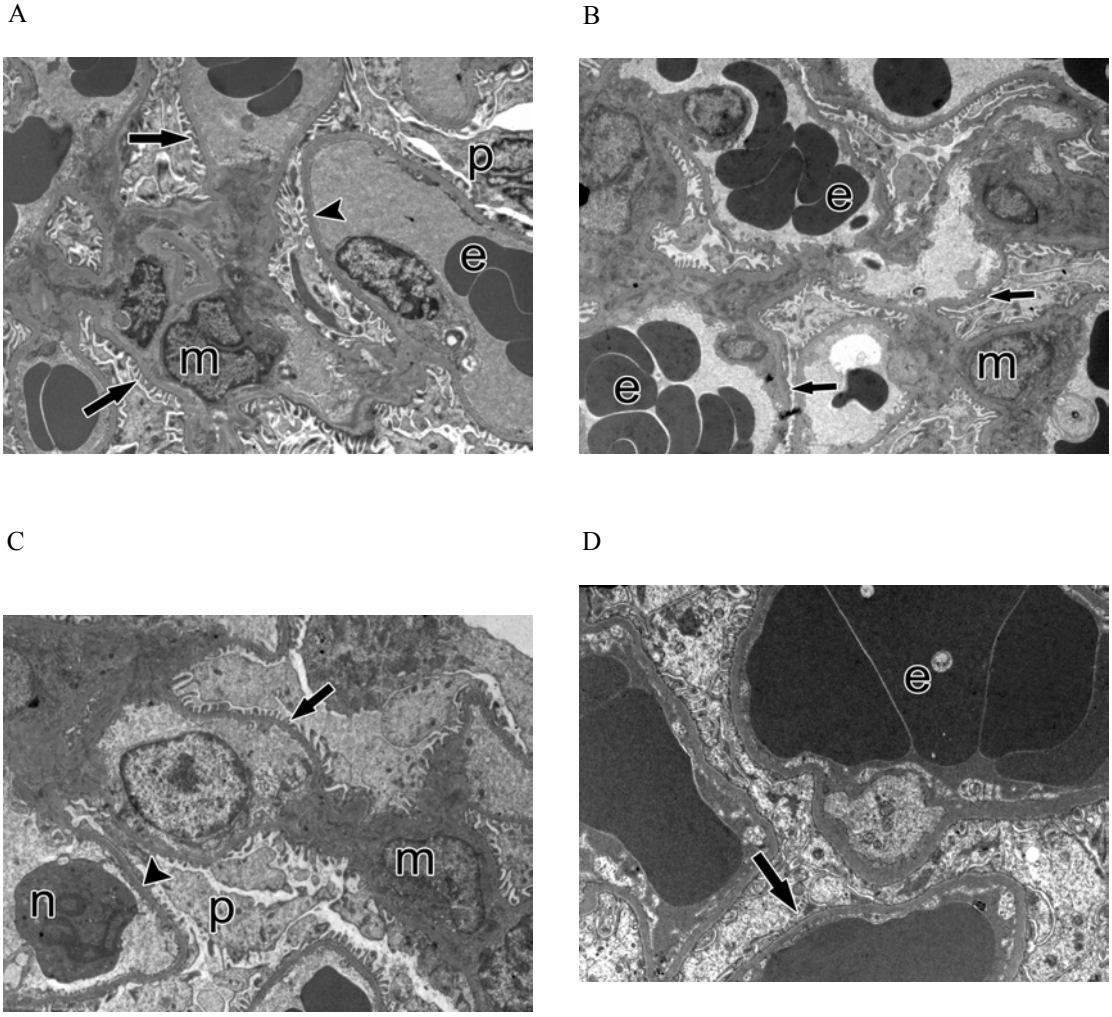
4.8.1 Böbrek

4.8.1.1 İ/R'nin Böbrekte Neden Olduğu Histopatolojik Değişiklikler

Herhangi bir işlem uygulanmayan kontrol grubundaki sıçanlardan izole edilen böbrek glomerüllerinin normal görünümde olduğu gözlenmiştir. Glomerüller kapiler bazal membranlar, kapiler damarların aralarında yer alan podositler, podositlerin bazal membran üzerine oturan pediseller ve mezangiyal yapılarda herhangi bir anormal değişikliğe rastlanmamıştır. Ayrıca, glomerüllerin aralarında yer alan tübüller ve bunları döşeyen hücrelerin histolojileri de normal olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.8A). Öte yandan, sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından izole edilen böbrek tübüllerinde herhangi bir anormalliğe rastlanmazken, glomerüller kapiler damarlarında genişleme ve konjesyon ile birlikte podositlerin pedisellerinde yer yer kaynaşmalar olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8B).

4.8.1.2 İ/R Sonucunda Böbrekte Oluşan Histopatolojik Değişiklikler Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanlardan izole edilen böbrek dokularında ince yapının bozulmadığı ve kontrol grubunda olduğu gibi normal görünüme sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8C). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından izole edilen böbreklerde ise, İ/R grubunda olduğu gibi, konjesyon ve pedisellerde kaynaşma ile belirgin bir kayıp olduğu görülmüştür (Şekil 4.8D).



Şekil 4.8. (A) Kontrol grubu böbrek glomerüllerinde normal görünümlü bazal membran (ok başı), podositler (p), pediseller (ok), mezangiyal hücre (m) ve kapiler damar içerisinde eritrositler (e) (x5000). (B) İ/R grubunda böbrek glomerülünde genişlemiş kapiler damarlar içerisinde konjesyona yol açan eritrositler (e), bazı bölgelerde kaynaşarak silinmiş pediseller (ok) ve bir mezangiyal hücre (x4000). (C) Y-27632 grubuna ait böbrek dokusunda normal görünümlü bazal membran (ok başı), podositler (p), pediseller (ok), mezangiyal hücre (m) ve kapiler damar içerisinde bir adet nötrofil (n) (x5000). (D) İ/R+Y-27632 grubu böbrek glomerüllerinde pedisellerde kaynaşma (ok) ve konjesyonlu kapiler damarlarda eritrositler (e) (x10000). *İ/R*, iskem/reperfüzyon; *Y-27632*, *trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit*. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. *Y-27632* grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. *İ/R* veya *İ/R+Y-27632* grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskem oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezi altındaki sıçanlardan doku örnekleri alınarak histopatolojik inceleme yapılmıştır.

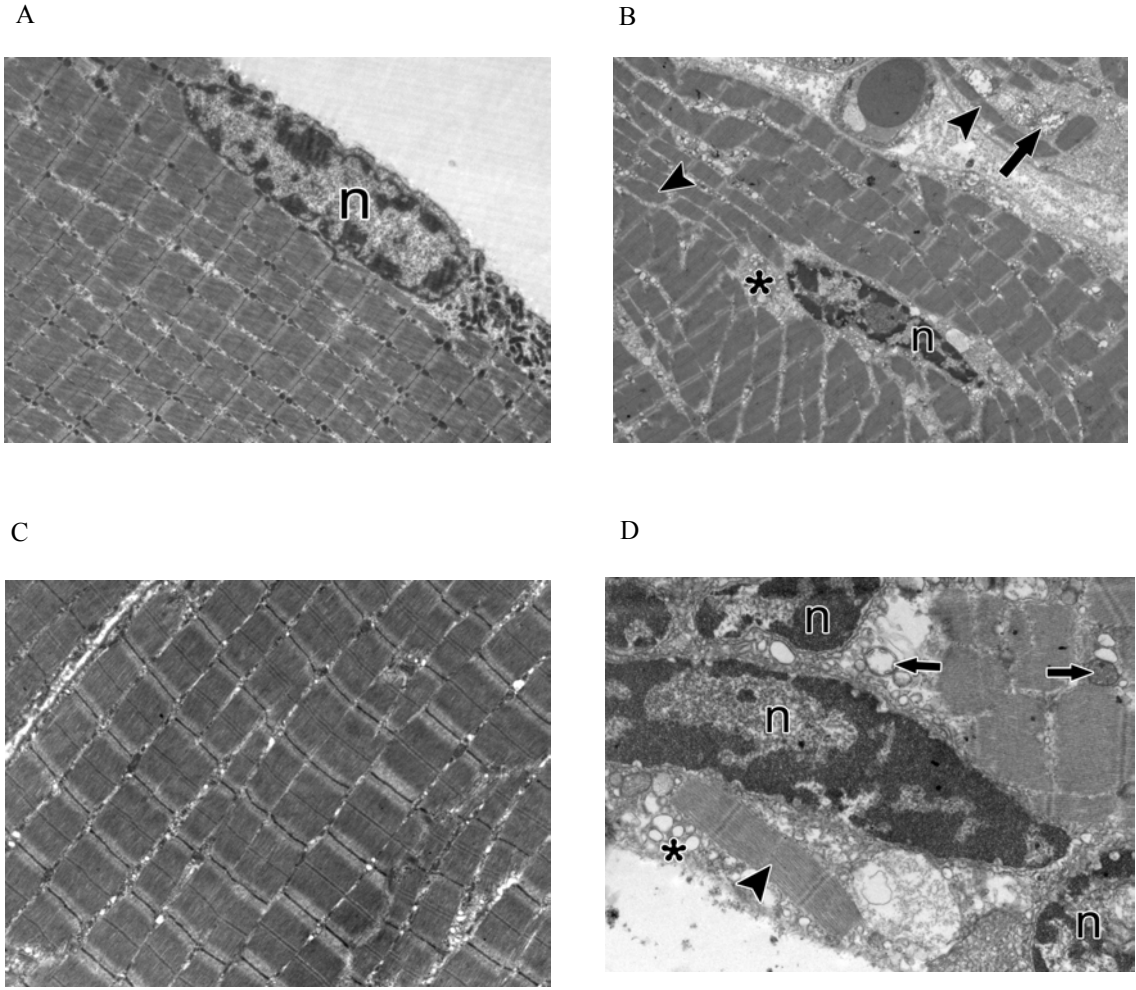
4.8.2 Gastroknemius Kası

4.8.2.1 İ/R'nin Gastroknemius Kasında Neden Olduğu Histopatolojik Değişiklikler

Herhangi bir işlem uygulanmayan kontrol grubundaki sıçanlardan izole edilen gastroknemius kasında miyofibriller ve bunların çizgilenmesi ile kas hücresi içindeki çekirdekler ve öteki yapısal bileşenlerin normal olduğu görülmüştür (Şekil 4.9A). Öte yandan, sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından izole edilen gastroknemius kas hücrelerinde miyofibrillerde parçalanma, sarkoplazmik retikulum sisternalarında belirgin genişleme, mitokondriyonlarda şişme ve deformasyon, hücre çekirdeklerinde internalizasyon ve apoptotik değişiklikler ile belirgin oldukça ağır bulgulara rastlanmıştır (Şekil 4.9B).

4.8.2.2 İ/R Sonucunda Gastroknemius Kasında Oluşan Histopatolojik Değişiklikler Üzerinde Y-27632'nin Etkisi

Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanan sıçanlardan izole edilen gastroknemius kasının normal görünümüne sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9C). Y-27632 uygulanan sıçanlara dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanmasının ardından izole edilen böbreklerde ise, İ/R grubuna göre daha az olmak üzere dejeneratif değişiklikler ile birlikte apoptotik hücelere rastlanmıştır. Apoptoza bağlı olarak hücre çekirdeklerinde fragmantasyon, periferik heterokromatin çöküntüleri, miyofibrillerde parçalanma ve ayrılmalar yanında, geniş ve çok sayıda vakuol oluşumuna neden olan sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişlemeler ile mitokondriyal şişme ve krista yapılarında bozulmalar olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9D).



Şekil 4.9. (A) Kontrol grubuna ait nükleusu olan (n) normal görünümlü iskelet kası hücresi (x6000). (B) İ/R grubuna ait iskelet kası hücrelerinde parçalanmış miyofibriller (ok başı), şişmiş ve krista yapısı bozulmuş mitokondriyonlar (ok), genişlemiş sarkoplazmik retikulum sisternaları (asterisk), apoptotik çekirdekler (n) (x5000). (C) Y-27639 grubuna ait normal görünümlü iskelet kası hücreleri (x10000). (D) İ/R+Y-27632 grubuna ait bir iskelet kası hücresinde miyofibrillerde parçalanma (ok başı), mitokondriyonlarda dejenerasyona bağlı vakuolizasyonlar ve krista kaybı (ok), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (asterisk) ve apoptotik çekirdek fragmanları (n) (x20000). *İ/R*, iskemî/reperfüzyon; *Y-27632*, *trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit*. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. *Y-27632* grubundaki sıçanlara 100 µg/kg (IP) madde verilmesinin dışında başka bir işlem uygulanmamıştır. *İ/R* veya *İ/R+Y-27632* grubundaki sıçanların her iki bacağına dört saat süre ile turnike uygulanarak iskemi oluşturulmasının ardından, turnikeler açılmış ve reperfüzyonun sağlanması için dört saat beklenilmiştir. Bu süre sonunda anestezî altındaki sıçanlardan doku örnekleri alınarak histopatolojik inceleme yapılmıştır.

5. TARTIŞMA

Sistemik yoldan uygulanan seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin sıçanlarda oluşturulan periferik İ/R sonrasında uzak organ olarak seçilen böbrekte ve hedef organ olarak seçilen gastroknemius kasında gelişebilecek hasar üzerindeki etkisinin sıçanlarda araştırıldığı bu çalışmanın bulguları, İ/R'nin neden olduğu histopatolojik değişiklikler yanında, MPO, SOD ve katalaz enzimlerinin etkinliği ile nitrit ve MDA düzeylerindeki artmaya ve GSH düzeylerindeki azalmaya Rho-A/Rho-kinaz yolunun katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bulgularımız, Rho-A/Rho-kinaz yolunun etkinliğindeki artışın önlenmesi durumunda aşırı miktarda NO oluşumu ve antioksidan enzimlerin etkinliğindeki artmaya lipid peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonunun eşlik ettiği İ/R'ye bağlı olarak gelişen inflamasyon ve oksidatif stres sonucunda ortaya çıkan organ hasarının önlenebileceğini düşündürmektedir (Şekil 5.1).

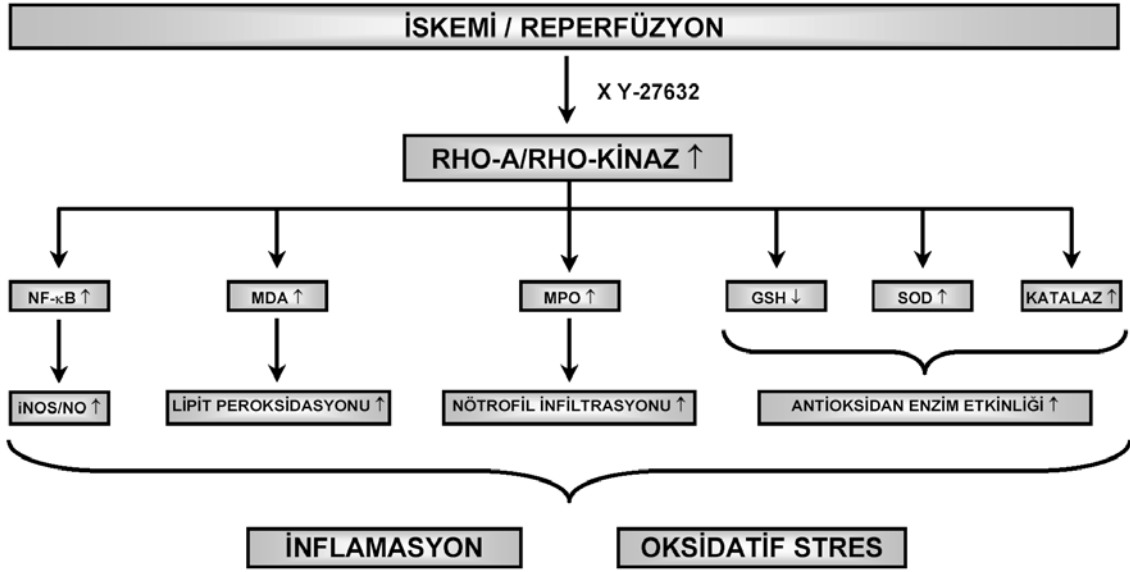
Dokuların iskemiye maruz kalmasının ardından ekspresyonu artan transkripsiyon faktörlerinden özellikle NF-κB, inflamasyona neden olan ve sitoprotektif özellikteki pek çok molekülün oluşumunda artmaya neden olmaktadır. İ/R'nin ardından gelişen inflamasyon ve oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkan organ hasarı birçok etkenin rol oynadığı kompleks bir mekanizmadır. Bu hasardaki en önemli etkenlerden biri serbest oksijen radikallerinin üretimindeki artıştır. Reperfüzyon sırasında üretilen ROT ve RNT inflamasyon, nekroz ve apoptoz gibi birçok hücrel olayın başlamasına neden olmaktadır. Ayrıca, ROT inflamatuvar yanıtlara neden olan TNF-α ve IL-6 gibi sitokinlerin gen ekspresyonunu indüklemektedir. Bu radikaller, inflamatuvar yanıtlara neden olan güçlü kemotaktik etkileri olan birçok mediyatörün oluşumunu ve salıverilmesini artırmaktadır. Bu mediyatörler, ayrıca lökositlerin etkinleşmesine, endotelial adezyon molekülünün ekspresyonuna ve vasküler endotelial hasara neden olmaktadır. İ/R'ye bağlı olarak akciğer, karaciğer, miyokart ve böbreklerde gelişen hasarlanmanın ROT düzeylerindeki artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, üretimi artan ROT, lipid, protein ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek biyolojik

membranların lipit peroksidasyonuna bağlı olarak doğrudan hasarına neden olmaktadır (1, 2, 4-14, 113-120).

Daha önce rodentlerde yapılan çalışmalarda, İ/R'nin kalp, karaciğer ve böbrek gibi organlarda neden olduğu hasarın seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 ile önlenebildiği bildirilmiştir (38, 39, 128-130). Ayrıca, sıçanlarda oluşturulan renal (38) ve hepatik (39) İ/R modellerinde, böbrek ve karaciğer MDA düzeyleri ve MPO etkinliğindeki artış ile birlikte görülen karaciğerde nötrofil infiltrasyonu, konjesyon, vakuolizasyon ve nekroz, böbrekte tübüler nekroz, medulla konjesyonu ve hemoraji gibi histopatolojik değişikliklerin Y-27632 ile önlenebildiği bildirilmiştir. Sıçanlarda oluşturulan çeşitli arka bacak İ/R modellerinde ise, böbrek (40, 41), akciğer (42-44) ve karaciğer (42) gibi organlar ile gastroknemius kası (42, 45, 46), hipokampus (47), serum (42, 47, 48) ve eritrosit membranında (48) nitrit, MDA, TNF- α ve makrofaj inflamatuvar protein-2 düzeyleri ile NOS ve MPO etkinliğindeki artma olduğu kadar, NO ve GSH düzeyleri ile süperoksit dizmutaz (SOD) etkinliğindeki azalmanın birlikte grldğu böbrekte tübüler nekroz, lökosit infiltrasyonu, vakuolizasyon, konjesyon, vasküler permeabilitede artış ve hemoraji, akciğerde lökosit infiltrasyonu, hipokampusta sinir ölümünün eşlik ettiği organ hasarı geliştiği bildirilmiştir. Çeşitli uyarılar ile MDA düzeyleri ve MPO etkinliğindeki artışı Y-27632'nin önleyebildiğini gösteren *in vivo* alışmalar bulunmaktadır (131). *In vitro* (132-135) ve *in vivo* (131) alışmaların sonuçlarına göre, ET ve/veya sitokinler gibi çeşitli uyarılar ile NF- κ B'nin etkinliğinin artması sonucunda iNOS ekspresyonu ve/veya etkinliğindeki artmayı Y-27632 önleyebilmektedir. Öte yandan, Y-27632'nin IL-1 β ile uyarılan sıçan damar düz kası hücrelerinde iNOS ekspresyonu ve etkinliğini daha da artırdığını (136-138), ancak IL-1 β veya ET ile uyarılan hücrelerde iNOS ekspresyonu ve etkinliğinde bir değişikliğe neden olmadığını (139, 140) gösteren *in vitro* alışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmada ise, Rho-kinaz etkinliği İ/R grubundaki sıçanların böbreğinde artmasına karşın, gastroknemius kasında azalmıştır; seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 yalnızca böbrekte İ/R grubundaki Rho-kinaz etkinliğindeki artmayı önlemiştir. Bu alışmada Rho-kinaz etkinliğini ölçmek için kullanılan kit ile literatürde yapılan pek çalışma bulunmaktadır (141-146). İ/R'nin böbrek ve gastroknemius kası Rho-kinaz etkinliği üzerindeki etkilerinin değişken olması kullanılan yöntemden değil de, dokular

arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor gibi görünmektedir. Öte yandan, İ/R grubundaki sıçanların serum, böbrek ve gastroknekius kaslarında NOS etkinliğinin bir göstergesi olan nitrit ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri ile nötrofil infiltrasyonu ve inflamasyonun bir göstergesi olan MPO ile antioksidan enzimlerden SOD ve katalaz etkinliğinin artmasına karşın, glutatyon peroksidaz etkinliğinin bir göstergesi olan GSH düzeyleri azalmıştır. Y-27632 tek başına incelenen parametreler üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken, doku hasarı ile birlikte olan İ/R grubundaki değişiklikleri önlemiştir. Bu bulgular, büyük olasılıkla NF- κ B/iNOS yolu aracılığı ile aşırı miktarda NO oluşumu ve antioksidan enzimlerin etkinliğindeki artmaya lipid peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonunun eşlik ettiği İ/R'ye bağlı olarak gelişen inflamasyon ve oksidatif stres sonucunda ortaya çıkan organ hasarına Rho-A/Rho-kinaz yolunun katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarda NO'nun siklik GMP'ye bağımlı protein kinaz aracılığı ile Rho-kinaz etkinliğini inhibe ettiğini, öte yandan Rho-A/Rho-kinaz yolunun da eNOS ekspresyonunu transkripsiyon öncesi ve sonrası düzeyde olduğu kadar, protein kinaz B aracılığı ile fosforilasyon düzeyinde etkinliğini de azalttığını bildiren pek çok çalışma bulunmaktadır (19, 24, 27, 29, 31-33, 37, 147). Örneğin, daha önce Y-27632 ve fasudil gibi çeşitli Rho-kinaz inhibitörleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, hipoksi, iskemi veya İ/R'nin Rho-A/Rho-kinaz yolunun etkinleşmesine neden olarak fosfatidilinozitol-3-kinaz/Akt yolu aracılığı ile eNOS ekspresyon ve etkinliğini azalttığı gösterilmiştir (129, 148-151). Bu çalışmada, her ne kadar eNOS protein ekspresyonu ve etkinliği ölçülmemiş olsa da, Y-27632 ve İ/R+Y-27632 gruplarında ölçülen serum ve doku nitrit düzeylerinin kontrol grubundan farklı olmaması, Rho-A/Rho-kinaz yolunun eNOS aracılığı ile NO oluşumunu etkilemediğini düşündürmektedir.



Şekil 5.1 Sıçanlarda oluşturulan periferik İ/R modelinde, Rho-A/Rho-kinaz etkinliğinin artmasına bağlı olarak etkinleşen NF-κB/iNOS yolu ile birlikte lipit peroksidasyonu, nötrofil infiltrasyonu ve antioksidan enzim etkinliğinin artması sonucunda ortaya çıkan inflamasyon ve oksidatif stres ile ilgili olarak önerilen mekanizma. İ/R sonucunda Rho-kinaz etkinliği uzak organ olarak seçilen böbrekte artarken, hedef organ olarak seçilen gastroknemius kasında azalmaktadır. Öte yandan, İ/R böbrek ve gastroknemius kasında histopatolojik değişiklikler ile birlikte olan nitrit ve MDA düzeyleri ile MPO, SOD ve katalaz etkinliğinde artmaya, GSH düzeylerinde azalmaya neden olmaktadır. Seçici Rho-kinaz inhibitörü ile önlenebilen İ/R'nin neden olduğu bu değişiklikler ise, büyük olasılıkla NF-κB/iNOS yolu aracılığı ile NO oluşumundaki artmanın eşlik ettiği lipit peroksidasyonu, nötrofil infiltrasyonu ve antioksidan enzim etkinliğindeki artış sonucunda ortaya çıkan inflamasyon ve oksidatif strese katkıda bulunmaktadır. *GSH*, indirgenmiş glutatyon; *iNOS*, indüklenbilir nitrik oksit sentaz; *İ/R*, iskemi-reperfüzyon; *MDA*, malondialdehit; *MPO*, miyeloperoksidaz; *NF-κB*, nükleer faktör-κB; *NO*, nitrik oksit, *SOD*, süperoksit dizmutaz; *Y-27632*, *trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilsikloheksankarboksamit dihidroklorit*.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sistemik yoldan uygulanan seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin sıçanlarda oluşturulan periferik İ/R sonrasında uzak organ olarak seçilen böbrekte ve hedef organ olarak seçilen gastroknemius kasında gelişebilecek hasar üzerindeki etkisinin sıçanlarda araştırıldığı bu çalışmada, İ/R'nin neden olduğu histopatolojik değişiklikler yanında, MPO, SOD ve katalaz enzimlerinin etkinliği ile nitrit ve MDA düzeylerindeki artmaya ve GSH düzeylerindeki azalmaya Rho-A/Rho-kinaz yolunun katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu bulguların, büyük olasılıkla NF-κB/iNOS yolu aracılığı ile aşırı miktarda NO oluşumu ve antioksidan enzimlerin etkinliğindeki artmaya lipid peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonunun eşlik ettiği İ/R'ye bağlı olarak gelişen yangı ve oksidatif stres sonucunda ortaya çıkan organ hasarının önlenmesinde Rho-A/Rho-kinaz inhibitörlerinin kullanılabilmesi konusunda yapılacak klinik öncesi ve klinik çalışmalara oldukça büyük bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular ışığında daha sonra yapılacak olan çalışmalarda, periferik İ/R oluşturulan sıçanların böbrek ve gastroknemius kasında Rho-kinaz, NF-κB, iNOS ve eNOS ekspresyonu ile ilgili çalışmalar yapılmalı, ayrıca iNOS ve eNOS etkinlikleri ölçülmelidir. Öte yandan, İ/R'nin böbrekte Rho-kinaz etkinliğini artırırken, gastroknemius kasında neden azalmaya neden olduğu araştırılmalıdır. Süperoksit radikali ve peroksinitritin İ/R'nin neden olduğu Rho-A/Rho-kinaz yolu aracılıklı oksidatif ve nitrozatif stres ile nötrofil infiltrasyonu ve lipid peroksidasyonundaki değişikliklere katkıları ile ilgili olarak daha ayrıntılı çalışmalar da yapılmalıdır. Öte yandan, periferik İ/R modeli oluşturulan sıçanların böbrek ve gastroknemius kasında İ/R'nin ne derecede hasara neden olduğunun belirlenmesi amacı ile daha ayrıntılı histopatolojik incelemeler yapılmalı, ayrıca apoptotik olaylarda rol oynayan enzimlerin etkinliği de ölçülmelidir. Böylece, Rho-A/Rho-kinaz yolunun etkinliğindeki artmanın organ hasarı ile birlikte ortaya çıkan apoptotik olaylardaki rolüne ilişkin mekanizmalara bir açıklık getirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Carden DL, Granger DN.** Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol*, **2000**; 190: 255-66.
2. **Davidge ST.** Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res*, **2001**; 89(8): 650-660.
3. **de Rougemont O, Lehmann K, Clavien PA.** Preconditioning, organ preservation, and postconditioning to prevent ischemia-reperfusion injury to the liver. *Liver Transpl*, **2009**; 15(10): 1172-1182.
4. **Gourdin MJ, Bree B, De Kock M.** The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol*, **2009**; 26(7): 537-547.
5. **Granger DN, Korthuis RJ.** Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol*, **1995**; 57: 311-332.
6. **Latanich CA, Toledo-Pereyra LH.** Searching for NF-kappaB-based treatments of ischemia reperfusion injury. *J Invest Surg*, **2009**; 22(4): 301-315.
7. **Machado NG, Alves MG, Carvalho RA, Oliveira PJ.** Mitochondrial involvement in cardiac apoptosis during ischemia and reperfusion: can we close the box? *Cardiovasc Toxicol*, **2009** (baskıda).
8. **McCord JM.** Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*, **1985**; 312: 159-163.
9. **Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH.** Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg*, **2009**; 22(1): 46-55.
10. **Raat NJ, Shiva S, Gladwin MT.** Effects of nitrite on modulating ROS generation following ischemia and reperfusion. *Adv Drug Deliv Rev*, **2009**; 61(4): 339-350.
11. **Seekamp A, Ward PA.** Ischemia-reperfusion injury. *Agents Actions Suppl*, **1993**; 41: 137-52.
12. **Snoeijs MG, van Heurn LE, Buurman WA.** Biological modulation of renal ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*, **2009** (baskıda).

13. **Steffens S, Montecucco F, Mach F.** The inflammatory response as a target to reduce myocardial ischaemia and reperfusion injury. *Thromb Haemost*, **2009**; 102(2): 240-247.
14. **Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P.** Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med*, **2008**; 8(3): 207-220.
15. **Welbourn CRB, Goldman G, Peterson IS.** Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg*, **1991**; 78: 651-5.
16. **Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K.** Regulation and function of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res*, **2000**; 261: 44-51.
17. **Barman SA, Zhu S, White RE.** RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5:663-71. Epub 2009 Aug 20.
18. **Boettner B, Van Aelst L.** The role of Rho GTPases in disease development. *Gene*, **2002**; 286: 155-174.
19. **Calò LA, Pessina AC.** RhoA/Rho-kinase pathway: much more than just a modulation of vascular tone. Evidence from studies in humans. *J Hypertens*, **2007**; 25(2): 259-264.
20. **Dhanasekaran N, Dermott JM.** Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal*, **1996**; 8: 235-245.
21. **Fukata Y, Amano M and Kaubuchi K.** Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*, **2001**; 22(1): 32-39.
22. **Hirano K.** Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci*, **2007**; (104): 109-115.
23. **Kume H.** RhoA/Rho-kinase as a therapeutic target in asthma. *Curr Med Chem*, **2008**;15(27): 2876-2885.
24. **Lee DL, Webb RC, Jin L.** Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature. *Hypertension*, **2004**; 44(6): 796-769.
25. **Liao JK, Seto M, Noma K.** Rho kinase (ROCK) inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol*, **2007**; 50(1): 17-24.
26. **LoGrasso PV, Feng Y.** Rho kinase (ROCK) inhibitors and their application to inflammatory disorders. *Curr Top Med Chem*, **2009**; 9(8): 704-723.
27. **Loirand G, Guilluy C, Pacaud P.** Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med*, **2006**; 16(6): 199-204.

28. **Nobes C, Hall A.** Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr Opin Genet Dev*, **1994**; 4: 77-81.
29. **Noma K, Oyama N, Liao JK.** Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.*, **2006**; 290(3): C661-C668.
30. **Puetz S, Lubomirov LT, Pfitzer G.** Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology*, **2009**; 24: 342-356.
31. **Rikitake Y, Liao JK.** Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res*, **2005**; 97(12): 1232-1235.
32. **Seasholtz TM, Brown JH.** Rho signalling in vascular diseases. *Mol Interv*, **2004**; 4(6): 348-357.
33. **Shimokawa H, Takeshita A.** Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2005**; 25: 1767-1775.
34. **Somlyo AP, Somlyo AV.** Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, **2000**; 15: 177-185.
35. **Somlyo AV.** New roads leading to Ca²⁺ sensitization. *Circ Res*, 2002; 91: 83-84.
36. **Takai Y, Sasaki T, Matozaki T.** Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, **2001**; 81: 153-208.
37. **Zhou Q, Liao JK.** Rho kinase: an important mediator of atherosclerosis and vascular disease. *Curr Pharm Des*, **2009**; 15(27): 3108-3115.
38. **Teraishi K, Kurata H, Nakajima A, Takaoka M, Matsumura Y.** Preventive effect of Y-27632, a selective Rho-kinase inhibitor, on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol*, **2004**; 505(1-3): 205-211.
39. **Takeda K, Jin MB, Fujita M, Fukai M, Sakurai T, Nakayama M, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, Furukawa H, Todo S.** A novel inhibitor of Rho-associated protein kinase, Y-27632, ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *Surgery*, **2003**; 133(2): 197-206.
40. **Aytaçoğlu BN, Sucu N, Tamer L, Polat A, Gül A, Değirmenci U Mavioğlu I, Dikmengil M.** Iloprost for the attenuation of ischemia/reperfusion injury in a distant organ. *Cell Biochem Funct*, **2006**; 24: 341-346.
41. **Sucu N, Unlu A, Tamer L, Aytacoğlu B, Coskun B, Bilgin R, Ercan B, Gul A, Dikmengil M, Atik U.** Effects of trimetazidine on tissue damage in kidney after hindlimb ischemia-reperfusion. *Pharmacol Res*, **2002**; 46(4): 345-349.

42. Akbas H, Ozden M, Kanko M, Maral H, Bulbul S, Yavuz S, Ozker E, Berki T. Protective antioxidant effects of carvedilol in a rat model of ischaemia-reperfusion injury. *J Int Med Res*, 2005; 33(5): 528-536.
43. Calikoglu M, Tamer L, Sucu N, Coskun B, Ercan B, Gul A, Calikoglu I, Kanik A. The effects of caffeic acid phenethyl ester on tissue damage in lung after hindlimb ischemia-reperfusion. *Pharmacol Res*, 2003; 48(4): 397-403.
44. Sirmali M, Uz E, Sirmali R, Kilbaş A, Yilmaz HR, Ağaçkiran Y, Altuntaş I, Delibaş N. The effects of erdosteine on lung injury induced by the ischemia-reperfusion of the hind-limbs in rats. *J Surg Res*, 2008; 145(2): 303-307.
45. Papanastasiou S, Estdale SE, Homer-Vanniasinkam S, Mathie RT. Protective effect of preconditioning and adenosine pretreatment in experimental skeletal muscle reperfusion injury. *Br J Surg*, 1999; 86(7): 916-922.
46. Stoffels F, Lohöfener F, Beisenhirtz M, Lisdat F, Büttemeyer R. Concentration decrease of nitric oxide in the postischemic muscle is not only caused by the generation of O₂⁻. *Microsurgery*, 2007; 27(6): 565-568.
47. Zhao HG, Sun XC, Xian XH, Li WB, Zhang M, Li QJ. The role of nitric oxide in the neuroprotection of limb ischemic preconditioning in rats. *Neurochem Res*, 2007; 32(11): 1919-1926.
48. Tamer L, Sucu N, Ercan B, Unlü A, Calikoğlu M, Bilgin R, Değirmenci U, Atik U. The effects of the caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on erythrocyte membrane damage after hind limb ischaemia-reperfusion. *Cell Biochem Funct*, 2004; 22(5): 287-290.
49. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 1994; 81: 637-647.
50. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. Schwartz SI (ed), Principles of Surgery. McGraw-Hill 7th Edition 1999; Vol I: 13-32.
51. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res*, 2000; 86: 117-118.
52. Kuzu MA, Koksoy C, Kale IT, Tanık A, Terzi C, Elhan AH. Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J Surgery*, 1998; 176: 348-351.
53. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sc*, 1994; 307: 284-292.
54. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am*, 1992; 72: 65-83.

55. **Tunctan B, Altug S.** The use of nitric oxide synthase inhibitors in inflammatory diseases: a novel class of anti-inflammatory agents. *Curr Med Chem: Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*, **2004**; 3: 271-301.
56. **Blantz RC, Munger K.** Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron*, **2002**; 90: 373-378.
57. **Chatterjee A, Catravas JD.** Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vasc Pharmacol*, **2008**; 49(4-6): 134-140.
58. **Cuzzocrea C.** Effect of inhibitors of nitric oxide in animal models and future directions for therapy in inflammatory disorders. *Curr Med Chem Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*, **2004**; 3: 261-270.
59. **Feihl F, Oddo M, Waeber B, Liaudet L.** Inhibitors of nitrogen oxide species production in animal models of inflammation and future directions for therapy in inflammatory disorders. *Curr Med Chem Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*, **2004**; 3: 239-259.
60. **Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik TJ.** Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Physiol Pharmacol*, **2003**; 54: 469-487.
61. **Howard R, Carter B, Curry J, Morton N, Rivett K, Rose M, Tyrrell J, Walker S, Williams G.** Analgesia review. *Paediatr Anaesth*, **2008**; 18(1): 64-78.
62. **Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM.** Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*, **2004**; 500(1-3): 255-266.
63. **Knott AB, Bossy-Wetzel E.** Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal*, **2008**; Aug 20.
64. **Martinez MC, Andriantsitohaina R.** Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal*, **2008**; Nov 17.
65. **Pacher P, Beckman JS, Liaudet L.** Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, **2007**; 87(1): 315-424.
66. **Raij L.** Nitric oxide and cardiovascular and renal effects. *Osteoarthritis Cartilage*. **2008**; 16(Suppl 2): S216.
67. **Rubbo H, Trostchansky A, O'Donnell VB.** Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences. *Arch Biochem Biophys*, **2008**; 484(2): 167-72.
68. **Schildknecht S, Ullrich V.** Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Arch Biochem Biophys*, **2009**; 484(2): 183-189.

69. **Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS.** Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacol*, **2007**; 15(6): 252-259.
70. **Vanegas H.** To the descending pain-control system in rats, inflammation-induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. *Neurosci Lett*, **2004**;361: 225-228.
71. **Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC.** Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, **2000**; 161: 1781-1785.
72. **Wimalawansa SJ.** Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indications. *Expert Opin Pharmacother*, **2008**; 9(11): 1935-1954.
73. **Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE.** Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr*, **2004**; 134(9): 2169-2172.
74. **Bryan NS, Bian K, Murad F.** Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci*, **2009**; 14: 1-18.
75. **Searles CD.** Transcriptional and postranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol*, **2006**; 291: C803-C816.
76. **Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Ueta Y, Sasaguri Y, Yanagihara N.** Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice. *Circ J*, **2009**; 73: 986-993.
77. **Garthwaite J.** Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci*, **2008**; 27: 2783-802.
78. **Cartwright EJ, Oceandy D, Neyses L.** Physiological implications of the interaction between the plasma membrane calcium pump and nNOS. *Pflugers Arch*, **2009**; 457: 665-671.
79. **Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY.** Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol*, **2003**; 285: F178-F190.
80. **Wu G, Meininger CJ.** Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu Rev Nutr*, **2002**; 22: 61-86.
81. **Dudzinski DM, Michel T.** Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res*, **2007**; 75: 247-260.
82. **Igarashi J, Michel T.** S1P and eNOS regulation. *Biochim Biophys Acta*, **2008**; 1781: 489-495.
83. **Zhang W, Kuncewicz T, Yu ZY, Zou L, Xu X, Kone BC.** Protein-protein interactions involving inducible nitric oxide synthase. *Acta Physiol Scand*, **2003**; 179: 137-142.

84. **Hirata M, Kohse KP, Chang CH, Ikebe T, Murad F.** Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **1990**; 265: 1268-1273.
85. **Rapaport RM.** Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta. *Circ Res*, **1986**; 58: 407-410.
86. **Koga T, Yoshida Y, Cai JQ, Islam MO, Imai S.** Purification and characterization of 240-kDa cGMP-dependent protein kinase substrate of vascular smooth muscle: close resemblance to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*, **1994**; 269: 11640-11647.
87. **Komalavilas P, Lincoln TM.** Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **1994**; 269: 8701-8707.
88. **Quignard JF, Frapier JM, Harricaine MC, Albat B, Nargeot J, Richards S.** Voltage-gated calcium channel currents in human coronary myocytes. *J Clin Invest*, **1997**; 99: 185-193.
89. **Blatter LA, Wier WG.** Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of calcium current. *Cell Calcium*, **1994**; 15: 122-131.
90. **Furukawa K, Ohsima AN, Tawada-Iwata, Y, Shigekawa M.** Cyclic GMP stimulates Na^+/Ca^{2+} exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem*, **1991**; 266: 12337-12341.
91. **Furukawa K, Tawada Y, Shigekawa M.** Regulation of the plasma membrane Ca^{2+} pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **1988**; 263: 8058-8065.
92. **Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM.** Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, **1991**; 40: 923-931.
93. **Raeymaekers L, Hofmann F, Casteels R.** Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J*, **1988**; 252: 269-273.
94. **Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G.** Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca^{2+} sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, **2000**; 275(28): 21722-21729.
95. **Giulivi C.** Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism, *Biochem J*, **1998**; 332: 673-679.
96. **Brown GC.** Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett*, **1995**; 369: 136-139.

97. **Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA.** Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, **1994**; 368: 850-853.
98. **Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman NB.** Stimulation of vascular Na⁺/K⁺-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP independent effect. *Am J Physiol*, **1994**; 266: H2146-H2151.
99. **Pucovsky V, Gordienko DV, Bolton TB.** Effect of nitric oxide donors and noradrenaline on Ca²⁺ release sites and global intracellular Ca²⁺ in myocytes from guinea-pig small mesenteric arteries. *J Physiol*, **2002**; 539: 25-39.
100. **Alonso-Galicia M, Sun CW, Falck JR, Harder DR, Roman RJ.** Contribution of 20-HETE to the vasodilator actions of nitric oxide in renal arteries. *Am J Physiol*, **1998**; 275: F370-F378.
101. **Sun CW, Alonso-Galicia M, Taheri MR, Falck JR, Harder DR, Roman RJ.** Nitric oxide-20-hydroxyeicosatetraenoic acid interaction in the regulation of K⁺ channel activity and vascular tone in renal arterioles. *Circ Res*, **1998**; 83: 1069-1079.
102. **Alonso-Galicia M, Hudetz AG, Shen H, Harder DR, Roman RJ.** Contribution of 20-HETE to vasodilator actions of nitric oxide in the cerebral microcirculation. *Stroke*, **1999**; 30: 2727-2734.
103. **Homer KL, Wanstall JC.** Cyclic GMP-independent relaxation of rat pulmonary artery by spermine NONOate, a diazeniumdiolate nitric oxide donor. *Br J Pharmacol*, **2000**; 131: 673-82.
104. **Adachi T, Matsui R, Weisbrod RM, Najibi S, Cohen RA.** Reduced sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake activity can account for the reduced response to NO, but not sodium nitroprusside, in hypercholesterolaemic rabbit aorta. *Circulation*, **2001**; 104: 1040-1045.
105. **Sekkai D, Aillet F, Israel N, Lepoivre M.** Inhibition of NF-kappaB and HIV-1 long terminal repeat transcriptional activation by inducible nitric oxide synthase 2 activity. *J Biol Chem*, **1998**; 273: 3895-3900.
106. **Spiecker M, Peng HB, Liao JK.** Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of Ikappa-Balpha. *J Biol Chem*, **1997**; 272: 30969-30974.
107. **Perkins WJ, Pabelick C, Warner DO, Jones KA.** cGMP-independent mechanism of airway smooth muscle relaxation induced by S-nitrosoglutathione. *Am J Physiol Cell Physiol*, **1998**; 275: 468-474.
109. **Garthwaite J.** Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci*, **1991**; 14: 60-67.
110. **Stamler JS.** Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, **1994**; 78: 931-936.

111. **Bredt DS, Snyder SH.** Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*, **1994**; 63: 175-195.
112. **Nathan C.** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, **1992**; 6: 3051-3064.
113. **Armitage ME, Wingler K, Schmidt HH, La M.** Translating the oxidative stress hypothesis into the clinic: NOX versus NOS. *J Mol Med*, **2009** (baskida).
114. **Bloodsworth A, O'Donnell VB, Freeman BA.** Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2000**; 20: 1707-1715.
115. **Esposito E, Cuzzocrea S.** Superoxide, NO, peroxynitrite and PARP in circulatory shock and inflammation. *Front Biosci*, **2009**; 14: 263-296.
116. **Hogg N, Kalyanaraman B.** Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*, **1993**; 1411: 378-384.
117. **Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N.** Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit*, **2009**; 15(10): RA209-RA219.
118. **Schindhelm RK, van der Zwan LP, Teerlink T, Scheffer PG.** Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clin Chem*, **2009**; 55(8): 1462-1470.
119. **Victor VM, Apostolova N, Herance R, Hernandez-Mijares A, Rocha M.** Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis: mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. *Curr Med Chem*, **2009**; 16(35): 4654-4667.
120. **Zheng L, Kern TS.** Role of nitric oxide, superoxide, peroxynitrite and PARP in diabetic retinopathy. *Front Biosci*, **2009**; 14: 3974-3987.
121. **Tunctan B, Yaghini FA, Estes A, Malik KU.** Inhibition by nitric oxide and cyclooxygenase of cytochrome p450 4A expression and activity contributes to endotoxin-induced hypotension in rats. *Nitric Oxide: Biol Chem*, **2006**; 14: 51-57.
122. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **1976**; 72: 248-254.
123. **Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR.** Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, **1982**; 126: 131-138.
124. **Yagi K.** Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In: Armstrong D, Ed. *Free radicals in diagnostic medicine*, New York: Plenum Press, **1994**; 1-15.
125. **Beutler E.** Red cell metabolism. In: *A Manual of Biochemical Methods*, 3th Ed., Orlando: Grune & Stratton, **1984**; 72-73, 105-106.

126. **Chance B, Maehley AC.** Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick S, Kaplan N, Eds. *Methods in enzymology*, New York: Academic Press, **1955**; 764-75.
127. **McCord JM, Fridovich I.** Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, **1969**; 244: 6049-6055.
128. **Bao W, Hu E, Tao L, Boyce R, Mirabile R, Thudium DT, Ma XL, Willette RN, Yue TL.** Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, **2004**; 61(3): 548-558.
129. **Hamid SA, Bower HS, Baxter GF.** Rho kinase activation plays a major role as a mediator of irreversible injury in reperfused myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2007**; 292(6): H2598-H2606.
130. **Ikeda F, Terajima H, Shimahara Y, Kondo T, Yamaoka Y.** Reduction of hepatic ischemia/reperfusion-induced injury by a specific ROCK/Rho kinase inhibitor Y-27632. *J Surg Res*, **2003**; 109(2): 155-160.
131. **Koksel O, Yildirim C, Tiftik RN, Kubat H, Tamer L, Cinel L, Kaplan MB, Değirmenci U, Özdülger A, Büyükaşar K.** Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) upregulation in oleic acid-induced lung injury and its restoration by Y-27632. *Eur J Pharmacol*, **2005**; 510(1-2): 135-142.
132. **Johansson R, Persson K.** Phenotypic modulation of cultured bladder smooth muscle cells and the expression of inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol*, **2004**; 286(4): R642-R648.
133. **Kato T, Hashikabe H, Iwata C, Akimoto K, Hattori Y.** Statin blocks Rho/Rho-kinase signalling and disrupts the actin cytoskeleton: relationship to enhancement of LPS-mediated nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, **2004**; 1689(3): 267-272.
134. **Kraynack NC, Corey DA, Elmer HL, Kelley TJ.** Mechanisms of NOS2 regulation by Rho GTPase signaling in airway epithelial cells. *Am J Physiol*, **2002**; 283(3): L604-L611.
135. **Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I.** Rho A negatively regulates cytokine-mediated inducible nitric oxide synthase expression in brain-derived transformed cell lines: negative regulation of IKK α . *Free Radic Biol Med*, **2003**; 35(9): 1037-1050.
136. **Chen H, Ikeda U, Shimpo M, Ikeda M, Minota S, Shimada K.** Fluvastatin upregulates inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **2000**; 36(6): 923-928.
137. **Ikeda U, Shimpo M, Ikeda M, Minota S, Shimada K.** Lipophilic statins augment inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*, **2001**; 38(1): 69-77.

138. Yamamoto T, Takeda K, Harada S, Nakata T, Azuma A, Sasaki S, Nakagawa M. HMG-CoA reductase inhibitor enhances inducible nitric oxide synthase expression in rat vascular smooth muscle cells; involvement of the Rho/Rho kinase pathway. *Atherosclerosis*, **2003**; 166(2): 213-222.
139. Machida T, Hamaya Y, Izumi S, Hamaya Y, Iizuka K, Igarashi Y, Minami M, Levi R, Hirafuji M. Sphingosine 1-phosphate inhibits nitric oxide production induced by interleukin-1beta in rat vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **2008**; 325(1): 200-209.
140. Wei CY, Huang KC, Chou YH, Hsieh PF, Lin KH, Lin WW. The role of Rho-associated kinase in differential regulation by statins of interleukin-1beta- and lipopolysaccharide-mediated nuclear factor kappaB activation and inducible nitric-oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, **2006**; 69(3): 960-967.
141. Abe K, Morikawa K, Hizume T, Uwatoku T, Oi K, Seto M, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Shimokawa H. Prostacyclin does not inhibit rho-kinase: an implication for the treatment of pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, **2005**; 45(2): 120-124.
142. Doi T, Sakoda T, Akagami T, Naka T, Mori Y, Tsujino T, Masuyama T, Ohyanagi M. Aldosterone induces interleukin-18 through endothelin-1, angiotensin II, Rho/Rho-kinase, and PPARs in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2008**; 295(3): H1279-H1287.
143. Galaria II, Fegley AJ, Nicholl SM, Roztocil E, Davies MG. Differential regulation of ERK1/2 and p38(MAPK) by components of the Rho signaling pathway during sphingosine-1-phosphate-induced smooth muscle cell migration. *J Surg Res*, **2004**; 122(2): 173-179.
144. Ozawa Y, Kobori H. Crucial role of Rho-nuclear factor-kappaB axis in angiotensin II-induced renal injury. *Am J Physiol*, **2007**; 293(1): F100-F109.
145. Toda M, Dawson M, Nakamura T, Munro PM, Richardson RM, Bailly M, Ono SJ. Impact of engagement of FcepsilonRI and CC chemokine receptor 1 on mast cell activation and motility. *J Biol Chem*, **2004**; 279(46): 48443-48448.
146. Yano K, Kawasaki K, Hattori T, Tawara S, Toshima Y, Ikegaki I, Sasaki Y, Satoh S, Asano T, Seto M. Demonstration of elevation and localization of Rho-kinase activity in the brain of a rat model of cerebral infarction. *Eur J Pharmacol*, **2008**; 594(1-3): 77-83.
147. Nishikimi T, Matsuoka H. Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: renoprotective effect of rho-kinase inhibitor in hypertensive glomerulosclerosis. *J Pharmacol Sci*, **2006**; 100(1): 22-28.
148. Fagan KA, Oka M, Bauer NR, Gebb SA, Ivy DD, Morris KG, McMurtry IF. Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *Am J Physiol*, **2004**; 287(4): L656-L664.
149. Shin HK, Salomone S, Potts EM, Lee SW, Millican E, Noma K, Huang PL, Boas DA, Liao JK, Moskowitz MA, Ayata C. Rho-kinase inhibition acutely augments blood flow in focal cerebral ischemia via endothelial mechanisms. *J Cereb Blood Flow Metab*, **2007**; 27(5): 998-1009.

- 150. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK.** Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, **2002**; 106(1): 57-62.
- 151. Wolfrum S, Dendorfer A, Rikitake Y, Stalker TJ, Gong Y, Scalia R, Dominiak P, Liao JK.** Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2004**; 24(10): 1842-1847.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe Nihal Sarı, 1984 yılında Afyon'da doğmuştur. İlkokul öğrenimini Konya'da, orta ve lise öğrenimini Kahramanmaraş ve Aksaray'da tamamlamıştır. 2006 yılında Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden mezun olmuştur. Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda 2007-2008 Eğitim-Öğretim Yılı Güz Dönemi'nde Yüksek Lisans Programı'na başlamıştır. 02/01/2009 tarihinden itibaren Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir. İngilizce bilmektedir.