

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

**ENDOTOKSEMİK SIÇANLARDA  
EKSTRASELÜLER SİNYAL İLE DÜZENLENEN KİNAZ 1/2  
VE İNDÜKLENEBİLİR NİTRİK OKSİT SENTAZ YOLU  
ARACILIKLI VASKÜLER HİPOREAKTİVİTENİN  
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Ecz. Remile Belma KORKMAZ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

MERSİN - 2009

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

**ENDOTOKSEMİK SIÇANLARDA  
EKSTRASELÜLER SİNYAL İLE DÜZENLENEN KİNAZ 1/2  
VE İNDÜKLENEBİLİR NİTRİK OKSİT SENTAZ YOLU  
ARACILIKLI VASKÜLER HİPOREAKTİVİTENİN  
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Ecz. Remile Belma KORKMAZ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
BAP SBE EMB (RBK) 2006-3 DR nolu proje ve  
TÜBİTAK tarafından 106S299 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: .....

MERSİN - 2009



Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

"Eczacılık Farmakoloji Anabilim Dalı Eczacılık Farmakoloji Doktora Programı" çerçevesinde yürütülmüş olan "Endotoksemik sıçanlarda ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz 1/2 ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz yolu aracılıklı vasküler hiporeaktivitenin mekanizmalarının araştırılması" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 10/11/2009

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

Prof. Dr. A. Tuncay DEMİRYÜREK  
Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Farmakoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

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

Doç. Dr. Mustafa ARK  
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Farmakoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Orhan ULUDAĞ  
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Farmakoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU



## TEŞEKKÜR

Her zaman benden bilgisini, sabrını, desteğini ve ilgisini esirgemeyen Tez Danışmanım Prof. Dr. Sn. Bahar TUNÇTAN'a teşekkür ederim.

Tezim ve diğer çalışmalarım sırasında benden değerli bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Sn. A. Tuncay DEMİRYÜREK'e, Doç. Dr. Sn. M. Sami SERİN'e, Yrd. Doç. Dr. Sn. Seyhan Şahan FIRAT'a ve Yrd. Doç. Dr. Sn. C. Kemal BUHARALIOĞLU'na, dostluğunu ve yardımlarını benimle paylaşan mesai arkadaşım Uzm. Ecz. Sn. Tuba CÜEZ'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Her zaman gösterdikleri sabır ve destek için aileme sonsuz teşekkürler...



# İÇİNDEKİLER

<b>Kabul ve Onay</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xvi
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xx
<b>ÖZET</b> .....	xxvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xxviii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	7
2.1 Septik Şok .....	7
2.1.1 Epidemiyolojisi .....	7
2.1.2 Etiyolojisi .....	8
2.1.3 Patofizyolojisi .....	10
2.1.4 Tedavisi .....	14
2.2 MAPK'ler .....	17
2.2.1 Özellikleri .....	17
2.2.2 Ekspresyon ve Etkinliklerinin Düzenlenmesi .....	17
2.2.3 İnhibitörleri .....	18
2.2.4 Fizyolojik Olaylardaki Rolü .....	19
2.2.5 Patolojik Olaylardaki Rolü .....	20
2.3 NOS'ler .....	21
2.3.1 Özellikleri .....	21
2.3.2 Ekspresyon ve Etkinliklerinin Düzenlenmesi .....	25
2.3.3 İnhibitörleri .....	27
2.3.4 Fizyolojik Olaylardaki Rolü .....	29
2.3.5 Patolojik Olaylardaki Rolü .....	31

2.4 Guanilil Siklazlar .....	32
2.4.1 Özellikleri .....	32
2.4.2 Ekspresyon ve Etkinliklerinin Düzenlenmesi .....	34
2.4.3 İnhibitörleri .....	35
2.4.4 Fizyolojik Olaylardaki Rolü .....	35
2.4.5 Patolojik Olaylardaki Rolü .....	36
2.5 Protein Kinazlar .....	37
2.5.1 Özellikleri .....	37
2.5.2 Ekspresyon ve Etkinliklerinin Düzenlenmesi .....	37
2.5.3 İnhibitörleri .....	38
2.5.4 Fizyolojik Olaylardaki Rolü .....	39
2.5.5 Patolojik Olaylardaki Rolü .....	40
2.6 Apoptoz .....	42
2.6.1 Özellikleri .....	42
2.6.2 Düzenlenmesi .....	42
2.6.3 İnhibitörleri .....	43
2.6.4 Fizyolojik Olaylardaki Rolü .....	44
2.6.5 Patolojik Olaylardaki Rolü .....	44
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>47</b>
3.1 GEREÇ .....	47
3.1.1 Deney Hayvanı ve Doku .....	47
3.1.2 Sarf Malzemesi .....	47
3.1.3 Teçhizat .....	51
3.2 YÖNTEM .....	52
3.2.1 <i>In Vivo</i> Çalışmalar .....	52
3.2.2 Vasküler Kontraktilite Çalışmaları .....	53
3.2.3 Dokuların Homojenize Edilmesi ve Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması .....	60
3.2.4 Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Toplam Protein Düzeyinin Ölçülmesi .....	60

3.2.5 Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda $\alpha$ -Düz Kas Aktini Protein Ekspresyon Düzeyi ile MEK1, ERK1/2, iNOS, çGS, PKG ve Kaspaz-3 Protein Ekspresyon Düzeyleri ve/veya Etkinliğinin ve Serumda iNOS Etkinliğinin Ölçülmesi .....	61
3.2.6 Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz .....	66
<b>4. BULGULAR</b> .....	67
4.1 <i>In Vivo</i> Çalışmalar .....	67
4.1.1 ET'nin OAB ve KH Üzerindeki Etkisi .....	67
4.1.2 ET ile Azalan OAB ve Artan KH Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi .....	67
4.1.3 ET ile Azalan OAB ve Artan KH Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi .....	71
4.2 Vasküler Kontraktilite Çalışmaları .....	73
4.2.1 ET'nin Asetilkolin ve Gliseril Trinitrat ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları Üzerindeki Etkisi .....	73
4.2.2 ET ile Azalan Asetilkolin ve Gliseril Trinitrat ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi .....	77
4.2.3 ET ile Azalan Asetilkolin ve Gliseril Trinitrat ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi .....	78
4.2.4 Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının Asetilkolin ve Gliseril Trinitrat ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları Üzerindeki Etkisi .....	79
4.2.5 ET'nin Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtları Üzerindeki Etkisi .....	80
4.2.5.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	80
4.2.5.2 $E_{maks}$ ve $EC_{50}$ Değerleri .....	81
4.2.6. ET ile Azalan Noradrenalin Kasılma Yanıtları Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi .....	81
4.2.6.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	81
4.2.6.2 $E_{maks}$ ve $EC_{50}$ Değerleri .....	88



4.2.7 ET ile Azalan Noradrenalin Kasılma Yanıtları Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi .....	89
4.2.7.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	89
4.2.7.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	90
4.2.8 ET'nin Neden Olduğu ve Sistemik iNOS İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının Etkisi .....	91
4.2.8.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	91
4.2.8.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	91
4.2.9 ET'nin Neden Olduğu ve Sistemik ERK1/2 İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının Etkisi .....	92
4.2.9.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	92
4.2.9.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	93
4.2.10 ET'nin Neden Olduğu Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde çGS İnhibisyonunun Etkisi .....	93
4.2.10.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	93
4.2.10.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	98
4.2.11 ET'nin Neden Olduğu ve çGS İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının Etkisi .....	102
4.2.11.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	102
4.2.11.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	103
4.2.12 ET'nin Neden Olduğu ve çGS İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi .....	104
4.2.12.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	104
4.2.12.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	108

4.2.13 Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının ET'nin Neden Olduğu çGS ve Sistemik iNOS İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Etkisi .....	110
4.2.13.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	110
4.2.13.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	111
4.2.14 ET'nin Neden Olduğu ve çGS İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi .....	112
4.2.14.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	112
4.2.14.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	115
4.2.15 Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının ET'nin Neden Olduğu çGS ve Sistemik ERK1/2 İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Etkisi .....	117
4.2.15.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	117
4.2.15.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	118
4.2.16 ET'nin Neden Olduğu Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde PKG İnhibisyonunun Etkisi .....	119
4.2.16.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	119
4.2.16.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	124
4.2.17 ET'nin Neden Olduğu ve PKG İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının Etkisi .....	129
4.2.17.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	129
4.2.17.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	130
4.2.18 ET'nin Neden Olduğu ve PKG İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi .....	131
4.2.18.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	131
4.2.18.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	134

4.2.19 Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının ET'nin Neden Olduğu PKG ve Sistemik iNOS İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Etkisi .....	136
4.2.19.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	136
4.2.19.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	137
4.2.20 ET'nin Neden Olduğu ve PKG İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi .....	138
4.2.20.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	138
4.2.20.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	141
4.2.21 Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının ET'nin Neden Olduğu PKG ve Sistemik ERK1/2 İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Etkisi .....	144
4.2.21.1 Derişim-Yanıt Eğrileri .....	144
4.2.21.2 E <sub>maks</sub> ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....	145
4.3 Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda $\alpha$ -Düz Kas Aktini ile MEK1, ERK1/2, iNOS, çGS, PKG ve Kaspaz-3 Protein Ekspresyonu ve/veya Etkinliğinin ve Serumda iNOS Etkinliğinin Ölçüldüğü Çalışmalar .....	146
4.3.1 ET, 1,3-PBIT ve/veya U0126'nın $\alpha$ -Düz Kas Aktini Protein Ekspresyon Düzeyi Üzerindeki Etkisi .....	146
4.3.2 ET'nin MEK1 Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi .....	146
4.3.2.1 Endotoksemik Sıçanlarda MEK1 Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi .....	150
4.3.2.2 Endotoksemik Sıçanlarda MEK1 Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi .....	150



4.3.3 ET'nin ERK1/2 Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi .....	151
4.3.3.1 Endotoksemik Sıçanlarda ERK1/2 Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi .....	154
4.3.3.2 Endotoksemik Sıçanlarda ERK1/2 Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi .....	155
4.3.4 ET'nin iNOS Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi .....	156
4.3.4.1 Endotoksemik Sıçanlarda iNOS Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi .....	156
4.3.4.2 Endotoksemik Sıçanlarda iNOS Protein Ekspresyon Düzeyi Etkinliği Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi .....	159
4.3.5 ET'nin çGS Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi .....	160
4.3.5.1 Endotoksemik Sıçanlarda çGS Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi .....	160
4.3.5.2 Endotoksemik Sıçanlarda çGS Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi .....	163

4.3.6 ET'nin PKG Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği	
Üzerindeki Etkisi .....	163
4.3.6.1 Endotoksemik Sıçanlarda PKG Protein Ekspresyon	
Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun	
Etkisi .....	166
4.3.6.2 Endotoksemik Sıçanlarda PKG Protein Ekspresyon	
Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik ERK1/2	
İnhibisyonunun Etkisi .....	166
4.3.7 ET'nin Kaspaz-3 Etkinliği Üzerindeki Etkisi .....	167
4.3.7.1 Endotoksemik Sıçanlarda Kaspaz-3 Etkinliği Üzerinde	
Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi .....	169
4.3.7.2 Endotoksemik Sıçanlarda Kaspaz-3 Etkinliği Üzerinde	
Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi .....	170
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>172</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>179</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>181</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>208</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1.</b> ET ile oluşan MEK1/ERK1/2/iNOS/çGS/PKG yolu aracılıklı hipotansiyon ve vasküler hiporeaktivitenin moleküler mekanizmalarının araştırılmasında kullanılan araştırma protokolü .....	6
<b>Şekil 2.1.</b> LPS'nin yapısı .....	11
<b>Şekil 2.2.</b> LPS'nin TLR'lerden TLR2/TLR4 reseptörleri aracılığı ile oluşan sinyal ileti yolu .....	13
<b>Şekil 2.3.</b> NO'nun fizyolojik ve patofizyolojik olaylardaki rolü .....	30
<b>Şekil 2.4.</b> çGS'nin moleküler yapısı .....	34
<b>Şekil 4.1.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlarda seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT'nin (A) OAB ve (B) KH üzerindeki etkisi .....	69
<b>Şekil 4.2.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlarda MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın (A) OAB ve (B) KH üzerindeki etkisi .....	70
<b>Şekil 4.3.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastırılmış endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında (A) asetilkolin ve (B) gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları .....	75



<b>Şekil 4.4.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastırılmış endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında (A) asetilkolin ve (B) gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları .....	76
<b>Şekil 4.5.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen (A) endotel tabakası sağlam ve (B) uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile <u>ilk kez</u> çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları .....	83
<b>Şekil 4.6.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen (A) endotel tabakası sağlam ve (B) uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile <u>ilk kez</u> çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları .....	84
<b>Şekil 4.7.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile <u>ilk kez</u> çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A) $E_{maks}$ ve (B) $EC_{50}$ değerleri .....	86
<b>Şekil 4.8.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile <u>ilk kez</u> çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A) $E_{maks}$ ve (B) $EC_{50}$ değerleri .....	87

**Şekil 4.9.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A)  $E_{maks}$  ve (B)  $EC_{50}$  değerleri üzerinde seçici çGS inhibitörü ODQ'nun etkisi ..... 100

**Şekil 4.10.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A)  $E_{maks}$  ve (B)  $EC_{50}$  değerleri üzerinde seçici çGS inhibitörü ODQ'nun etkisi ..... 101

**Şekil 4.11.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A)  $E_{maks}$  ve (B)  $EC_{50}$  değerleri üzerinde seçici PKG inhibitörü KT5823'ün etkisi ..... 126

**Şekil 4.12.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A)  $E_{maks}$  ve (B)  $EC_{50}$  değerleri üzerinde seçici PKG inhibitörü KT5823'ün etkisi ..... 127

**Şekil 4.13.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında  $\alpha$ -düz kas aktini protein ekspresyon düzeyi üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi ..... 148

<b>Şekil 4.14.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında MEK1 (A) protein ekspresyonu ve (B) etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	149
<b>Şekil 4.15.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında (A) ERK1/2 protein ekspresyonu, (B) fosforile ERK1/2 protein ekspresyonu ve (C) ERK1/2 etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	153
<b>Şekil 4.16.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında (A) iNOS protein ekspresyonu ve (B) nitrit+nitrat düzeyleri ile (C) serum nitrit+nitrat düzeyleri üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	158
<b>Şekil 4.17.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında (A) çGS protein ekspresyonu ve (B) siklik GMP düzeyleri üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	162
<b>Şekil 4.18.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında PKG (A) protein ekspresyonu ve (B) etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	165
<b>Şekil 4.19.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında kaspaz-3 etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	169



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Sepsis ve septik şok ile ilgili tanımlar .....	9
<b>Çizelge 2.2.</b> Septik şokun rutin tedavisi .....	15
<b>Çizelge 2.3.</b> Sepsiste hedeflere yönelik eski ve yeni tedavi seçenekleri .....	16
<b>Çizelge 2.4.</b> Memeli NOS izoformlarının özellikleri .....	22
<b>Çizelge 2.5.</b> Geliştirilen çeşitli NOS inhibitörleri .....	27
<b>Çizelge 2.6.</b> çGS izoformlarının özellikleri ve dokulardaki dağılımı .....	32
<b>Çizelge 2.7.</b> Membranal GS izoformları, ligantları ve doku dağılımları .....	33
<b>Çizelge 2.8.</b> PKGI hedefleri ve bu hedefleri fosforile ettiğinde oluşan etkiler .....	40
<b>Çizelge 3.1.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastırılmış endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında fenilefrin ile elde edilen birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları .....	54
<b>Çizelge 3.2.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarının DMSO, ODQ veya KT5823 ile on beş dakika inkübasyonu sonrasında bazal gerimde oluşan değişiklikler .....	58

<b>Çizelge 3.3.</b> Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya ET uygulamasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan $E_{maks}$ ve $EC_{50}$ değerleri üzerinde DMSO'nun etkisi .....	59
<b>Çizelge 3.4.</b> $\alpha$ -Düz kas aktini protein düzeyi ile MEK1, ERK1/2, iNOS, çGS ve PKG protein ekspresyonu ve/veya etkinliğinin ölçülmesinde yapılan işlemler ve kullanılan antikörlerin özellikleri .....	64
<b>Çizelge 4.1.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlarda seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın OAB ve KH üzerindeki etkisi .....	68
<b>Çizelge 4.2.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastrılmış endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında asetilkolin ve gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları .....	74
<b>Çizelge 4.3.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile <u>ilk kez</u> çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları .....	82
<b>Çizelge 4.4.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile <u>ilk kez</u> çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan $E_{maks}$ ve $EC_{50}$ değerleri .....	85

<b>Çizelge 4.5.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile <u>ikinci kez</u> çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma üzerinde seçici çGS inhibitörü ODQ'nun etkisi .....	94
<b>Çizelge 4.6.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile <u>ikinci kez</u> çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan $E_{maks}$ ve $EC_{50}$ değerleri üzerinde seçici çGS inhibitörü ODQ'nun etkisi .....	99
<b>Çizelge 4.7.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile <u>ikinci kez</u> çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma üzerinde seçici PKG inhibitörü KT5823'ün etkisi .....	120
<b>Çizelge 4.8.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile <u>ikinci kez</u> çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan $E_{maks}$ ve $EC_{50}$ değerleri üzerinde seçici PKG inhibitörü KT5823'ün etkisi .....	125
<b>Çizelge 4.9.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında $\alpha$ -düz kas aktini protein ekspresyon düzeyi üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	147

<b>Çizelge 4.10.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında MEK1 protein ekspresyon düzeyi ve etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	147
<b>Çizelge 4.11.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında ERK1/2 protein ekspresyonu ve etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	152
<b>Çizelge 4.12.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında iNOS protein ekspresyonu ile doku ve serum nitrit+nitrat düzeyleri üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	157
<b>Çizelge 4.13.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında çGS protein ekspresyonu ve siklik GMP düzeyi üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	161
<b>Çizelge 4.14.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında PKG protein ekspresyonu ve etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	164
<b>Çizelge 4.15.</b> Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında kaspaz-3 etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi .....	168

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ac-DEVD-CHO	N-asetil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehit ( <i>N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde</i> )
1,3-PBIT	Fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyüere) dihidrobromür ( <i>phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide</i> )
1,4-PBIT	Fenilen-1,4-bis(etan-2-izotiyüere) dihidrobromür ( <i>phenylene-1,4-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide</i> )
7-NI	7-Nitroindazol ( <i>7-nitroindazole</i> )
20-HEDE	20-Hidroksieikosa-6(Z),15(Z)-dienoik asit ( <i>20-hydroxieicosa-6[Z],15[Z]-dienoic acid</i> ) (WIT002)
20-HETE	20-Hidroksieikozatetraenoik asit ( <i>20-hydroxyeicosatetraenoic acid</i> )
5,14-HEDGE	N-[20-Hidroksieikosa-5(Z),14(Z)-dienoil]glisin ( <i>N-[20-hydroxyeicosa-5(Z),14(Z)-dienoyle]glycine</i> )
5-LO	5-Lipoksijenaz ( <i>5-lipoxygenase</i> )
a/h	Ağırlık/hacim
ADP	Adenozin difosfat ( <i>adenosine diphosphate</i> )
AE-TIUs	Aminoetil-izotiyüereler ( <i>aminoethyl-isothioureas</i> )
AGEs	İleri glikosilasyon son ürünleri ( <i>advanced glycosylation end products</i> )
AMP	Adenozin 5'-monofosfat ( <i>adenosine 5'-monophosphate</i> )
AMT	2-Amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiyazin ( <i>2-amino-5,6-dihydro-6-methyl-4H-1,3-tiazine</i> )
ANOVA	Varyans analizi ( <i>analysis of variance</i> )
ANP	Atriyal natriüretik peptit ( <i>atrial natriuretic peptide</i> )
AP-1	Etkinleştirici protein-1 ( <i>activating protein-1</i> )
Apaf-1	Apoptoz etkinleştirici faktör-1 ( <i>apoptosis activating factor-1</i> )

ASK1	Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz ( <i>apoptosis signal-regulating kinase</i> )
ATP	Adenozin trifosfat ( <i>adenosine triphosphate</i> )
ATPaz	Adenozin tripfosfataz ( <i>adenosine triphosphatase</i> )
Bcl-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma-2</i>
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiyopterin ( <i>tetrahydrobiopterin</i> )
BNP	Beyin natriüretik peptit ( <i>brain natriuretic peptide</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>
C/EBP	<i>CCAAT enhancer binding protein</i>
CNP	C türü natriüretik peptit ( <i>C type natriuretic peptide</i> )
COX	Siklooksijenaz ( <i>Cyclooxygenase</i> )
COX-2	İndüklenebilir siklooksijenaz ( <i>inducible cyclooxygenase</i> )
CREB	Siklik adenozin 5'-monofosfat yanıt elementini bağlayıcı protein ( <i>cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein</i> )
CYP	Sitokrom P450 ( <i>cytochrome P450</i> )
çGS	Çözünebilir guanilil siklaz ( <i>soluble guanylyl cyclase</i> )
DMSO	Dimetilsülfoksit ( <i>dimethylsulphoxide</i> )
DNA	Deoksiribonükleik asit ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC <sub>50</sub>	Derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan %50 etki oluşturan derişim
EET	Epoksieikozatrienoik asit ( <i>epoxyeicosatrienoic acid</i> )
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E <sub>maks</sub>	Derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan maksimum etki
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz ( <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )
ERK	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz ( <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )
ET	Endotoksin

ETPI	5-Etil-N-[4-trifloro(metil)fenil]-izotiyüüre ( <i>5-Ethyl-N-[4-trifluoro(methyl)phenyl]-isothiourea</i> )
F	İstatistiksel analizlerde tek-yönlü varyans analizi sonrasında hesaplanan anlamlılık düzeyi ( <i>probability</i> )
FAD	Flavin adenin dinükleotit ( <i>flavin adenine dinucleotide</i> )
FADD	Fas-associated death domain
FDA	Food and Drug Administration
PFK	Fosfofruktokinaz ( <i>phosphofructokinase</i> )
FGF	Fibroblast büyüme faktörü ( <i>fibroblast growth factor</i> )
FLA <sub>2</sub>	Fosfolipaz A <sub>2</sub> ( <i>phospholipase A<sub>2</sub></i> )
FLC	Fosfolipaz C ( <i>phospholipase C</i> )
FMN	Flavin mononükleotit ( <i>flavin mononucleotide</i> )
Foxp3	Forkhead box 3
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz ( <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> )
GMP	Guanozin 5'-monofosfat ( <i>guanosine 5'-monophosphate</i> )
GS	Guanilil siklaz ( <i>guanylyl cyclase</i> )
GTP	Guanozin 5'-trifosfat ( <i>guanosine 5'-triphosphate</i> )
GW274150	(S)-2-amino-(1-iminoetilamino)-5-tioheptanoik asit ( <i>[S]-2-amino-[1-iminoethylamino]-5-thioheptanoic acid</i> )
h/h	Hacim/hacim
HIF1	Hipoksi ile indüklenebilen faktör 1 (hypoxia-inducible factor 1)
hsp90	Heat shock protein 90
IC <sub>50</sub>	Enzim etkinliğini %50 oranında azaltan derişim
IGF1	İnsüline benzeyen büyüme faktörü (insulin-like growth factor 1)
IFN	İnterferon ( <i>interferon</i> )
IL	İnterlökin ( <i>interleukin</i> )
IP	İntraperitoneal ( <i>intraperitoneal, intraperitoneally</i> )
IP <sub>3</sub>	İnozitol-1,4,5-trifosfat ( <i>inositol-1,4,5-triphosphate</i> )
IRAK	İnterlökin-1 reseptör ile ilişkili kinaz ( <i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i> )
IRF1	İnterferon düzenleyici faktör 1 ( <i>interferon regulatory factor 1</i> )

iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz ( <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
KH	Kalp hızı
K <sub>i</sub>	Enzim-inhibitör etkileşmesinde ayrışma değişmezi ( <i>dissociation constant for enzyme-inhibitor interaction</i> )
KT5823	(9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-hekzahidro-10-metoksi-2,9-dimetil-1-okso-9,12-epoksi-1H-diindolo-[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo [3,4-i][1,6]benzodiazosin-10-karboksilik asit metil ester ( <i>[9S,10R,12R]-2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-methoxy-2,9-dimethyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo-[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocine-10-carboxylic acid methyl ester</i> )
LBP	Lipid bağlayıcı protein ( <i>lipid binding protein</i> )
LC <sub>20</sub>	20 kDa myosin light chain
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arjinin metil ester ( <i>N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester</i> )
L-NA	N-nitro-L-arjinin ( <i>N-nitro-L-arginine</i> )
L-NAA	N-amino-arjinin ( <i>N-amino-arginine</i> )
L-NIL	L-N <sup>6</sup> -(1-iminoetil)-lizin ( <i>L-N<sup>6</sup>-[1-iminoethyl]-lysine</i> )
L-NIO	L-N <sup>5</sup> -(1-iminoetil)-ornitin ( <i>L-N<sup>5</sup>-[1-iminoethyl]-ornithine</i> )
L-NMMA	N <sup>G</sup> -metil-L-arjinin hidroklorür (546C88) ( <i>N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine hydrochloride</i> )
LPS	Lipopolisakkarit ( <i>lipopolysaccharide</i> )
LTA	Lipoteikoik asit ( <i>lipoteichoic acid</i> )
MAPK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz ( <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MAPKK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz ( <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i> )
MAPKKK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz kinaz ( <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i> )
MEG	2-Merkaptoetilguanidin ( <i>2-mercaptoethylguanidine</i> )
MEK1	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz 1 ( <i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i> )



MEK2	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz 2 ( <i>mitogen-activated protein kinase kinase 2</i> )
MEKK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz kinaz 1 ( <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i> )
MLCK	Miyozin hafif zincir kinazı ( <i>myosin light chain kinase</i> )
MLK	<i>Mixed lineage kinase</i>
mRNA	Haberçi ribonükleik asit ( <i>messenger RNA</i> )
MTK1	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz kinaz 4 ( <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i> )
MyD88	Miyeloit farklılaşma faktörü 88 ( <i>myeloid differentiation factor 88</i> )
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit ( <i>nicotinamide adenine dinucleotide</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> )
NMDA	N-Metil-D-aspartik asit ( <i>N-methyl-D-aspartic acid</i> )
NF-κB	Nükleer faktör-κB ( <i>nuclear factor-κB</i> )
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz ( <i>neuronal nitric oxide synthase</i> )
NO	Nitrik oksit ( <i>nitric oxide</i> )
NOS	Nitrik oksit sentaz ( <i>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>
NS-398	N-(2-sikloheksiloksi-4-nitrofenil)-metansülfonamid ( <i>N-[2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl]-methansulphonamide</i> )
OAB	Ortalama arter basıncı
ODQ	1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kinoksalin-1-on ( <i>1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one</i> )
P	İstatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi ( <i>probability</i> )
PARP	PoliADP-riboz polimeraz ( <i>polyADP-ribose polymerase</i> )
PARS	Poli (ADP-riboz) sentaz ( <i>poly [ADP-ribose] synthase</i> )

PD98059	N-Metil-4-(2-siyanofenil)piperazinil-3-metilbenzamid ( <i>N-Methyl-4-(2-cyanophenyl)piperazinyl-3-methylbenzamide</i> )
PDK	Fosfoinozotide bağımlı protein kinaz ( <i>phosphoinositide-dependent protein kinase</i> )
PDZ	<i>Postsynaptic density-95/discs large/zona occludens-1</i>
PG	Prostaglandin ( <i>prostaglandin</i> )
PGI <sub>2</sub>	Prostasiklin ( <i>prostacyclin</i> )
PI3K	Fosfoinozitol-3-kinaz ( <i>phosphoinositide-3-kinase</i> )
PIN	<i>Dynein light chain</i>
PK	Protein kinaz ( <i>protein kinase</i> )
PKG	Protein kinaz G ( <i>protein kinase G</i> )
PKB	Protein kinaz B ( <i>protein kinase B</i> )
PMCA	Plazma membranı kalsiyum/kalmoduline bağımlı Ca <sup>2+</sup> -ATPaz ( <i>plasma membrane calcium/calmodulin-dependent Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i> )
PSD	<i>Postsynaptic density</i>
SAPK	Stres ile etkinleştirilen protein kinaz ( <i>stress-activated protein kinase</i> )
SC	Subkütan ( <i>subcutaneous, subcutaneously</i> )
SDS	Sodyum dodesil sülfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SEK1	<i>SAPK/ERK kinase 1</i>
SERCA	Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPaz ( <i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i> )
siklik GMP	Siklik guanozin monofosfat ( <i>cyclic guanosine monophosphate</i> )
sitozolik FLA <sub>2</sub>	Sitozolik fosfolipaz A <sub>2</sub> ( <i>cytosolic phospholipase A<sub>2</sub></i> )
SMTs	S-metilizotiyüreler ( <i>S-methylisothioureas</i> )
SNAP	S-Nitrozo-N-asetil-penisilamin ( <i>S-nitroso-N-acetyl-penicillamine</i> )
SOD	Süperoksit dizmutaz ( <i>superoxide dismutase</i> )
SSA	Sığır serum albumini ( <i>bovine serum albumin</i> )
SSS	Santral sinir sistemi
STAT-3	<i>Signal transducer and activator of transcription-3</i>
STAT-1α	<i>Signal transducer and activator of transcription-1α</i>

TAK	Transforme edici büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz ( <i>transforming growth factor-activated kinase</i> )
TEF	Trombosit etkinleştirici faktör (platelet activating factor)
TEMED	Tetrametiletilendiamin ( <i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i> )
TGF	Transforme edici büyüme faktörü ( <i>transforming-growth factor</i> )
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tümör nekroze edici faktör ( <i>tumor necrosis factor</i> )
TRAF	TNF reseptörü ile ilişkili faktör ( <i>TNF receptor-associated factor</i> )
TRIM	1-(2-triflorometilfenil)-imidazol ( <i>1-[2-trifluoromethylphenyl]-imidazole</i> )
TTÇ	Tris tampon çözeltisi
U0126	1,4-Diamino-2,3-disiyano-1,4-bis[2-aminofeniltiyo]bütadien ( <i>1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien</i> )
UV	Ultraviyole ( <i>ultraviolet</i> )
VASP	Vazodilatör ile uyarılan fosfoprotein ( <i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i> )
VEGF	Vasküler endoteliyal büyüme faktörü ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
vynil-L-NIO	N <sup>5</sup> -(1-imino-3-butenil)-L-ornitin ( <i>N<sup>5</sup>-[1-imino-3-butenyl]-L-ornithine</i> )
W1400	N-3-aminometil-benzilasetamidin ( <i>N-3-aminomethyl-benzylacetamide</i> )
YKST	Yağsız kurutulmuş süt tozu ( <i>non-fat dry milk</i> )
yNOS	Yapısal nitrik oksit sentaz ( <i>constitutive nitric oxide synthase</i> )

## ÖZET

### Endotoksemik Sıçanlarda Ekstraselüler Sinyal ile Düzenlenen Kinaz 1/2 ve İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Yolu Aracılıklı Vasküler Hiporeaktivitenin Mekanizmalarının Araştırılması

Bu çalışmada, seçici indüklenebilir nitrik oksit (NO) sentaz (iNOS) veya ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2) inhibitörü uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen torasik aortada oluşabilecek (1)  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki değişikliklere çözünebilir guanilil siklaz (çGS) ve protein kinaz G (PKG)'nin katkısının olup olmadığı ve (2) gelişebilecek kaspaz-3 ile ilişkili apoptotik/antiapoptotik olaylarda NO/siklik guanozin monofosfat yolunun katkısının olup olmadığı araştırıldı. *In vivo* çalışmalarda kontrol grubu olarak serum fizyolojik ve endotoksik şok grubu olarak endotoksin (ET), deney grubu olarak da tek başına veya ET ile birlikte seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz 1 (MEK1) tarafından ERK1/2 fosforilasyonun seçici inhibitörü U0126 uygulanan sıçanlar kullanıldı. Serum fizyolojik veya ET enjeksiyonundan önce ve birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerde ortalama arter basıncı ve kalp hızı kayıtları alındı. Deneyler sonunda sıçanlar öldürülerek kan ve torasik aortaları alındı. Alınan kandan hazırlanan serum örneklerinde nitrit ve nitrat düzeyleri ölçüldü. Vasküler kontraktile çalışmalarda endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta kapalı halka preparatları kullanıldı. Ortamda seçici çGS inhibitörü ODQ ya da seçici PKG inhibitörü KT5823 yokluğunda ve varlığında noradrenalin ile kümülatif derişim-yanıt eğrileri çıkarıldı. Doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda MEK1, ERK1/2, iNOS, çGS ve PKG protein ekspresyonu ve etkinliği özgül antikorlar veya kitler kullanılarak ölçüldü. Bu çalışmanın bulguları (1) endotoksemik sıçanlardan izole edilen torasik aortada etkinliği artan MEK1'in ERK1/2'yi etkinleştirmesinin ardından iNOS protein ekspresyonu ve etkinliği ile çGS ve PKG enzimlerinin etkinliğindeki artmanın  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya katkıda bulunduğunu ve (2) MEK1/ERK1/2/iNOS/çGS/PKG yolundaki enzimlerin etkinliğindeki artmanın apoptotik olaylarda rol oynayan enzimlerden biri olan kaspaz-3 etkinliğinde azalmaya neden olabileceğini gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** Endotoksin, hipotansiyon, vasküler hiporeaktivite, apoptoz, MEK1, ERK1/2, iNOS, çGS, PKG, sıçan, torasik aorta

## ABSTRACT

### Investigation of mechanisms of vascular hyporeactivity mediated by extracellular signal-regulated kinase 1/2 and inducible nitric oxide synthase pathway in endotoxemic rats

In this study, it was investigated whether (1) soluble guanylyl cyclase (sGC) and protein kinase G (PKG) contribute to the alterations in  $\alpha$ -adrenergic receptor-mediated contractions in thoracic aorta isolated from endotoxemic rats treated with selective inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS) or extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) inhibitor and (2) NO/cyclic guanosine monophosphate pathway contributes to caspase-3-mediated apoptotic/antiapoptotic events. In *in vivo* studies, saline and endotoxin (ET)-injected rats were used as control and endotoxic shock groups, respectively. Rats treated with a selective iNOS inhibitor, 1,3-PBIT, and a selective inhibitor of ERK1/2 phosphorylation by MEK1, U0126, alone or in combination with ET were used as experimental groups. Mean arterial pressure and heart rate were measured from rats received either saline or ET at time 0, 1, 2, 3 and 4 h. At the end of the experiments, rats were sacrificed and blood and thoracic aortas were collected. Sera obtained from the blood samples were used for measurement of nitrite and nitrate levels. Endothelium-intact and endothelium-denuded thoracic aortas were used in vascular contractility experiments. Contractile responses of the rings were determined by addition of cumulative concentrations of norepinephrine in the absence and presence of a selective sGC inhibitor, ODQ, or a selective PKG inhibitor, KT5823. MEK1, ERK1/2, iNOS, sGC and PKG protein expression and activity were measured in the supernatants prepared from tissue homogenates by using specific antibodies or kits. The results of the study demonstrated that (1) increased activity of sGS and PKG enzymes following by an increase in iNOS protein expression and activity by MEK1/ERK1/2 pathway contributed to the alterations in  $\alpha$ -adrenergic receptor-mediated contractions in the thoracic aorta isolated from endotoxemic rats, and (2) an increase in the activity of the enzymes involved in MEK1/ERK1/2/iNOS/sGC/PKG pathway would cause a decrease in the activity of caspase-3, one of the enzymes having a role in apoptotic events.

**Keywords:** Endotoxin, hypotension, vascular hyporeactivity, apoptosis, MEK1, ERK1/2, iNOS, sGS, PKG, rat, thoracic aorta

# 1. GİRİŞ

Sepsis, enfeksiyon ve bu enfeksiyona karşı oluşan sistemik yangılı (inflamatuvar) yanıt sendromunun birlikte görüldüğü klinik bir sendromdur. Septik şok ise septik hastalarda gözlenebilen dirençli arteriyal hipotansiyon ile belirgin bir sendrom olarak tanımlanmaktadır (1). Sepsisli insan ve hayvanlarda ölüm nedeni olarak, akciğer ve böbrek zedelenmesi, miyokart depresyonu, vazopresör maddelere karşı yanıtsız kalan periferik vazodilatasyonun neden olduğu refrakter hipotansiyon veya çoklu organ yetersizliği görülmektedir. Yoğun bakım birimlerinde septik şok nedeni ile görülen mortalitenin yüksek olduğu bilinmektedir. Antimikrobiyal tedavi ve hemodinamik desteğin yetersiz kaldığı sepsis tedavisindeki gelişmelerin yavaş ilerlemesinin nedenleri olarak, septik şok patojenezinin pek çok mediyatörün katkısı nedeni ile karmaşık olması, mediyatörlerin birbirleri ile etkileşmeleri, semptomlar ve prognozun bireyler arasında değişkenlik göstermesi sayılmaktadır (2-12). Son bir kaç yılda yapılan çalışmalar, endotoksin (ET)'nin konakçıda tetiklediği sinyal ileti mekanizmalarının ve etkinleştirdiği çoğu enzim sisteminin düzenlenmesine dayanan nedene yönelik ve moleküler düzeyde özgül terapötik yaklaşımlar üzerinde yoğunlaşmıştır (2, 13-22).

Septik şok patofizyolojisinde çeşitli yangı gelişmesinde rolü olan enzimlerin genlerin ekspresyonunda transkripsiyonel düzeyde değişiklikler ortaya çıkmaktadır. *Escherichia coli* (*E. coli*) gibi Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan ve ET olarak da adlandırılan (23) lipopolisakkarit (LPS)'ye maruziyet sonucunda konakçıda çeşitli yangıya neden olan (proinflamatuvar) sitokinler, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (MAPK)'lerin bulunduğu çeşitli sinyal ileti yollarının uyarılmasının ardından, nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin etkinleşmesine ve sonuçta indüklenebilir nitrik oksit (NO) sentaz (iNOS), siklooksijenaz (COX), sitozolik fosfolipaz A<sub>2</sub> (sitozolik FLA<sub>2</sub>) ve 5-lipoksijenaz (5-LO) gibi enzimlerin oluşumunda artışa ve böylece vazodilatör mediyatörler olan NO ile prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) ve PGE<sub>2</sub> gibi prostaglandinlerin aşırı miktarlarda oluşumuna neden

olmaktadır. Oluşumu artan bu vazodilatör metabolitlerin yanı sıra, sitozolik FLA<sub>2</sub> enziminin de katkıda bulunduğu arakidonik asitten sitokrom P450 (CYP) yolu ile oluşan 20-hidroksieikozatetraenoik asit (20-HETE) gibi vazokonstriktör ürünlerin oluşumunun azalması ve epoksieikozatrienoik asit (EET)'ler gibi vazodilatör ürünlerin oluşumunun artması da kardiyovasküler sistemin baskılanmasına neden olmaktadır (1, 2, 19, 24-29). Sonuç olarak, septik şok patojenezinde vazodilatör/vazokonstriktör denge vazodilatör metabolitlerin oluşumunun artışı yönünde bozulmuştur. Bozulan bu dengenin yeniden kurulması için de ürünler ve/veya enzimler düzeyinde birbirlerinin oluşumlarını ve/veya etkilerini önleyecek biçimde etkileşimler de görülmektedir (30-34). Bütün bu olaylar sepsiste vazokonstriktör tedaviye karşın geri çevrilemeyen vasküler hiporeaktiviteyi açıklamaktadır.

Endotoksemik sıçanlarda *in vivo* olarak yaptığımız çalışmaların sonuçlarına göre (35-42), 10 mg/kg intraperitoneal (IP) dozda ET enjeksiyonu ile oluşturulan endotoksemi sırasında ortalama arter basıncı (OAB) düşmekte, kalp hızı (KH) artmakta ve dört saat sonra iNOS ve indüklenabilir siklooksijenaz (COX-2) etkinliğindeki artış ile birlikte aynı zamanda renal CYP 4A1/A3 proteinleri ve CYP 4A etkinliği azalmaktadır. ET'nin neden olduğu bu değişiklikler, ayrıca, serum, böbrek, kalp, torasik aorta ve/veya süperiyor mezenterik arterde eNOS protein ekspresyonu, 20-HETE düzeyleri ve antioksidan enzim etkinliklerinde azalma olduğu kadar, iNOS protein ekspresyonu ile nitrit, nitrotirozin ve prostaglandin düzeylerinde artma ile birlikte. iNOS ve/veya COX-2 enzimlerinin inhibisyonu ile de antioksidan enzimlerin etkinliği ve nitrotirozin düzeyleri olduğu kadar, renal CYP 4A protein düzeyi ve CYP 4A etkinliği normal düzeylere getirilebilmekte ve güçlü bir vazokonstriktör olan 20-HETE oluşumunun artması ile OAB ve KH'deki değişiklikler düzelmektedir. Ayrıca, ET torasik aorta ve süperiyor mezenterik arterde noradrenaline karşı vasküler hiporeaktivite gelişmesine, asetilkolin ve gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtlarında azalmaya neden olmaktadır. ET ile olan OAB, KH, vasküler kontraktilete, endotele bağımlı ve endotelden bağımsız gevşeme yanıtları ile serum ve/veya doku iNOS protein ekspresyonu, antioksidan enzimlerin etkinliği ile 20-HETE, nitrit, nitrotirozin ve prostaglandin düzeylerindeki bu değişiklikler, dayanıklı bir 20-HETE analogu olan N-[20-hidroksieikoz-5(Z),14(Z)-dienoil]glisin (5,14-HEDGE) (30 mg/kg, SC), seçici

olmayan COX inhibitörü indometasin, COX-1 inhibitörü piroksikam veya COX-2 inhibitörü N-(2-sikloheksiloksi-4-nitrofenil)-metansülfonamid (NS-398) ile önlenilmekte, 5,14-HEDGE'nin iNOS protein ekspresyonu dışındaki bütün bu etkileri ise, 20-HETE'nin vazokonstriktör etkilerinin yarışmalı bir antagonisti olan 20-hidroksieikoza-6(Z),15(Z)-dienoik asit (WIT002; 20-HEDE) (30 mg/kg, SC) ile geri çevrilebilmektedir. Bulgularımız, endotoksemi sırasında NOS, COX ve CYP 4A yolları ile antioksidan enzimler arasında etkileşmeler olduğunu, prostaglandinlerin renal iNOS protein düzeyi ve NO oluşumunu artırdığını, ancak CYP 4A1/A3 protein düzeyi ile CYP 4A etkinliğini azalttığını, aşırı miktarlarda oluşan NO'nun renal ve/veya vasküler dokularda eNOS, CYP 4A protein ekspresyon ve etkinliği ile antioksidan enzimlerin etkinliğini baskıladığını, 20-HETE'nin de NO, peroksinitrit ve prostaglandin oluşumunu önlediğini ve antioksidan enzimlerin etkinliğinin yeniden sağlanmasına katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Sıçan izole torasik aortasında *in vitro* olarak yaptığımız bir çalışmada (43),  $\alpha$ -adrenajik reseptör aracılıklı kasılma yanıtları üzerinde ET'nin oluşturduğu etkilere iNOS, sitozolik FLA<sub>2 $\alpha$</sub> , COX-2 ve ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2) enzimlerinin katkısı araştırılmıştır. Bu çalışmanın bulguları, torasik aorta preparatlarının ET ile dört saat inkübasyonu sonucunda noradrenalin ile elde edilen derişim-yanıt eğrilerinin sağa kaymasından, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde ET'nin etkisi ile mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz 1 (MEK1) ve ardından ERK1/2'nin etkinleşmesi sonucunda ekspresyon ve etkinliği artan iNOS ve ondan oluşan NO ile sitozolik FLA<sub>2 $\alpha$</sub> /COX-2 etkinliğinin artması ile oluşan prostaglandinlerin sorumlu olabileceğini göstermiştir. Bu bulgulara dayanarak yaptığımız *in vivo* çalışmaların sonuçlarına göre ise bulgularımız (42, 44), ET enjeksiyonundan dört saat sonra OAB'de azalma, KH'de artma ile serum, torasik aorta ve/veya süperiyor mezenterik arter nitrit ve nitrotirozin düzeylerindeki artış ve antioksidan enzimlerin etkinliğindeki azalma ile birlikte olan değişikliklerin, seçici iNOS inhibitörü fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyoüre) dihidrobromür (1,3-PBIT) (10 mg/kg, IP) ile olduğu kadar, MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien (U0126) (5 mg/kg, IP) ile önlenbilmiştir. Bu çalışmalarımızın bir başka önemli bulgusu ise, torasik aortada ET ile artan ERK1/2

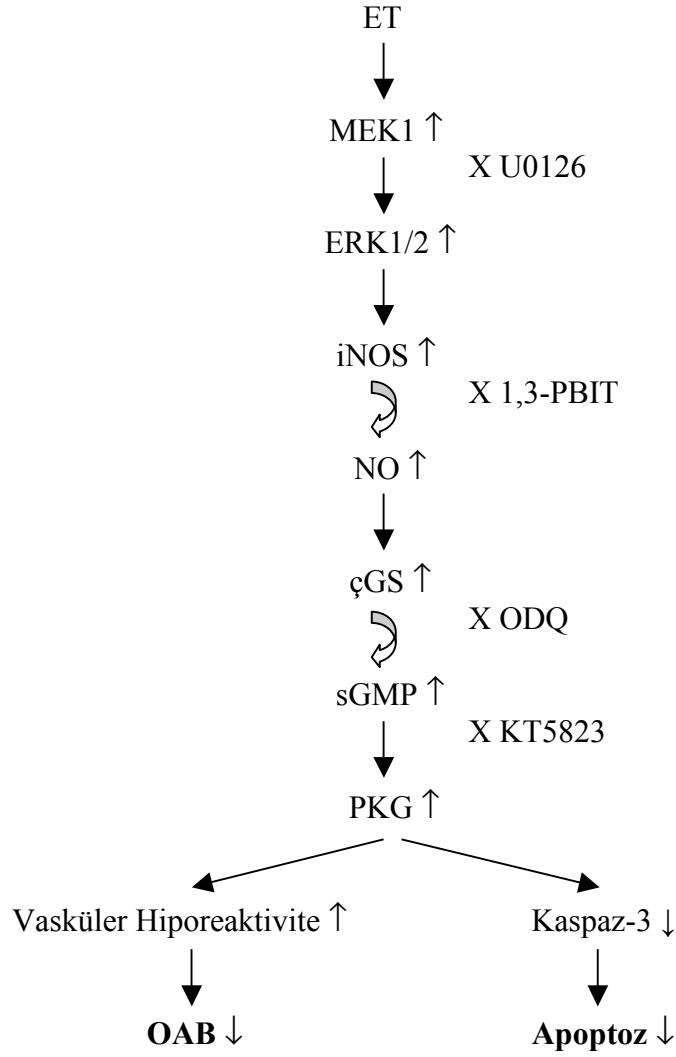


etkinliğinin U0126 ile önlenebilmesidir. Bu sonuçlar, MEK1/ERK1/2 yolunun sistemik/doku düzeyinde iNOS aracılığı ile NO ve peroksinitrit oluşumunu artırarak ET ile oluşan hipotansiyona katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Hücre ölümünün nekrotik veya apoptotik mekanizmalardan biri ile olduğu bilinmektedir. Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü gereksiz, yaşlanmış veya zedelenmiş hücrelerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan mekanizmalar ile sıkı bir biçimde düzenlenmektedir. Apoptotik olayların biyokimyasal temel özellikleri arasında bir dizi kaspaz ailesi proteazlarının etkinleşmesi ve mitokondriyal sitokrom c'nin sitozole saliverilmesi bulunmaktadır. Öte yandan, hücre nekrozu fizyolojik olmayan kemoterapötikler gibi uyarılar ile tetiklenen, enerji veya protein ve nükleik asit sentezini gerektirmeyen ve düzenlenmesi olmayan pasif bir olaydır. NO'nun ise derişimine ve hücre türüne göre göre değişen biçimde proapoptotik ve antiapoptotik etkilerinin olduğu bilinmektedir (45-48). iNOS indüksiyonunu baskılayan ve etkinliğini önleyen maddelerin ET ile oluşan endotelial apoptozu önlediği gösterilmiştir (49, 50). NO aracılığı ile gelişen apoptozda hücreye özgü duyarlılığı etkileyen etkenlerin, hücre içindeki redoks durumu ve kaspazlar gibi apoptotik sinyal kaskadının etkinleşmesi, mitokondriyal sitokrom c saliverilmesi veya hücre canlılığı ve apoptotik gen regülasyonu ile birlikte olabileceği düşünülmektedir. NO ile oluşan apoptozu karşı hücrel duyarlılığı açıklayabilen yeterli bir mekanizma henüz bulunmamasına karşın, NO'nun proapoptotik etkilerinin bazılarının çözünebilir guanilil siklaz (çGS)'nin etkinleşmesi sonucunda siklik guanozin 5'-monofosfat (siklik GMP) oluşumundaki artmaya bağlı olarak ortaya çıktığı ve bu olayda protein kinaz (PKG)'nin de önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (51). Öte yandan, NO tümör nekroze edici faktör (TNF)- $\alpha$  (52), oksidatif stres (53), serum deprivasyonu (54) ve anoksi (55) gibi çeşitli uyarılar ile oluşan apoptozdan bazı hücreleri korumaktadır. Bu bulgular, NO'nun bazı hücre türleri ve deneysel koşullarda *in vitro* ve *in vivo* olarak apoptozu önlediğini göstermektedir. Ayrıca, hücre türüne ve apoptotik uyarıya göre değişen bir biçimde demir-sülfür kompleksleri, çGS, kaspazlar ve glutatyon gibi bazı moleküler hedeflerin NO'nun antiapoptotik etki mekanizmasında rol oynadığı düşünülmektedir (45-48, 56). NO'nun siklik GMP oluşumunu artırarak hepatositler (57), nöronal PC12 hücreleri (58), embriyonik motor sinirler (59), B lenfositleri (60) ve over folikülleri (61) gibi bazı

hücre türlerinde de apoptozu önlediği bildirilmiştir. Ancak, NO'nun antiapoptotik etkisinin başka hücrelerde çGS inhibitörü 1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kinoksalin-1-on (ODQ) ile önlenemediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Siklik GMP analoğu 8-bromo-sGMP de NO'nun etkisinden hücreleri koruyamamaktadır (62). Bu bulgular, NO'nun antiapoptotik etki mekanizmalarının hücreye özgü bir biçimde siklik GMP'ye bağımlı ve siklik GMP'den bağımsız olmak üzere iki değişik biçimde olabileceğini göstermektedir. Günümüzde, NO'nun proapoptotik ve antiapoptotik etkilerinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve patofizyolojik öneminin belirlenmesi ile, apoptozda değişiklik olduğu bilinen sepsis ve septik şok, ateroskleroz, irradyasyon ile oluşan doku zedelenmesi ve hipoksi ile oluşan sinirsel hücre ölümü gibi durumlar için yeni terapötik yaklaşımlar yapılabileceğine inanılmaktadır (25, 45, 46, 48, 63).

Endotoksemik hayvan (64-68) ve insanlarda (69-72) p38 MAPK inhibitörlerinin hipotansiyon ve vasküler hiporeaktivitenin de eşlik ettiği sepsis ve septik şok gibi yangı ile belirgin hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceğinin bildirildiği pek çok çalışma bulunmaktadır. Öte yandan, bu hastalıkların patojenezinde önemli rol oynadığı bilinen NO ile ilişkili olayları tetikleyen MEK1/ERK1/2 yolunun önemini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Şekil 1.1'de de özetlendiği gibi bu tez çalışmasında (1) seçici iNOS veya ERK1/2 inhibitörü uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen torasik aortada oluşabilecek  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki değişikliklere çGS ve PKG'nin katkısının olup olmadığı ve (2) seçici iNOS veya ERK1/2 inhibitörü uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen torasik aorta endotel ve/veya düz kas hücrelerinde gelişebilecek kaspaz-3 ile ilişkili apoptotik/antiapoptotik olaylarda NO/siklik GMP yolunun katkısının olup olmadığı araştırılmıştır.



**Şekil 1.1.** ET ile oluşan MEK1/ERK1/2/iNOS/çGS/PKG yolu aracılıklı hipotansiyon, vasküler hiporeaktivite ve apoptozun moleküler mekanizmalarının araştırılmasında kullanılan araştırma protokolü. *1,3-PBIT*, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür; *çGS*, çözünebilir guanilil siklaz; *ERK1/2*, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz 1/2; *ET*, endotoksin; *GMP*, guanozin monofosfat; *iNOS*, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; *KT5823*, (9*S*,10*R*,12*R*)-2,3,9,10,11,12-hekzahidro-10-metoksi-2,9-dimetil-1-okso-9,12-epoksi-1*H*-diindolo-[1,2,3-*fg*:3',2',1'-*kl*]pirrolo[3,4-*i*][1,6]-benzodiazosin-10-karboksilik asit metil ester; *ODQ*, 1*H*-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-*a*]kinoksalin-1-on; *MEK1*, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz 1; *NO*, nitrik oksit; *PKG*, protein kinaz G; *OAB*, ortalama arter basıncı; *U0126*, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiy)butadien.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Septik Şok

#### 2.1.1 Epidemiyolojisi

Sepsis ve septik şoka neden olan Gram-negatif bakterilerin başında *E. coli* gelmektedir (73, 74). Gram-negatif bakteremisi olan hastaların büyük bir kısmında sepsis gelişmektedir. Gram-negatif bakterilerin sepsis oluşturma olasılıkları %50 olmasına karşın, Gram-pozitif bakterilerin sepsis oluşturma özellikleri %25'tir. Fungal, viral ve protozoal enfeksiyonlar da sepsis ve septik şoka neden olabilmektedir (75). Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 700.000 kadar sepsis olgusu ve ortalama %30'luk bir mortalite oranı görülmektedir (76). Sepsisin yıllık görülme sıklığı ise her 100.000'de 50-95 olgu olarak görülmekte ve bu görülme sıklığı her yıl %9 oranında artmaktadır (77). Sepsis için yapılan hastane başvuruları tüm başvuruların %2'sini oluşturduğu, sepsisli hastaların yaklaşık %9'unda şiddetli sepsis, şiddetli sepsis hastalarının %3'ünde ise septik şok geliştiği bildirilmiştir (78). Yoğun bakım birimlerinde bulunan hastaların yaklaşık %10'luk bir bölümünü de septik şoklu hastalar oluşturmaktadır. Septik şokun görülme sıklığı altmışlı yaşlarda pik yapmaktadır (79). Kanser, bağışıklık sisteminin yetersizliği, süregen organ yetersizliği ve genetik etkenler de septik şokun oluşmasını artıran etkenler arasında yer almaktadır (80).

### 2.1.2 Etiyolojisi

Şok, vücudun yaşamsal organlara ve dokulara yeterli kan ve oksijenin sağlanamaması sonucu yaşamı tehdit eden bir durum olarak tanımlanmaktadır. Şokun başlıca türleri arasında septik şok, hemorajik şok, travmatik şok, kardiyojenik şok, nörojenik şok ve anafilaktik şok bulunmaktadır. Sepsis ve septik şok, genellikle Gram-negatif bakterilerin neden olduğu, kanda vazopresör katekolamin düzeylerinin artmasına karşın, vazokonstriktör maddelere karşı hiporeaktivite ve kan basıncında ileri derecede bir düşmenin eşlik ettiği, mikrosirkülatuvar işlev bozukluğu ile birlikte akciğer, karaciğer, böbrek ve beyin gibi yaşamsal organlarda doku perfüzyonu ve oksijen kullanımında bozulma sonucu bu organların işlevlerinde bozukluk ve ardından ölümün görüldüğü karmaşık bir sistemik yangılı yanıttır. Sepsisli insan ve hayvanlarda ölüm nedeni olarak, akciğer ve böbrek zedelenmesi, miyokart depresyonu, vazopresör maddelere karşı yanıtızsız kalan periferik vazodilatasyonun neden olduğu refrakter hipotansiyon veya çoklu organ yetersizliği görülmektedir (2-12). Konakçıda enfeksiyona maruziyet ile başlayan ve çoklu organ yetersizliğine kadar gidebilen durumların tanımı 1992'de *Society of Critical Medicine Consensus Conference*'da yapılmıştır (81) (Çizelge 2.1).

Septik şokun ortaya çıkmasından yirmi dört-kırk sekiz saat sonra ölüm oranının hızla artmasına karşın, şiddetli sepsisin ortaya çıkmasından yedi-on dört gün sonra çoklu organ yetmezliği gelişebilmektedir (82).

**Çizelge 2.1.** Sepsis ve septik şok ile ilgili tanımlar.

---

<b>Enfeksiyon</b>	Normalde steril olan konakçıda mikroorganizmanın varlığı veya mikroorganizmanın yayılmasına karşı verilen yangılı yanıt ile belirgin mikrobiyal durum.
<b>Bakteriyemi</b>	Kanda canlı bakteri bulunması durumu.
<b>Sistemik yangılı yanıt sendromu</b>	Şiddetli klinik belirtiler ile kendini gösteren sistemik yangılı yanıt. Sayılan durumlardan en az ikisi olmalı: Sıcaklık > 38 °C veya < 36 °C; kalp hızı > 90 atım/dk; solunum hızı ≥ 20 solunum/dakika veya Pa <sub>CO2</sub> < 32 torr (< 4.3 kPa); lökosit > 12.000 hücre/mm <sup>3</sup> veya > %10 olgunlaşmamış hücre.
<b>Sepsis</b>	Enfeksiyona verilen sistemik yanıt. Enfeksiyona yanıt olarak sayılan durumlardan en az ikisi olmalı: Sıcaklık > 38 °C veya < 36 °C; kalp hızı > 90 atım/dk; solunum hızı ≥ 20 solunum/dk veya Pa <sub>CO2</sub> < 32 torr (< 4.3 kPa); lökosit > 12.000 hücre/mm <sup>3</sup> veya > %10 olgunlaşmamış hücre.
<b>Şiddetli sepsis</b>	Organ işlev bozukluğu, hipoperfüzyon veya hipotansiyon ile birlikte olan sepsis. Hipoperfüzyon ve perfüzyon anormallikleri, her zaman değil ise de, laktik asidoz, oligoüri veya mental durumda iyeğin bir değışiklik ile birlikte görülebilir.
<b>Septik şok</b>	Yeterli sıvı resüsitasyonuna karşın hipotansiyon ve perfüzyon anormalliklerinin de birlikte olduğu sepsis. Her zaman değil ise de, laktik asidoz, oligoüri veya mental durumda iyeğin bir bir değışiklik ile birlikte görülebilir. İnotropik veya vazopresör ilaçları kullanan hastalar perfüzyon anormalliklerinin ölçüldüğü sırada hipotansif olmayabilirler.
<b>Hipotansiyon</b>	Sistolik kan basıncının 90 mmHg'den düşük olması veya hipotansiyona neden olabilecek bir durum olmamasına karşın, kan basıncında normalden 40 mmHg'den daha çok bir azalma olması durumu.
<b>Çoklu organ yetersizliği</b>	Girişim ile homeostazın sağlanamadığı hastalarda organ işlevlerinin değışmesi.

---

### 2.1.3 Patofizyolojisi

Sepsis patofizyolojisinde bazı önemli olaylar gelişmektedir. Bunlardan birincisi monosit, makrofaj, nötrofil ve endotel hücrelerinin sepsise karşı yanıtın başlatılması ve sürdürülmesinde önemli rol oynamasıdır (83-88). Sepsis patofizyolojisinde yer alan öteki önemli olaylar ise yangı ve koagülasyon olaylarının başlamasıdır (89). Yangı ve koagülasyon olayları bir kez başladığında birbirleri ile etkileşerek konakçının sepsise karşı olan yanıtını güçlendirirler; örneğin, yangının gelişmesine neden olan mediyatörler, dolaşımda bulunan monositlerin, doku makrofajlarının, nötrofillerin ve endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan doku faktörünün ekspresyonunu indükleyerek koagülasyon olayını artırabilmektedirler (90-96). Yangının başlaması ile birlikte sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri, reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi mediyatörlerin aşırı ve kontrolsüz bir biçimde oluşumunun artması sepsisin patofizyolojisine katkıda bulunmaktadır. Sepsiste oluşumları artan TNF- $\alpha$ , interlökin (IL)-1 ve interferon (IFN)- $\gamma$  gibi yangının başlamasına aracılık eden sitokinlerin yanı sıra, IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi yangı oluşmasını önleyen (antiinflamatuvar) sitokinlerin de oluşmasına karşın, yangının başlamasına aracılık eden mediyatörler sepsis patofizyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır (97).

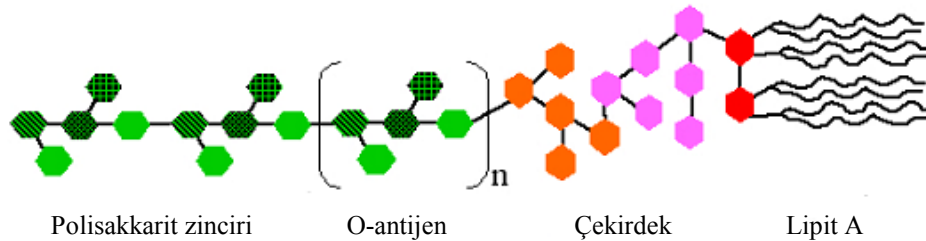
Sepsiste çeşitli metabolik değişiklikler de görülmektedir. Karbonhidrat metabolizması ile ilgili olarak hücre içine glukoz alımı, glikoliz, insülin direnci ve glikoneojenez artarken, lipit metabolizması ile ilgili olarak lipolitik etkinlik ve karaciğere yağ infiltrasyonu artarken, ketojenaz azalmaktadır. Protein metabolizmasında ise protein katabolizması, ıveğen faz proteinlerinin sentezi artarken, homeostaz da rol oynayan albumin gibi proteinlerin sentezi ise azalmaktadır (1).

Sepsiste kardiyovasküler sistemin işlevleri de bozulur. Septik şokta kalp atım hızı ve kalp debisi genellikle artmaktadır. Sistemik damar direnci, arteriyel gerimin azalmasından dolayı azalmış durumdadır, buna karşın pulmoner damar direnci artmıştır. Kalp debisindeki artışa karşın, doku hipoperfüzyonu, kanda laktat derişiminin artışı ile belirgindir. Damar gerimindeki azalma arteriyel ve venöz dolaşımı etkilemektedir. Arteriyel gerim, sistemik hipotansiyona yol açacak kadar azalmıştır. Geniş kapasitans

damarlarında gerimin azalması venöz göllenmeye neden olmaktadır. Arteriyel ve venöz gerimdeki değişiklikler damar yatakları arasında değişkenlik gösterdiğinden, bu durum kan akımının ve hacminin eşit olmayan bir biçimde dağılımına neden olmaktadır. Hipovolemi, septik şoktaki başlıca hemodinamik değişikliklerden biridir. Septik şoklu birçok hastada miyokardiyal işlev bozukluğu da görülmektedir (75). Sepsiste hücre içinde kalsiyum derişiminde belirgin bir artış olduğunun bilinmesine karşın, hiporeaktivite gelişmektedir; bu durumda da kalsiyum duyarlılığında bir sorun söz konusu olabilir (98).

Her ne kadar Gram-negatif aerobik basilin endotoksini, bakteriyel toksinler arasında en iyi çalışılmış olanı da olsa, öteki bakteriyel ürünler de mediyatör yanıtı başlatabilmektedir. Bunlar arasında formil peptitler, endotoksinler, proteazlar, hemolizin peptidoglikanlar ve Gram-pozitif organizmaların lipoteikoik asit (LTA)'larıdır. LPS, yalnızca Gram-negatif bakterilerde bulunurken, LTA yalnızca Gram-pozitif bakterilerde bulunmaktadır (85).

Gram-negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan LPS, moleküle polar ve amfipatik özelliklerini kazandıran üç değişik bölgeden oluşmaktadır (Rietschel ET ve ark 1994). Bu bölgeler; lipit A, çekirdek oligosakkarit ve yineleyen polisakkarit zincirlerindedir. Dış kısmında bulunan O-antijen yapısının bakteri türlerine bağlı olarak antijenitesi bulunmaktadır. Orta kısımda yer alan çekirdek bölge daha az antijenik değişiklik göstermektedir. En içteki bölgede ise lipit A yapısı bulunmaktadır (83) (Şekil 2.1).

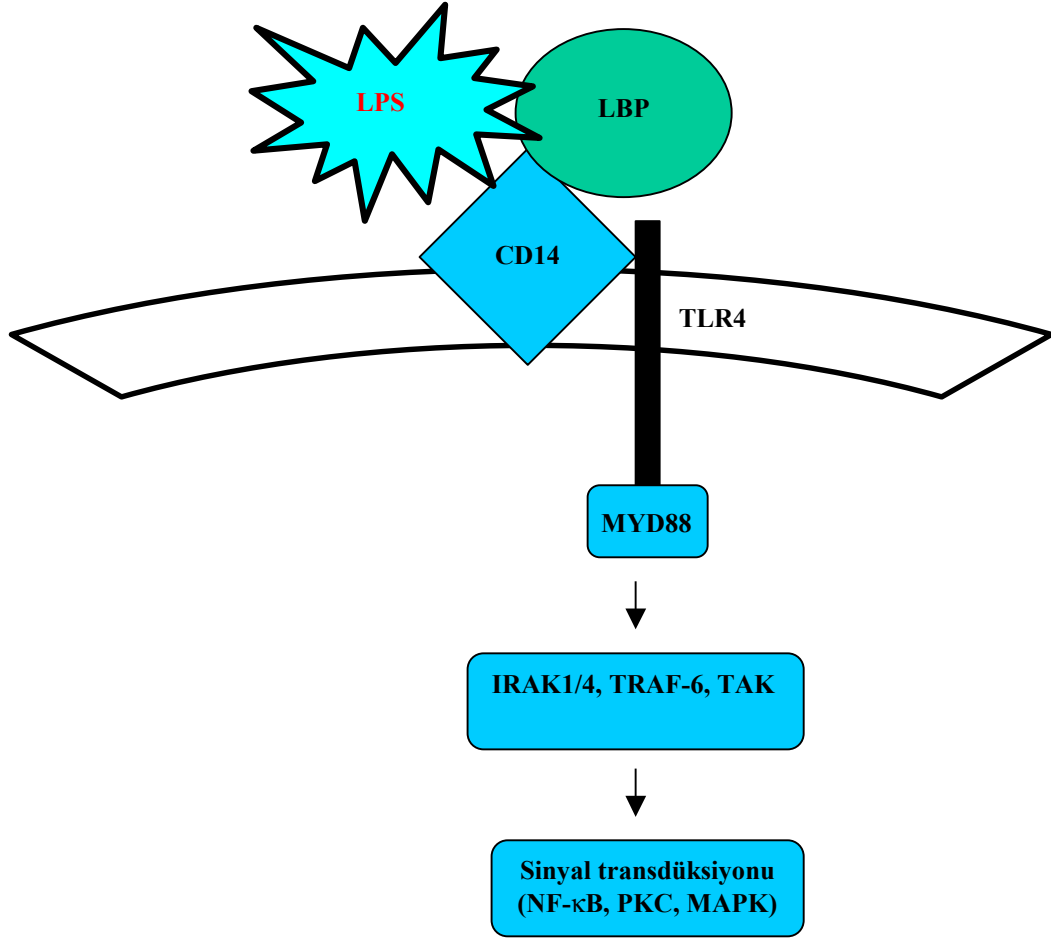


Şekil 2.1. LPS'nin yapısı. LPS, lipopolisakkarit.



Lipit A, yüksek derecede immünreaktiftir ve Gram-negatif sepsiste gözlenen toksik etkilerin birçoğundan sorumludur. Lipit A'nın başlıca etkisi, makrofajları etkinleştirmesi ve yangıya neden olan olayları tetiklemesidir. Monositler, makrofajlar, nötrofiller ve endotel hücreleri enfeksiyona karşı gelişen yanıtta önemli rol oynarlar; ayrıca, bu hücrelerde LPS için reseptörler bulunur. *Cluster of differentiation* (CD)14 ve *Toll-like receptor* (TLR)4 bütün bakteriyi veya LPS gibi bakteriyel ürünleri tanıyan ve onlara bağlanan hücre yüzeyindeki reseptörlerdir. TLR'ler lösin yinelenmesi bulunan ekstraselüler zincir ve IL-1 reseptörü ile homoloji gösteren sitoplazmik kısmı olan bir reseptördür. TLR'lerin insanlarda yaklaşık on değişik türü olduğu bildirilmiştir (80). Monositler, makrofajlar, nötrofiller ve endotel hücrelerinde bulunan TLR4, LPS ile başlayan sinyal ileti olaylarında yer almaktadır. CD14 reseptörlerinin membrana bağlı ve çözünebilir olmak üzere iki alt türü bulunmaktadır ve her ikisi de LPS ile etkileşmektedir. Glikozil fosfotidilinozitle bağlı hücre yüzey molekülü olan membrana bağlı CD14 monositler, makrofajlar ve nötrofillerde bulunmaktadır. CD14'ün plazmada bulunan çözünebilir türü ise, insanları da içeren memelilerin serumunda  $\mu\text{M}$  derişimde bulunmaktadır. Çözünebilir CD14, LPS ve öteki bakteriyel ligantlara bağlanmaya ve endotel ve epitel hücreler gibi CD14 taşımayan hücrelerin uyarılmasına aracılık etmektedir (87, 88).

LPS, lipit bağlayıcı protein (LBP) adı verilen yaklaşık 55 kDa molekül ağırlığında ve hepatositler tarafından sentezlenen bir protein ile etkileşmektedir. Bu kompleks daha sonra makrofaj yüzeyindeki LPS reseptörlerinden CD14 ile etkileşir. CD14'ün kendisi sinyal iletiyi başlatamamaktadır. LBP-LPS kompleksinin CD14'e bağlanması TLR4'ün etkinleşmesine neden olmaktadır. TLR4'ün etkinleşmesinin ardından miyeloid farklılaşma faktörü (MyD)88 adaptör proteinleri, IL-1 reseptörü ile ilişkili kinaz-1 (IRAK)1/4, TNF reseptörü ile ilişkili faktör (TRAF)-6 ve transforme edici büyüme faktörü (TGF) ile etkinleştirilen kinaz (TAK) gibi kinazlar aracılığı ile PKC ve NF- $\kappa$ B gibi transkripsiyon faktörlerinin indüksiyonu gerçekleşmektedir (97).



**Şekil 2.2.** LPS'nin TLR'lerden TLR2/TLR4 reseptörleri aracılığı ile oluşan sinyal ileti yolu. *CD*, cluster of differentiation; *IRAK1/4*, *IL-1* reseptörü ile ilişkili kinaz-1/4; *LBP*, LPS bağlayıcı protein; *LPS*, lipopolisakkarit; *MAPK*, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz; *MyD*, miyeloid farklılaşma faktörü; *NF-κB*, nükleer faktör-κB; *PKC*, protein kinaz C; *TAK*, transforme edici büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz; *TLR*, toll-like receptor; *TRAF*, tümör nekroze edici faktör reseptörü ile ilişkili faktör.

Etkinleşen NF-κB çekirdeğe geçmeden önce etkin olmayan durumda kalmasını sağlayan IκB molekülünden ayrılmaktadır. Çekirdeğe geçen NF-κB, çok sayıda yangıya neden olan enzimlerin genlerinin transkripsiyonel düzeyde ekspresyonlarının artmasına neden olabilmektedir. Bu genlerin arasında sepsis patofizyolojisinde önemli rol oynayan iNOS, COX-2, FLA<sub>2</sub>, 5-LO, çeşitli sitokin ile kemokinler ve akut faz proteinleri yer almaktadır (97).

#### 2.1.4 Tedavisi

Sepsis tedavisinin başlıca hedefleri arasında patojenin zamanında tanımlanması, enfeksiyon kaynağının yok edilmesi, antimikrobiyal tedavi, septik şoka neden olabilecek olaylar zincirinin engellenmesi ve organlardaki işlev bozukluğunun düzeltilmesi bulunur. Septik şokun olağan tedavisi ile bilgiler Çizelge 2.2'de verilmiştir (99-101).

Septik şoklu hastaların yaklaşık yarısının ölüm nedeni çoklu organ yetmezliği olduğu için, hemodinamik destek oldukça önemlidir. Hemodinamik destek sıvı tedavisi, vazopresör tedavi ve inotropik tedavi olarak üç türde yapılabilir. Sıvı tedavisi tek başına kan basıncını ve organ perfüzyonunu düzeltemediği zaman dopamin, dobutamin, noradrenalin, adrenalin ve fenilefrin gibi vazopresör ve inotropik ilaçlar kullanılmalıdır. Dopamin ve dobutamin gibi inotropik ilaçlar kalp debisindeki bozukluğu genellikle düzeltirler; vazopresörler, inotropik tedaviye karşın ortalama kan basıncı düzelmiyor ise kullanılmalıdır (85, 102).

Noradrenalin kan basıncı üzerindeki etkisini kalp debisi ve KH'de belirgin değişiklikler yapmadan oluşturduğundan, dopamine karşı takikardi ile yanıt veren veya yüksek dozdaki dopamine yanıt vermeyen hastalarda, periferik damar yataklarında güçlü vazokonstriksiyon istenildiği zaman kullanılabilir (75, 85).

Sepsis ve ilgili durumların tedavisinde öngörülen yaklaşımlar Çizelge 2.3'te özetlenmiştir (89). Septik kaskatta yaklaşık otuz-kırk kadar değişik mediyatörün bulunması ve birbirleri ile etkileşmelerinden dolayı, septik şokun tek bir ilaç ile tedavisi olası gibi görünmemektedir; mediyatör veya zarar gören organa özgü tedavi yaklaşımlarına gerek duyulmaktadır. Bundan dolayı, bakteriyel bileşenler, konakçı kökenli yangı gelişmesinde rol oynayan mediyatörler ve doku zedelenmesine neden olan mediyatörlere karşı uygulanacak uygun tedavi yaklaşımları, yangı sırasında gelişen olayları azaltarak, hemodinamik bozuklukları düzelterek, doku zedelenmesini ve organ yetersizliği gelişmesini önleyerek septik şokun tedavisinde yarar sağlayabilecektir (103-105).

**Çizelge 2.2.** Septik şokun olağan tedavisi.

<b>Anormallik</b>	<b>Tedavi</b>	<b>Terapötik Amaç</b>
<b>Enfeksiyon</b>	Uygun antibiyotikler ve cerrahi drenaj (gerekli ise)	Enfeksiyonun uzaklaştırılması
<b>Kardiyovasküler sistem ve organ işlev bozukluğu</b>		
<b>Hipotansiyon</b>	Yoğun bakımda izleme, hacim ekspansiyonu, vazopresör ilaçlar	Ortalama arteriyel kan basıncı en az 60 mm/Hg; pulmoner arter <i>wedge</i> basıncı 14-18 mm/Hg Hemoglobin düzeyi 10 g/dl'nin üzerinde
<b>Doku hipofüzyonu</b>	Yoğun bakımda izleme, hacim ekspansiyonu, inotropik ilaçlar, vazopresörler	Oksijen saturasyonu %92'nin üzerinde Normal kan laktat derişimleri Özgül olmayan şokta kardiyak indeks 2.2 L/dk.m <sup>2</sup> ve septik şokta 4.0 L/dk.m <sup>2</sup> 'nin üzerinde <b>Normal değerler veya aşağıdaki sistemlerde işlev bozukluğunun düzeltilmesi:</b>
<b>Organ işlev bozukluğu</b>	Yoğun bakımda izleme, hacim ekspansiyonu, inotropik ilaçlar, vazopresörler	Renal (kan üre nitrojeni, serum kreatinini, üriner debi) Hepatik (serum bilirubini) Pulmoner (alveolar-arteriyel gradiyent) Kardiyovasküler (ortalama kan basıncı, kardiyak indeks) SSS (mental durum)

SSS, santral sinir sistemi.

Yeni tedavi yaklaşımları temeli bakteri toksinleri ve konakçı hücrelerinden salıverilen mediyatörlerin nötralize edilmesi yolu ile sendromun ilerleyişini durdurmak veya yavaşlatmak esasına dayanmaktadır. Bu amaçlar ile yapılan çalışmalarda, bakteri toksinleri (ET gibi), TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi sitokinler, nötrofiller gibi hücreler, NO, trombosit etkinleştirici faktör (TEF) ve bradikinin gibi yangının ortaya çıkmasında rol oynayan mediyatörler üzerinde durulmaktadır (74, 83). Sepsis ve septik şok patojenezindeki tek bir yolu hedefleyen antikor tedavisi genellikle etkisiz kalmaktadır. Ayrıca, çeşitli tedavi yaklaşımlarının arasında olan glukokortikoidler, anti-LPS antikorlar, TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  reseptör antagonistleri ile yapılan klinik çalışmalarda başarı elde edilememiştir (106). Sitokinler ve sepsiste salıverilen öteki mediyatörler hücresele

hedeflerini çabuk bir biçimde etkiledikleri için yüksek risk altındaki kişilere immünoterapi, erken dönemde veya profilaktik olarak uygulanmalıdır (107).

**Çizelge 2.3.** Sepsiste hedeflere yönelik eski ve yeni tedavi seçenekleri.

<b>Konakçı ile patojen etkileşimlerini hedefleyen tedaviler</b>	Antibiyotikler, anti-LPS antikorları, TLR reseptör blokajı (E5564) ve CD14 antagonistleri
<b>Yangıyı hedefleyen mediyatöre özgü tedaviler</b>	Anti-TNF antikorları, TEF asetilhidrolazı, bradikinin antagonistleri, anti-faktör XII antikorları, prostaglandin reseptör antagonistleri, anti-C5a antikorları, yangıya karşı etkili ilaçlar ile IL-1, TNF ve C5a reseptörlerinin antagonistleri
<b>Yangıyı hedefleyen mediyatöre özgü olmayan tedaviler</b>	Antioksidanlar, glukokortikoidler, etkin protein C, antitrombin III ve doku faktörü yolu inhibitörü
<b>Hücrelerin birbirleri ile olan etkileşimlerini hedefleyen tedaviler</b>	Antitrombositer ilaçlar
<b>Koagülasyonu hedefleyen tedaviler</b>	Heparin, hirudin, antitrombin III, faktör VII inhibisyonu, doku faktörü yolu inhibisyonu, etkin protein C ve doku plazminojen etkinleştiricisi
<b>Olası, geliştirilmeye uygun hedefler</b>	Apoptoz, transkripsiyon faktörleri, elastaz, PARS, PARP-1, NO, p38 MAPK, PKC, oksijenlenme, kan akımı ve hemodinamik güçler, fosfolipit oksidasyon ürünleri ve VEGF/anjiyopietin dengesi
<b>LPS'yi hedefleyen tedaviler</b>	LPS oluşumunun önlenmesi veya immün temizleme (lipit A sentez inhibitörleri, LPS aşılari, anti-LPS antikorlar) ve LPS'nin kandan veya başka vücut sıvılarından uzaklaştırılması (filtrasyon veya emilim ile LPS'nin veya başka mikrobiyal içeriklerin uzaklaştırılması, LPS bağlayıcı proteinler ve fosfolipitler)

CD, *cluster of differentiation*; IL, interlökin; LPS, lipopolisakkarit; MAPK, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz; NO, nitrik oksit; PARP, poliADP-riboz polimeraz; PARS, poliADP-riboz sentaz; PKC, protein kinaz C; TLR, *toll-like receptor*; TNF, tümör nekroze edici faktör; VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü.

## 2.2 MAPK'ler

### 2.2.1 Özellikleri

Serin ve treonin protein kinazlar olarak MAPK'lerin işlevleri ve düzenlenmeleri, mayalar gibi son derece basit organizmalardan insan gibi kompleks organizmalara kadar evrimsel olarak korunmuştur (108). Klasik olarak MAPK ailesi ERK1, ERK2, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK1, JNK2 ve JNK3) ve p38 MAPK kinaz ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  ve  $\gamma$ ) olmak üzere üç alt aileden oluşmaktadır. Ayrıca, ERK alt ailesinde işlevleri ve düzenlenmeleri tam açıklanmamış olan ERK'in 3-8 alt türleri de bulunmaktadır (109). Memeli hücrelerinde MAPK'lerin on iki, MAPK kinaz (MAPKK)'lerin yedi, MAPKK kinaz (MAPKKK)'lerin ise yirmi kadar varyantı bulunmaktadır.

### 2.2.2 Ekspresyon ve Etkinliklerinin Düzenlenmesi

MAPK'ler tüm ökaryotlarda üçlü kinaz düzenleyici yolda yer almaktadır. Bu üçlü kinaz yolunda MAPK'ler, MAPKK'ler tarafından tirozin ve treonin kalıntıları üzerinden fosforillenerek etkinleşirler. MAPKK'ler ise, MAPKKK'ler olarak adlandırılan bir grup serin/treonin kinazlar tarafından fosforillenerek etkinleşirler (110). Bu üçlü kinaz düzenleyici yol, yalnızca sinyali hedef efektörlere ulaştırmakla kalmaz, ayrıca paralel sinyal ileti yollarından gelen bilgiyi koordine ederek sinyalin amplifikasyonuna da neden olmaktadır. Büyüme faktörleri, mitojenler, forbol esterleri, ozmotik şok, iyonize radyasyon, stres uyarıları ve sitokinler gibi çeşitli uyarılar MAPK'lerin etkinleşmesine neden olabilmektedir (111).

MAPK'nin etkinleşebilmesi için hem treonin hem de tirozin yapılarının fosforillenmesi gerekmektedir. Bu treonin ve tirozin yapıları her bir MAPK için değişik tripeptit yapıları üzerinde yer almaktadır. Bu tripeptit yapıları ise ERK için treonin-glukagon-tirozin, p38 için treonin-glisin-tirozin ve JNK için treonin-prolin-tirozindir (112).

Her iki bölgeden de fosfatın çeşitli fosfataz enzimleri ile uzaklaştırılması ile MAPK'lerin etkinliği ortadan kalkar (113). MAPK'ler yer aldıkları üçlü kinaz düzenleyici yolda değişik MAPKKK'ler ve MAPKK'ler tarafından fosforile edilerek etkinleşirler. Örneğin, ERK1/2 raf tarafından fosforile edilen MEK1/2 tarafından etkinleştirilirken, JNK1/2 MAPKKK1 (MEKK)'ler ve *mixed lineage kinase* (MLK)'ler tarafından fosforile edilen MAPK4/7 tarafından, p38 MAPK ise TAK1 ve MAPKKK4 (MTK1) tarafından fosforile edilen MAPK3/6 tarafından etkinleştirilmektedir (114).

Büyüme faktörü gibi hücre dışından gelen bir uyarı sonucunda etkinleşen MAPK'ler sitoplazmadan çekirdeğe geçerek çeşitli transkripsiyon faktörlerinin etkinleşmesine neden olduktan sonra bir sonraki uyarı için sitoplazmaya geri dönerler (115). Forbol esterleri ile de ERK'in etkinleştiği ve hücre türüne bağlı olarak kalsiyum ve siklik adenosin 5'-monofosfat (siklik AMP) yollarının da ERK sinyalizasyonu ile inhibe edici veya etkinleştirici biçimde etkileştiği bildirilmiştir (116).

### 2.2.3 İnhibitörleri

Günümüzde MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunu seçici bir biçimde inhibe eden U0126 gibi bileşikler geliştirilmiştir. Yalnızca etkin olmayan MEK1/2'nin etkinleşmesini önleyen N-metil-4-(2-siyanofenil)piperazinil-3-metilbenzamid (PD098059)'un tersine, U0126 hem etkin hem de etkin olmayan MEK1/2'nin inhibisyonuna neden olmaktadır. U0126, PD098059'dan daha güçlü ve daha az toksiktir (117, 118). SB203580, RWJ 67657 ve BIRB 796 BS gibi özgül p38 MAPK inhibitörleri de geliştirilmiştir. SB203580 ve RWJ 67657'nin, ET'nin neden olduğu TNF- $\alpha$  oluşumundaki artmayı önlediği gösterilmiştir (64, 67). Klinik deneylerde ise ağız yolu ile kullanılan BIRB 796 BS'nin ET'nin neden olduğu p38 MAPK'nin etkinleşmesini ve sitokin oluşumunu önlediği gösterilmiştir (69). SP600125 ve CEP1347 gibi MAPK ailesinden bir başka enzim olan JNK'yi etkisizleştiren maddeler de geliştirilmiştir (14).

#### 2.2.4 Fizyolojik Olaylardaki Rolü

MAPK'ler hedef protein substratlarının özgül serin ve treonin kalıntılarını fosforile ederek hücre büyümesi, farklılaşması, gen ekspresyonu, mitoz, hücre hareketi, metabolizma, hücre canlılığının sürdürülmesi, apoptoz ve embriyojenez gibi çeşitli fizyolojik olaylarda rol oynarlar (119, 120).

Etkinleştirilmiş MAPK'ler çekirdeğe geçerek özgül transkripsiyon faktörleri aracılığı ile apoptoz, proliferasyon ve gen ekspresyonu gibi çeşitli hücresel olayların kontrolünde rol oynarlar (121). MAPK'ler aracılığı ile gerçekleşen apoptoz olayında, apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1) tarafından etkinleştirilen JNK ve p38 gibi MAPK'ler kaspaz-3'ü etkinleştirmesi rol oynamaktadır (122).

MAPK'ler ile damar düz kas kasılması arasında bir ilişki olduğu da bildirilmiştir. Noradrenalin ile  $\alpha_1$ -adrenerjik reseptörlerin uyarılmasının zamana bağımlı olarak ERK1/2 fosforilasyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (123). Kalsiyum ile oluşturulan *20 kDa light chain* (LC<sub>20</sub>) fosforilasyonundan bağımsız bir olarak oluşan düz kas kasılmasında, ERK'in etkinleşmesi ile kasılma arasında bir ilişki olduğu ve bu ilişkinin kaldezmone fosforilasyonu aracılığı ile olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, MAPK fosforilasyonunun kalsiyumdan bağımsız mekanizmalarda yer alarak düz kas kasılmasının oluşturulmasından çok, damar geriminin korunmasında rolü olduğu ileri sürülmüştür (124). MAPK'lerin düz kasta kalsiyum duyarlılaşmasında rolü olabileceği de bildirilmiştir (125). ERK1/2 tarafından kaldezmone proteinin fosforilasyonunun, damar düz kasında kasılmanın sürekliliğine katkıda bulunduğunu ileri süren başka çalışmalar da bulunmaktadır (126).



### 2.2.5 Patolojik Olaylardaki Rolü

MAPK'ler çeşitli patolojik olaylarda rol oynamaktadırlar. Alzheimer hastalığı (127), Crohn hastalığı (128), yangı (129), artrit (130), miyokardiyal zedelenme (130), nöropatik ağrı (131), kanser (132) ve astım gibi durumlarda (133) MAPK yolunun etkinleştiği bildirilmiştir.

Sepsis patolojisinde de MAPK'ler rol oynamaktadır. ET gibi mikrobiyal ürünler ile TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi sitokinler kendi reseptörleri aracılığı ile hücre içi sinyalizasyonunun başlamasına ve böylece MAPK'nin etkinleşmesine (134-137), ardından da bir transkripsiyon faktörü olan ve iNOS gibi çeşitli enzimlerin genlerinin ekspresyonunu başlatan NF- $\kappa$ B'nin etkinleşmesine neden olurlar (134, 138). ERK'nin ET ile etkinleşmesi Raf-1'e bağımlı ve bağımsız bir biçimde olabilmektedir. Raf-1'e bağımlı yolda Ras tarafından etkinleştirilen Raf-1, MAPK/MEK1 ve MAPK/MAPKK2 (MEK2)'yi fosforile etmektedir; ERK1/2 ise MEK1/2 tarafından etkinleştirilebilmektedir. Raf-1'den bağımsız yolda ise, PKC'nin MAPKK'lerin MEK alt grubunu etkinleştirilmesi rol oynamaktadır.

## 2.3 NOS'ler

### 2.3.1 Özellikleri

NO, suda çözünebilir 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 2.4) (19, 139-157).

**Çizelge 2.4.** Memeli NOS izoformlarının özellikleri.

Özellikleri	nNOS	eNOS	iNOS
<b>Yerleşim</b>	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, mikrogliya, lenfoit/miyeloit dendritik, Langerhans, Kupffer, bronkiyal epitel, mezengiyal, Schwann ve sinir hücreleri
<b>Hücre içi yerleşim</b>	Membrana bağımlı	Membrana bağımlı (etkisiz) veya sitozolik (etkin)	Sitozolik
<b>Molekül ağırlığı</b>	161 kDa <sup>a</sup>	133 kDa <sup>a</sup>	131 kDa <sup>a</sup>
<b>Gen yapısı ve büyüklüğü</b>	29 exon, 28 intron, > 200 kbp <sup>a</sup>	26 exon, 25 intron, 21-22 kbp <sup>a</sup>	26 exon, 25 intron, 37 kbp <sup>a</sup>
<b>Kromozomal yerleşim</b>	12 numaralı kromozom üzerinde 12q24.2-12q24.3 <sup>a</sup>	7 numaralı kromozom üzerinde 7q35-7q36 <sup>a</sup>	7 numaralı kromozom üzerinde 17cen-q11.2 <sup>a</sup>
<b>Predominant durumda amino asit sayısı</b>	1434 <sup>a</sup>	1203 <sup>a</sup>	1153 <sup>a</sup>
<b>İndüklenebilirlik</b>	Yapısal	Yapısal	İndüklenebilir
<b>Yardımcı faktörler</b>	BH <sub>4</sub> , FAD, FMN, hem, çinko	BH <sub>4</sub> , FAD, FMN, hem, çinko	BH <sub>4</sub> , FAD, FMN, hem, çinko
<b>Substratlar</b>	L-Arjinin, NADPH, oksijen	L-Arjinin, NADPH, oksijen	L-Arjinin, NADPH, oksijen
<b>Kalsiyuma bağımlılık</b>	Bağımlı	Bağımlı	Bağımsız gibi görünmekte, ancak bazı hücrelerde < %20 veya %50-70 oranında bağımlı
<b>Kalmoduline bağımlılık</b>	Bağımlı	Bağımlı	Bağımsız gibi görünmekte, ancak bazı hücrelerde %50 oranında bağımlı
<b>Protein varyasyonu</b>	Dokuya özgü $\mu$ , $\alpha$ , $\beta$ ve $\gamma$ izoformları	---	---
<b>Süperoksit oluşturma kaynakları</b>	Hem <i>domain</i> , redüktaz <i>domain</i>	Genellikle hem <i>domain</i>	Genellikle redüktaz <i>domain</i>
<b>Uyaranları</b>	Eksitatör amino asitler (glutamat, NMDA vd.)	Asetilkolin, ATP, ADP, bradikinin, trombin, <i>shear stress</i>	Endotoksin ve sitokinler
<b>Salıverilme</b>	Dakikalar içinde, geçici, pM düzeyde	Dakikalar içinde, geçici, pM düzeyde	Uzun süreli, sürekli, büyük miktarlarda ( $\mu$ M)
<b>Başlıca fizyolojik işlevi</b>	Sinirsel aşırım	Vazodilatasyon	Sitotoksiste
<b>Patofizyolojik olaylardaki rolü</b>	Müsküler distrofi, iskemi-reperfüzyon	Endotelial işlevsizlik, hiperkolesterolemi, hipertansiyon	Yangı ile belirgin hastalıklar

<sup>a</sup> İnsan için. ADP, adenosin monofosfat; ATP, adenosin trifosfat; BH<sub>4</sub>, tetrahidrobiopterin; 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- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 ve IL-6 gibi özgül maddeler tarafından uyarıldıklarında iNOS etkinliği artar (Çizelge 2.4) (19, 139-157).

Kanda NO hızlı bir biçimde nitrit ve nitrate 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 zedelenmesine neden olabilir (19, 139-157).

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, yangılı 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, yangı 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 (19).

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), sinyal artırıcı sistemler (PKC ve PKG gibi), transkripsiyon faktörleri (NF- $\kappa$ 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 yangıyı önleyici etkilerinde 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 sinyalleşici yolun inhibisyonu, sinaptik modülasyon, KH'nin düzenlenmesi, yangıya 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 DNA, tiyoller, lipitler ve mitokondriyel enzimlerin oksidasyonu ve çeşitli proteinlerin (mangan süperoksit dizmutaz [SOD], PGI<sub>2</sub> 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 zedelenmesi, sitokrom c salıverilmesi, demiyelinizasyon, düşük yoğunluklu proteinlerin oksidasyonu, hücre solunumunun baskılanması, PGI<sub>2</sub>'nin trombosit kümelenmesini önleyici ve vazodilatör etkisinin engellenmesi, dopamin yetersizliği, hücre yapısının değişmesi ve sinyalleme yollarının baskılanmasına neden olur (19).

### 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 zedelenme, hücresel stres, iskemi, nörotransmitterler (glutamat), steroid hormonlar (östrojen, testosteron ve glukokortikoidler), bakteriyel ürünler (LPS), interferonlar (IFN- $\gamma$ ), interlökinler (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 yangıya karşı kullanılan ilaçlar, statinler, siklosporin A ve AT<sub>1</sub> 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 (158-163).

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- $\beta$ 1, lizofosfatidilkolin, okside düşük yoğunluklu lipoprotein, okside linoleik asit, TNF- $\alpha$ , bakteriyel ürünler (LPS), hipoksi, statinler, östrojen, PKC, trombin, Rho GTPaz, VEGF, histon deasetilaz inhibisyonu ve hiperkolesterolemi bulunmaktadır (158). 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 (159, 160, 162-165).

iNOS ekspresyonunu transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası aşamalarda düzenleyen fizyolojik ve patofizyolojik uyarılar arasında bakteriyel ürünler (LPS), transkripsiyon faktörleri (NF- $\kappa$ B, oktamer faktör, PPAR, interferon düzenleyici faktör 1 [IRF1], *signal transducer and activator of transcription-1 $\alpha$*  [STAT-1 $\alpha$ ], *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- $\alpha$ , interferonlar (IFN- $\gamma$  ve - $\beta$ ), interlökinler (IL-1 $\beta$ , -2, -4, -6, -8, -10, -12, -13 ve -17), insülin, glukagon, anjiyotensin II, endotelin, östrojen, projesteron, prostaglandinler (PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> ve PGE<sub>2</sub>), glukokortikoidler, etanol, glukoz ve çeşitli ilaçlar (siklosporin A, statinler ve steroid yapıda olmayan yangıya 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- $\kappa$ B ve STAT

proteinleri ile) olarak protein-protein etkileşmesi gibi olaylar ile düzenlenmektedir (145, 159, 160, 162, 163, 166).

### 2.3.3 İnhibitörleri

Araştırmalarda veya tedavi amacı ile kullanılmak üzere geliştirilen çeşitli NO sentezini veya etkilerini önleyen maddeler ile ilgili bilgiler Çizelge 2.5'te verilmiştir (19, 141).

**Çizelge 2.5.** NO'nun sentezini veya etkilerini önleyen maddeler.

---

**A) NO Sentezini Önleyen Maddeler**

Kortikosteroidler

---

**B) NOS'un Dimerizasyonu Önleyen Maddeler**

BBS-2 (seçici iNOS inhibitörü)

---

**C) L-Arjininin Yarışmalı Analogları**

**1) Amino Asit Türevleri**

L-Arjinin türevleri (seçici olmayan NOS inhibitörleri)

L-NAME

L-NMMA

L-NA

L-NAA

Asetamidin içeren arjinin analogları (seçici iNOS inhibitörleri)

L-NIL

GW274150

ONO1714

İndazoller (yalnızca *in vivo* koşullarda seçici nNOS inhibitörleri)

7-NI

**2) Amino Asit Türevi Olmayanlar (seçici iNOS inhibitörleri)**

Guanidinler

Aminoguanidin

MEG

İzotiyüreler

SMTs

AE-TIU

Bis-tiyüreler

W1400

---

**D) NO Süpürücüleri**

Hücre içermeyen hemoglobin

---



**Çizelge 2.5. (devam)** NO'nun sentezini veya etkilerini önleyen maddeler.

<b>İnhibitör</b>		<b>nNOS</b>	<b>iNOS</b>	<b>eNOS</b>
1,3-PBIT	<b>K<sub>i</sub></b>	0.25 µM	0,47 µM	9 µM
1,4-PBIT	<b>Oran</b>	25	5.000	1
2-İmino-4-metilpiperidin	<b>IC<sub>50</sub></b>	0.2 µM	0.1 µM	1.1 µM
3-Bromo-7-nitroindazol	<b>IC<sub>50</sub></b>	170 nM	≈ 200 nM	
7-NI	<b>IC<sub>50</sub></b>	0.71 µM		0.80 µM
Aminoguanidin	<b>K<sub>i</sub></b>	157 µM	75 µM	
AMT	<b>IC<sub>50</sub></b>		0.036 µM	
ETPI	<b>K<sub>i</sub></b>	0.32 µM	37 µM	9.4 µM
GW274150	<b>K<sub>i</sub></b>	8 µM	100 nM	25 µM
L-NIL	<b>IC<sub>50</sub></b>	92 µM	3.3 µM	
L-NIO	<b>K<sub>i</sub></b>	1.7 µM	3.9 µM	3.9 µM
L-tiyositrülin	<b>K<sub>i</sub></b>	0.06 µM	3.6 µM	
N <sup>o</sup> -propil-L-arjinin	<b>K<sub>i</sub></b>	0.057 µM	180 µM	8.5 µM
S-(2-aminoetil)-izotiyöüre	<b>K<sub>i</sub></b>		6 µM	
S-etil-izotiyöüre	<b>K<sub>i</sub></b>	0.029 µM	0.017µM	0.036µM
S-izopropil-izotiyöüre	<b>K<sub>i</sub></b>		0.01 µM	
S-metil-izotiyöüre	<b>K<sub>i</sub></b>		6 µM	
S-metil-L-tiyositrülin	<b>IC<sub>50</sub></b>	0.3 µM		5.4 µM
TRIM	<b>IC<sub>50</sub></b>	28.2 µM	27.0 µM	1.06 mM
vinil-L-NIO	<b>K<sub>i</sub></b>	0.1 µM	60 µM	12 µM

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis[etan-2-izotiyöüre] dihidrobromür; 1,4-PBIT, fenilen-1,4-bis[etan-2-izotiyöüre] dihidrobromür; 7-NI, 7-nitroindazol; AE-TIUs, aminoetil-izotiyöüreler; AMT, 2-amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiyazin; ETPI, 5-etil-N-[4-trifloro(metil)fenil]-izotiyöüre; GW274150, (S)-2-amino-(1-iminoetilamino)-5-tiyoeptanoik asit; IC<sub>50</sub>, enzim etkinliğini %50 oranında azaltan derişim; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; K<sub>i</sub>, enzim-inhibitör etkileşmesinde ayrışma değışmezi; L-NA, N-nitro-L-arjinin; L-NAA, N-amino-arjinin; L-NAME, N-nitro-L-arjinin metil ester; L-NIL, L-N<sup>6</sup>-(1-iminoetil)-lizin; L-NIO, L-N<sup>5</sup>-(1-iminoetil)-ornitin; L-NMMA, N<sup>G</sup>-metil-L-arjinin hidroklorür (546C88); MEG, 2-merkaptotiyoguanidin; nNOS, nöronal nitrik oksit sentaz; NO, nitrik oksit; SMTs, S-metilizotiyöüreler; TRIM, 1-(2-triflorometilfenil)-imidazol; vinil-L-NIO, N<sup>5</sup>-(1-imino-3-butenil)-L-ornitin; W1400, N-3-aminometil-benzilasetamidin.

Seçici olmayan NOS inhibitörü L-NAME ile yapılan çeşitli klinik çalışmalar bulunmaktadır. Şiddetli kardiyojenik şoku olan hastalarda L-NAME gibi NOS inhibitörlerinin yararlı olduğu gösterilmiştir (167). Ortostatik hipotansiyon omurilik yaralanmalarının sonucu olarak özellikle tetraplejili hastalarda görülebilmektedir; bu hastalarda L-NAME ile NOS enziminin inhibe edilmesi sonucunda hipotansiyonun önlenmesi bakımından olumlu sonuçlar alınmıştır (168).

Şiddetli sepsisli hastalarda da NO sentezinin L-NAME ile inhibisyonu ile kardiyovasküler parametrelerin düzelmesine (169) ve aşırı sitokin oluşumunu önlenmesine (170) karşın, yapılan çeşitli klinik öncesi ve klinik çalışmalarda sepsiste ortaya çıkan renal hipoperfüzyonu kötüleştirme (171), renal protein

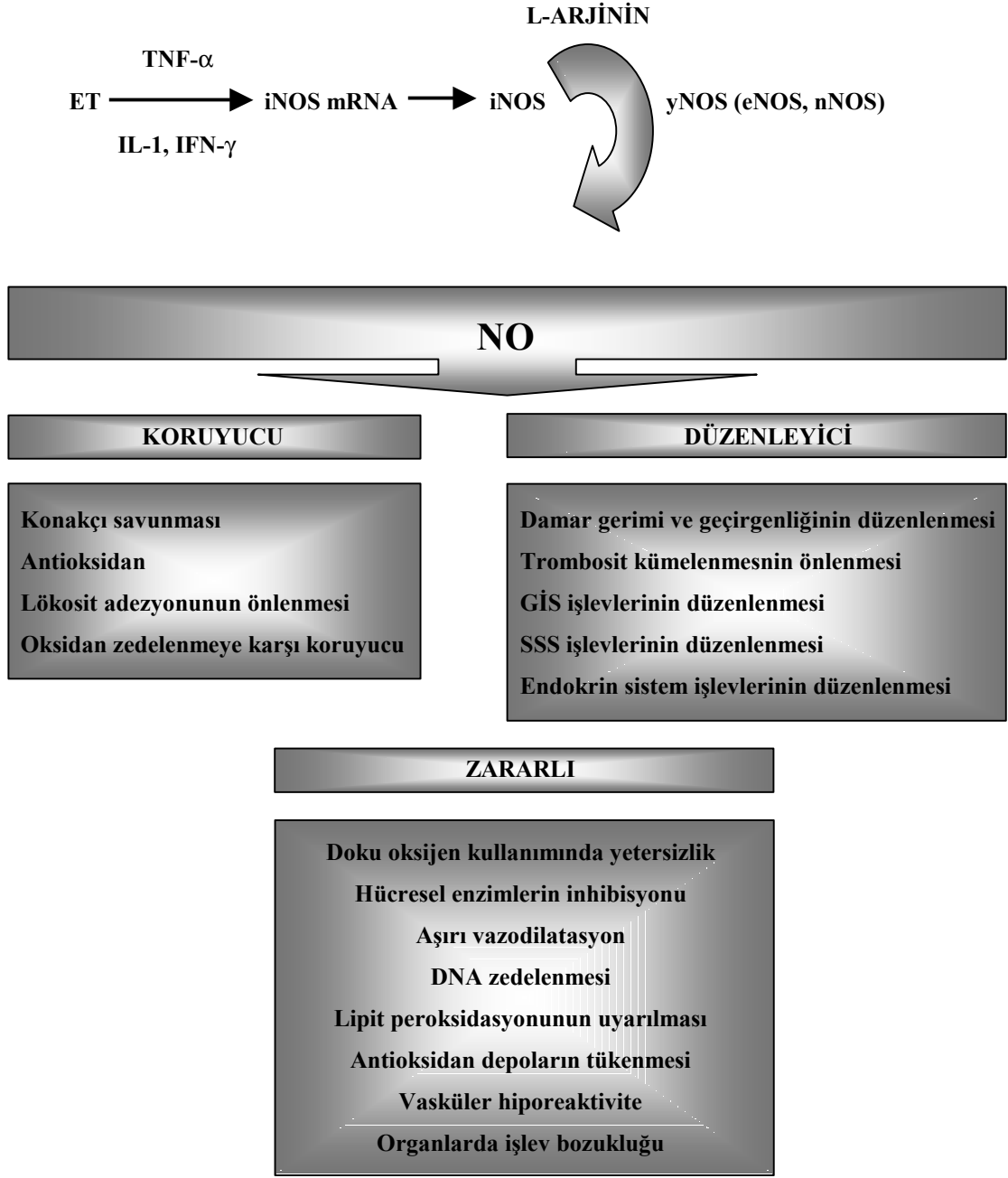
metabolizması üzerinde olumsuz etkileri olması (172), pulmoner hipertansiyona (173, 174) ve akciğerlerde yangı tablosununun daha da kötüleşmesine neden olmasından dolayı (175) L-NAME sepsis tedavisinde rutin uygulamaya girememiştir.

Endotoksemide oluşan pulmoner ödemi iNOS aracılığı ile oluşan NO şiddetlendirirken, yNOS aracılığı ile oluşan NO koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (176) bundan dolayı, L-NAME gibi seçici olmayan NOS inhibitörleri yerine, aminoguanidin ve tiyoüre türevleri gibi seçici iNOS inhibitörlerinin yeğlenmesi daha uygun olacaktır (177). Seçici iNOS inhibitörü aminoguanidin ile yapılan bir çalışmada, insanda gelişen endotoksemide iNOS'un seçici inhibisyonunun böbreklerde proksimal tübül zedelenmesini önleyebileceği ileri sürülmüştür (178).

### **2.3.4 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 2.4 ve Şekil 2.3'te özetlenmiştir (19, 139-157).

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'in 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 (179, 180), hücre içi kalsiyum depolarından inozitol-1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) reseptör aracılıklı kalsiyum çıkışının önlenmesi (181, 182), iyon kanallarından kalsiyumun hücre içine girişinin engellenmesi (183, 184) veya çıkışının artırılması (185, 186), sarkoplazmik retikuluma Ca<sup>2+</sup>-ATPaz aracılığı ile girişinin artırılması (187, 188) ve RhoA'ya bağımlı yolun inhibisyonu üzerinden miyozin hafif zincirin fosfataz etkinliğinin artırılması (189) bulunur.



**Şekil 2.3.** NO'nun fizyolojik ve patofizyolojik olaylardaki rolü. *DNA*, deoksiribonükleik asit; *eNOS*, endotelial NO 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 (190, 191), yüksek derişimlerde ise damar düz kasında kalsiyuma bağımlı potasyum kanallarını etkinleştirerek düz kas gevşemesine neden olduğunun (192), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz etkinliğini artırarak (193), sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesini engelleyerek (194), 20-HETE oluşumunu önleyerek (195-197) ve sarkoplazmik retikulumda Ca<sup>2+</sup>-ATPaz'ın etkinliğini artırarak düz kas gevşemesine neden olduğunun (198, 199), NF-κB'nin etkinleşmesini önlediğinin (200, 201), solunum yolları düz kasında miyozin gibi kasılmada yer alan proteinlerin tiyol gruplarını oksitleyerek gevşemeye neden olduğunun (202), deoksiribonükleik asit (DNA) zedelenmesine yol açarak PARP'nin etkinleşmesine ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) modifikasyonuna neden olarak hücre ölümüne yol açtığına bildirildiği çalışmalar (203-206) verilebilir.

### **2.3.5 Patolojik Olaylardaki Rolü**

İskemi ve reperfüzyona bağılı zedelenme, inme, sepsis, nörotoksisite, makrofaj kaynaklı hücre zedelenmesi, vasküler hastalıklar, diyabet, otoimmün hastalıklar, yangı ile belirgin hastalıklar, ağrı, kanser, respiratuvar hastalıklar ve pulmoner hipertansiyon gibi çeşitli patolojik olaylarda NO önemli bir rol oynamaktadır. NO'nun çeşitli patofizyolojik olaylardaki rolü Çizelge 2.4 ve Şekil 2.3'te özetlenmiştir (19, 139-157).

## 2.4 Guanilil Siklazlar

### 2.4.1 Özellikleri

1970'li yılların ortalarında guanilil siklaz etkinliğinin birçok hücrede çözünebilir ve membranal fraksiyonlarda bulunduğu (207-209) ve enzim etkinliğinin değişik proteinlere bağlı olduğu gösterilmiştir (210-212). Guanilil siklaz enziminin sitozolik kompartımandan izolasyonu ile çözünebilir izoformun (çGS)  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinden oluşan bir heterodimer olduğu gösterilmiştir. Guanilil siklazın  $\beta$  alt biriminin yaklaşık 70 kDa molekül ağırlığında olmasına karşın,  $\alpha$  alt birimi 73-82 kDa molekül ağırlığındadır (213, 214).

Guanilil siklazın hem  $\alpha$  hem de  $\beta$  alt birimlerinin  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ve  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ve  $\beta_3$  olmak üzere değişik dokularda üç ayrı izoformunun olduğu bilinmektedir (215, 216) (Çizelge 2.6). Memelilerde guanilil siklazın A'dan G'ye kadar yedi değişik izoformu olan membranal türü ise ligant özgülüklerine bağlı olmak üzere natriüretik peptit reseptörleri, intestinal peptit bağlayıcı reseptörler ve yetim (*orphan*) reseptörler olmak üzere üç ayrı gruba ayrılmıştır (215, 217) (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.6. çGS izoformlarının özellikleri ve dokulardaki dağılımı.

çGS izoformları	Molekü Ağırlığı (kDa)	Doku Dağılımı
$\alpha_1$	73 (sığır) / 82 (sıçan)	Genel
$\beta_1$	70	Genel
$\alpha_2$	82	Sıçan böbreği, damar dokusu, kemosensör hücreler, dorsal kök gangliyon
$\beta_2$	76	Sıçan karaciğeri
$\alpha_3$	81	İnsan damar düz kas ve endotel hücreleri
$\beta_3$	70	İnsan damar düz kas ve endotel hücreleri

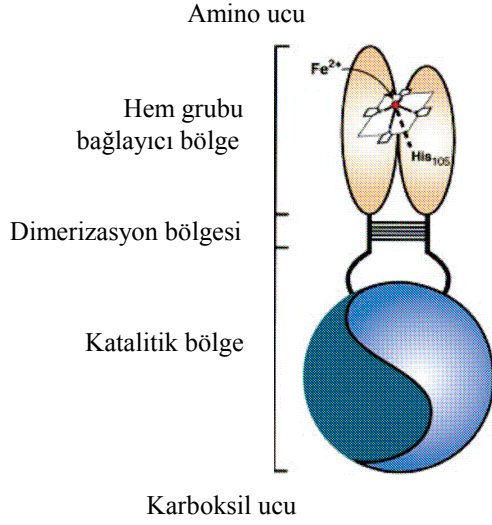
çGS, çözünebilir guanilil siklaz.

**Çizelge 2.7** Membranal guanilil siklaz izoformları, ligantları ve dokulardaki dağılımı.

<b>Reseptör</b>	<b>Ligant</b>	<b>Doku Dağılımı</b>
GS-A	ANP, BNP	Adipoz doku, adrenal bez, ileum, böbrek, plasenta, kalp, timus, yumurtalık, koklea
GS-B	CNP	Plasenta, adrenal medulla, adrenal bez, aorta, atriyum, akciğer, testis, uterus, yumurtalık, timus, bağırsak
GS-C	Isıya dayanıklı enterotoksin, guanilin, üroguanilin	Bağırsak mukozası, karaciğer
GS-D	---*	Burunda epitel hücreleri
GS-E	---*	Retina, pineal bez
GS-F	---*	Retina
GS-G	---*	Bağırsak, böbrek, akciğer, iskelet kası

\* Henüz bilinen bir ligandı yok. ANP, atriyal natriüretik peptit; BNP, beyin natriüretik peptit; CNP, C türü natriüretik peptit; GS, guanilil siklaz.

Çeşitli dokularda yapılan incelemeler çGS'nin  $\alpha_1$  ve  $\beta_1$  alt birimlerinin ötekilere göre en çok oranda olduğunu göstermiştir (218-220). Bu alt birimler ilk olarak sığan ve sığır akciğerinde tanımlanmıştır (221-224). çGS'in her bir alt birimi hem grubu bağlayıcı, dimerizasyon ve katalitik olmak üzere üç değişik bölgeden oluşmaktadır (225) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. çGS'nin moleküler yapısı. çGS, çözünebilir guanilil siklaz.

#### 2.4.2 Ekspresyon ve Etkinliklerinin Düzenlenmesi

Hem grubunu bağlayıcı bölge çGS'nin NO tarafından etkinleştirilebilmesi için gereklidir (226-230). 1970'li yılların sonlarına doğru NO'nun çGS enziminin güçlü bir etkinleştiricisi olduğu gösterilmiştir (231-234). NO çGS'yi hem grubuna bağlanarak ve hem-demir-nitrozil kompleksi oluşturarak etkinleştirmektedir (225). Bir başka çGS etkinleştiricisi olan karbon monoksit çGS'nin hem grubuna bağlanarak enzimi etkinleştirebilse de, NO kadar güçlü etkinleştirebilme yeteneği yoktur. çGS enzimi NO tarafından yüz-iki yüz kat kadar etkinleştirilebilirken, karbon monoksit tarafından ise yalnızca dört yüz kat oranında etkinleştirilebilmektedir (235). Glisinden sentezlenen doğal bir bileşik olan ve hemin prekürsörü olan protoporfirin IX de çGS'yi etkinleştirebilmektedir.

### 2.4.3 İnhibitörleri

çGS enzimini etkinleştirebilen veya inhibe edebilen çeşitli kimyasal maddeler geliştirilmiştir. Bir benzil indazol türevi olan YC-1 çGS enzimini yaklaşık on kat kadar etkinleştirebilmektedir (236, 237). YC-1 analogu olan BAY 41-2272 de çGS enzimini otuz kat kadar etkinleştirebilmektedir (238). YC-1 analoglarının gelecekte koroner kalp hastalıklarında, hipertansiyonda ve erektil işlev bozukluğunda kullanılabilecekleri düşünülmektedir (239). 1995 yılında kinoksalin türevi ODQ beyin dokusunda güçlü ve seçici bir çGS enzimi inhibitörü olduğu gösterilmiş ve NO sinyalizasyonunda siklik GMP'ye bağımlı ve siklik GMP'den bağımsız etkilerin araştırılmasında önemli bir araç olduğu ortaya konmuştur (240). ODQ'nun bu etkisi çeşitli dokularda da gösterilmiştir (240-243). Bu bileşik çGS enzimine NO ile yarışmalı olarak bağlanmakta ve enzimin bazal etkinliğini pek etkilemeden NO ile artan etkinliğini geri dönüşümsüz olarak önlemektedir. Spektrofotometrik analizler sonucunda ODQ'nun inhibitör etkisinin hem grubundaki demirin oksidasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (244). ODQ ile inkübasyondan üç dakika sonra  $Fe^{+3}$  atomunun  $Fe^{+2}$  atomuna oksitlenmesi ile yarışmalı olmayan bir inhibisyon ortaya çıktığı, on dakika içerisinde ise oksidasyon olayının tamamlandığı bildirilmiştir (244). ODQ *in vitro* çalışmalarda etkin olarak kullanılırken, *in vivo* çalışmalarda hemoglobin gibi hem grubu içeren yapılar ile etkileşebildiği için değeri göreceli olarak daha azdır (215). Seçici olmayan inhibitörler olan metilen mavisi ve LY-83583 NOS enzimini (246) ve nükleotit ile düzenlenen iyon kanallarını (246) da etkileyebildiği için günümüzde çGS enzim inhibitörleri olarak kullanılmamaktadırlar.

### 2.4.4 Fizyolojik Olaylardaki Rolü

çGS neredeyse bütün memeli hücrelerinin sitoplazmalarında eksprese edilmektedir ve trombositlerin kümeleşmesinin önlenmesi, düz kas gevşemesi, sinirlerde uyarının iletilmesi ve immünomodülasyon gibi birçok önemli fizyolojik olayda rol oynamaktadır (247).



Otokoitler, hormonlar, nörotransmitterler ve toksinler gibi endojen ve ekzojen bileşikler guanilil siklaz aracılığı ile oluşan siklik GMP aracılığı ile hücrel etkilerini oluşturmaktadırlar. Siklik GMP'nin etkileştiği üç değişik hedef bulunmaktadır; bunlar siklik GMP bağımlı protein kinaz (248), siklik GMP'nin 3' fosfodiester bağının hidrolizini katalize eden siklik nükleotit fosfodiesteraz ve çeşitli dokularda bulunan özgül olmayan katyon kanallarından olan siklik nükleotit aracılıklı iyon kanallarıdır (249). siklik GMP'nin düz kas gevşemesi dışında bağırsak sıvı ve elektrolit homeostazının sağlanmasında (250-252) ve retinada fototransdüksiyonda (253) rol oynamaktadır.

#### **2.4.5 Patolojik Olaylardaki Rolü**

Her ne kadar çGS yapısal bir enzim ise de, etkinliği veya ekspresyonu kan basıncı değişikliklerinin olduğu hipertansiyon veya septik şok gibi çeşitli patofizyolojik durumlarda değişebilmektedir. Beyinde çGS etkinliğinin artırılmasının Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde başarılı olabileceği ileri sürülmüştür (254). Karaciğer hastalıklarında oluşan aşırı amonyak birikiminin de çGS etkinliğini değiştirdiği ve sonuçta beyinde sinir zedelenmesine ve hepatik enselopatiye neden olabildiği gösterilmiştir (255). Prostat kanserinde dokuda çGS ekspresyonunun arttığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (256).

## 2.5 Protein Kinazlar

### 2.5.1 Özellikleri

Protein kinazlar substrat proteinlere fosfat grupları ekleyerek birçok proteinin etkinliğini, yerleşimini ve işlevini düzenleyerek birçok hücreyel olayda rol oynayan enzimlerdendir. İnsanlarda yaklaşık beş yüz değişik türde protein kinaz tanımlanmıştır. Protein kinazlar fosforile ettikleri gruplara göre sınıflandırılmaktadır. Çoğu genellikle serin ve treonin gruplarını fosforile ederken, tirozin kinazlar tirozin gruplarını fosforile ederler (257).

Protein kinazlara örnek olarak PKA, PKC, PKG, adenozin kinaz, kalsiyum kalmomodulin kinaz, p38 MAPK, ERK1/2 MAPK, JNK, Rho-kinaz, fosfoinozotide bağımlı protein kinaz (PDK) ve miyozin hafif zincir kinazı (MLCK) gibi enzimler verilebilir (257).

PKG siklik GMP'nin bağlanması sonucu etkinleşen bir serin/treonin kinazdır. PKG'nin PKG I (258) ve PKG II (259) olmak üzere iki değişik izoformu tanımlanmıştır. PKG I sitozolik bir formdur ve PKG I $\alpha$  ve PKG I $\beta$  olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır; PKG II ise membrana bağılı bir proteindir. PKG I $\alpha$ 'nın yoğun olarak serebellum, dorsal kök gangliyonları ve akciğerlerde bulunmasına karşın, PKG I $\beta$  daha çok düz kas, trombosit ve beyinde koku alma bölgesinde bulunmaktadır. PKGII ise ince bağırsakta, böbrekte, kondrositlerde ve beyinde eksprese edilmektedir (260).

### 2.5.2 Ekspresyon ve Etkinliklerinin Düzenlenmesi

Kinazlar etkilerini ATP'den bir fosfat grubunun hedef proteindeki serbest hidroksil grubu içeren serin, treonin veya tirozin amino asitlerinden birisine aktararak oluştururlar. Protein kinazların hücrelerde önemli etkilere aracılık etmelerinden dolayı etkinliklerinin düzenlenmesi önem taşımaktadır. Kinazları etkinlikleri fosforilasyon

aracılığı ile, etkinleştirici veya inhibitör proteinlerin ya da küçük moleküllerin bağlanması ile veya substratlarına göre hücredeki yerleşimlerinin kontrolü aracılığı ile düzenlenmektedir. Kinazların etkinliğindeki düzenlenmesinde ortaya çıkabilecek herhangi bir sorun ise kanser patolojisine neden olabilmektedir. Protein kinazların oluşturduğu fosforilasyon hedef enzimin etkinliğini, hücrel yerleşimini veya öteki proteinler ile etkileşimini etkileyerek işlevsel bir değişikliğe neden olabilmektedir. Bütün proteinlerin yaklaşık %30 kadarı kinazlar tarafından değiştirilebilmektedir; ayrıca, kinazlar özellikle sinyal ileti gibi çeşitli hücrel olaylarda rol oynamaktadır (257, 261).

PKG siklik GMP'nin aracılık ettiği olaylarda önemli bir hücre içi mediyatördür. Ligant ile indüklenen hücre içi siklik GMP artışı PKG'nin etkinleşmesinin ardından ATP'den  $\gamma$ -fosfatın hedef proteindeki serin veya treonin kalıntısına aktarılmasına neden olur; fosforillenen protein ise daha sonra hücrel yanıtın oluşturulmasına aracılık eder. PKG  $1\beta$ 'nin etkinleştirilmesi için gerekli olan siklik GMP derişimi PKG  $1\alpha$  için gerekli olan derişimin yaklaşık on katıdır (262). PKG I substratı olan vazodilatör ile uyarılan fosfoprotein (VASP)'nin Ser<sup>239</sup> bölgesinden fosforillenmiş olan formunu özgül olarak tanıyan antikorlar aracılığı ile PKG I etkinliği ölçülebilmektedir (263).

### 2.5.3 İnhibitörleri

Çalışmalarda kullanılmak üzere çeşitli protein kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir. Bunlara örnek olarak PKA inhibitörleri stauporin, H-89 ve HA-1004, PKC inhibitörleri Quersetin, bisindolmaleimid IX ve Ro 31-8220, adozin kinaz inhibitörü 5-iyodotübersidin, kalsiyum kalmodulin kinaz II inhibitörleri KN-62 ve W-7, CK1 inhibitörü DRB, MEK1/2 inhibitörleri U0126 ve PD098059, Rho-kinaz inhibitörleri HA-1077 ve hidroksifasudil, p38 MAPK inhibitörleri SB202190 ve SB203580, Raf-1 inhibitörü GW 5074 gibi birçok madde örnek olarak verilebilir. İmatinib (Gleevec®) ve gefitinib (Iressa®) gibi özgül kinaz inhibitörleri klinikte kullanılan protein kinaz inhibitörlerindendir.

Araştırmalarda kullanılmak üzere çeşitli PKG inhibitörleri de geliştirilmiştir. Bunların arasında guanozin monofosfotiyoat türevleri, piperazin türevi H-7, staurosporin ve benzodiazosin türevi *(9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-methoxy-2,9-dimethyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo-[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6] benzodiazocine-10-carboxylic acid methyl ester* (KT5823) bulunmaktadır. KT5823, PKG'nin ATP bağlayan katalitik bölgesine bağlanarak enzimi inhibe etmektedir (264, 265). KT5823 *in vitro* olarak PKG inhibisyonuna neden olurken, sağlam insan trombosit ve sıçan mezengiyal hücrelerinde enzimi inhibe edemediği, hatta uyarabildiği bildirilmiştir (266).

#### 2.5.4 Fizyolojik Olaylardaki Rolü

Protein kinazlar sinyalleri hücre membranından hücrenin iç bölümlerine kadar taşırlar. Bu sinyaller yalnızca ligant reseptör etkileşimleri aracılığı ile değil, hücre gerimi ve sürtünme stresi gibi çevresel uyarılardan da kaynaklanmaktadır. Protein kinazların rol oynadığı sinyal ileti yollarının etkinleşmesi sonucunda transkripsiyon faktörlerinin veya protein translasyonunun düzenlenmesi ile gen ekspresyonunda değişiklikler ortaya çıkmaktadır (257).

PKG'ler düz kas geriminin ve koroner akımının düzenlenmesi, bronkodilatasyon, bağırsak hareketleri ve sekresyonları ile böbrek ve trombosit işlevlerinin sağlanması, ağrının algılanması ve öğrenme gibi birçok fizyolojik olayda rol oynarlar (260).

Çizelge 2.8'de bazı PKG I hedefleri ve bu hedefleri fosforile ettiğinde oluşan etkiler özetlenmiştir (267, 268).

**Çizelge 2.8.** PKG I'in hedefleri ve bu hedefleri fosforile ettiğinde ortaya çıkan fizyolojik etkiler.

PKG I'in Hedefleri	Fosforilasyonun Etkisi	Ortaya Çıkan Fizyolojik Etki
IP <sub>3</sub> reseptörü	İnhibisyon	Sitozolik kalsiyum düzeyinin azalması sonucu düz kas gevşemesi
Fosfolamban	SERCA'nın etkinleşmesi	Sitozolik kalsiyum düzeyinin azalması sonucu düz kas gevşemesi
Trombositlerde tromboksan A <sub>2</sub> reseptörü	İnhibisyon	Trombosit kümeleşmesinin azalması
CREB	Etkinleşme	Fos geninin transkripsiyonunun artması
Miyozin hafif zincir fosfatazın miyozin bağlayan alt birimi	Etkinleşme	Miyozin defosforilasyonunun artması sonucunda düz kas gevşemesi
Serebellar Purkinje hücrelerinde G substratı	Fosfataz inhibitörü etkisinin artması	Bilinmiyor
Rho-kinase	İnhibisyon	Miyozin hafif zincir fosfatazın etkinleşmesi
Potasyum kanalları	Etkinleşme	Hiperpolarizasyon sonucunda L türü kalsiyum kanallarının kapanması
Rap 1b	İnhibisyon	Trombositlerin yapışması ve salgılanmasında azalma
VASP	İnhibisyon	Aktin polimerizasyonu ve yapışmasında azalma

CREB, siklik adenozin 5'-monofosfat yanıt elementini bağlayıcı protein; IP<sub>3</sub>, inozitol trifosfat; PKG, protein kinaz G; SERCA, sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPaz; VASP, vazodilatör ile stimüle edilen fosfoprotein.

PKG II ise daha çok gastrointestinal sistemde bulunan hücrelerin sıvı homeostazını (269), böbrekten renin salgılanmasını (270) ve kondrositlerde kemik gelişimini düzenleyen (271) membranal bir izoformdur.

### 2.5.5 Patolojik Olaylardaki Rolü

Protein kinazların rol oynadığı patolojik olaylar arasında birçok kanser türü ve iskemi/reperfüzyona bağlı zedelenme, hipertrofi ve aterojenez gibi kardiyovasküler bozukluklar bulunur. Kanser hücrelerinde etkin protein kinazların bulunması bu enzimlerin inhibisyonunun antitümöral ilaçlar olarak etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu yaklaşım, kanser tedavisindeki öteki yaklaşımlarından değişik bir

yaklaşım olmak ile birlikte, protein kinaz inhibitörlerinin, büyümekte olan normal hücreleri de etkileyeceklerinden, çeşitli yan etkilere de neden olabileceği ileri sürülmüştür (257).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, PKG ekspresyon ve etkinliğindeki değişikliklerin diyabetik erektil işlev bozukluğu (272), ağrı (273), ateroskleroz, hipertansiyon, restenoz ve hiperlipidemi gibi patolojiler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (274). PKG inhibitör ve etkinleştiricilerinin ağrının azaltılması, diyare, astım, anjina pectoris ve erektil işlev bozukluğu gibi durumların düzeltilmesinde kullanılması yeni tedavi yaklaşımları arasındadır (260).

## 2.6 Apoptoz

### 2.6.1 Özellikleri

Apoptoz genetik olarak belirlenmiş biyolojik önemi ve işlevi olan etkin bir hücre ölümü sürecidir. Hücrede apoptoz sırasında hücre büzülmesi, nükleer kromatinin küçük parçalara ayrılmasının ardından yoğunlaşması, membran bütünlüğünün bozulması, apoptotik parçaların oluşması ve apoptotik parçaların eliminasyonu gibi çeşitli morfolojik değişiklikler oluşmaktadır. Apoptozun göstergelerinden birisi de nükleer DNA'nın 200 baz çiftinden oluşan parçalara ayrılmasıdır.

### 2.6.2 Düzenlenmesi

Apoptotik hücre ölümü reseptör aracılıklı yol, mitokondiyal yol ve endoplazmik retikulum aracılıklı olmak üzere üç değişik yol ile gerçekleşmektedir. Reseptör aracılıklı biçimde gerçekleşen yolda Fas (CD95) antijeni monositler, makrofajlar, B ve T hücreleri gibi bağışıklık sisteminin hücrelerinin yanı sıra, karaciğer, akciğer ve kalpte de bulunan TNF ailesinden ölüm sinayallerini alan bir membran reseptörü olarak rol oynamaktadır. Fas ligandı ile etkileştikten sonra üçlü formuna geçer ve *Fas-associated death domain* (FADD)'yi etkinleştirir. FADD ise prokaspaz-8'i kaspaz-3, -6 ve -7'yi etkinleştiren etkin kaspaz-8 formuna dönüştürür. Canlı hücrelerde proenzim olarak bulunan özgül sistein proteazlardan olan kaspazlar apoptoz sürecinde etkinleşirler. Kaspazlar proteinleri aspartik asit kalıntılarından bölerek parçalarlar. Bu enzimler, hücre döngüsünün kontrolünde, bütünlüğünün sağlanmasında ve onarımında yer alan proteinleri parçalayarak DNA'yı parçalara ayıran enzimler olan endonükleazları etkinleştirerek hücrenin apoptoza girmesine neden olurlar (275, 276). Mitokondri aracılıklı gerçekleşen apoptozda ise, hücre içinden apoptoza neden olan bir uyarı geldiğinde, mitokondri membranından apoptoz etkinleştirici faktör-1 (Apaf-1) ve sitokrom-c hücre içine salıverilir. Apaf-1 ve sitokrom-c ATP varlığında kompleks

oluştururlar ve bu kompleks kaspaz-9 enzimini etkinleştirir; bu enzimin etkinleşmesi sonucunda proteolitik etkinlik tetiklenir ve hücrede ölüm süreci başlar. Endoplazmik retikulum aracılıklı apoptozda ise, henüz tam olarak aydınlatılamamak ile birlikte, kalsiyum tarafından kaspaz-12'nin etkinleştirilmesinin ve oksidatif stresin rol oynadığı ileri sürülmüştür (277, 278).

### 2.6.3 İnhibitörleri

Sepsiste gelişen organ zedelenmesinde hem nekroz hem de apoptoz rol oynamaktadır. Lenfoit dokularda ve bazı organların parenkimal dokularında artmış olan apoptozun sepsiste gelişen organ yetersizliğine neden olabileceğinden dolayı, apoptotik olayların engellenmesi sepsis tedavisinde olası bir terapötik hedef olarak görülmektedir (279). Sepsis ve sistemik yangılı yanıt sendromunda karaciğerde apoptoz geliştiği gözlenmiştir (277). Sepsis araştırmalarında kullanılan en eski yaklaşımlardan birisi kaspaz etkinliğinin önlenmesidir. Kaspaz inhibitörleri genellikle peptit türevleri olan ve kaspaz substratlarının yıkım bölgelerini taklit eden florometilketon veya klorometilketon içermektedirler (280). Kaspaz inhibitörlerinin Fas (CD95) antikor aracılıklı hepatik zedelenme modelinde etkili oldukları gözlenmiştir (278). Belirgin bir organ zedelenmesinin olmadığı modeller de dahil olmak üzere, kaspaz inhibitörleri deneysel sepsis modellerinde etkili bulunmuşlardır (281). Klinik öncesi çalışmalarda kullanılan VX-799'nin apoptotik olayların aracılık ettiği çeşitli organ yetersizliği modellerinde ve bakterilerin neden olduğu deneysel sepsis modellerinde yararlı etkiler oluşturduğu bildirilmiştir (280). *Food and Drug Administration* (FDA)'dan onaylı olan etkin protein C (Xigris®)'nin ise, endotel hücrelerinde proapoptotik genlerin ekspresyonunu *down-regüle* ederek ve yangıyı önleyen enzimlerin genlerini indükleyerek sepsis tedavisinde etkili olabileceği gösterilmiştir (282).



#### **2.6.4 Fizyolojik Olaylardaki Rolü**

Apoptoz fetüste el ve ayak parmaklarının oluşması ve aralarındaki dokunun yok olması, beyinde sinapsların oluşumu, artık hücrelerin uzaklaştırılması, menstürasyonun başlangıcında endometriyum yapısının bozulması, virüs ile enfekte olmuş hücrelerin sitotoksik T hücreleri aracılığı ile ortadan kaldırılması ve DNA'sı zedelenmiş hücrelerin uzaklaştırılması gibi çeşitli fizyolojik olaylarda önemli bir rol oynamaktadır (275, 276).

#### **2.6.5 Patolojik Olaylardaki Rolü**

Apoptoz çeşitli patolojik olaylarda da önemli bir rol oynamaktadır. Apoptozun ileri derecede engellendiği durumlarda kanser gibi patolojik durumlar gelişebilirken, aşırı uyarıldığı durumlarda ise iskemi, kardiyovasküler sistem bozuklukları, nörodejeneratif hastalıklar, immünolojik ve yangı ile belirgin hastalıklar ortaya çıkabilmektedir.

Apoptozun rol oynadığı patolojik durumlardan birisi de sepsistir. Sepsis gibi stresli bir durumda endotel hücrelerinde süperoksit anyonu, peroksinitrit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinde artış görülmektedir. Reaktif oksijen türleri mitokondriyal membran geçirgenliğini artırmakta ve sitokrom c gibi proapoptotik moleküllerin salıverilmesine neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin kaspaz-8 ve kaspaz-3'ün ekspresyonunu ve etkinliğini artırdığı da bildirilmiştir (45).

Bunların dışında ET'nin kendisi, endotel hücrelerinde ve damar düz kas hücrelerinde apoptotik etkiler oluşturabilmektedir. ET'nin neden olduğu endotelial apoptoz sepsiste ölüm riskini artıran önemli patolojik bulgulardan biridir. ET'nin sığır endotel hücrelerinde apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (283). Farelere ET uygulanmasının ardından timus ve akciğerlerde yaygın endotel hücre apoptozu geliştiği gözlenmiştir (284-287). Sepsis ile ilişkili ıveğen solunum yetersizliğinden ölen hastalarda yapılan biyopsilerde endotel hücre zedelenmesi olduğu bildirilmiştir (288). Septik hastalarda dolaşımda endotel hücresi olduğu ve bu hücrelerin oranı arttıkça,

ölüm riskinin arttığı da gösterilmiştir (289). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, endotelial apoptozun ET'ye karşı verilen yanıtta bir kilit nokta olduğunu göstermektedir. Endotel hücrelerinde ET/TLR4'ün uyarılmasının ardından kaspaz-1, -3, -6 ve 8'ün etkinleşmesi apoptoza neden olmaktadır. ET'nin kaspazları etkinleştirmesinin mekanizması tam olarak bilinmemek ile birlikte, MyD88'in FADD'ye bağlanması olası mekanizmalardan birisi olarak değerlendirilmektedir. ET'nin doğrudan etkisi dışında NF-kB aracılığı ile de endotelial apoptoz üzerinde etkisi bulunmaktadır. ET TLR4'ü uyardıktan sonra sırası ile MyD88, IRAK-1/2, TRAF-6 ve NF-kB'nin etkinleşmesine neden olur. NF-kB'nin etkinleşmesinin ardından hücre çekirdeğine geçmesi ve çeşitli transkripsiyon faktörlerini etkinleştirmesinin ardından yangının ortaya çıkmasında ve gelişmesinde rol oynayan sitokinlerin, prokoagülan faktörlerin, iNOS'un, proapoptotik ve antiapoptotik faktörlerin ekspresyonları artar (45).

ET'nin etkinleşmesine neden olduğu NF-kB aracılığı ile oluşumu artan TNF- $\alpha$ 'nın da apoptotik etkileri bulunmaktadır. TNF- $\alpha$  sfingomiyelinaz enzimini etkinleştirerek antiapoptotik bir protein olan *B-cell leukemia/lymphoma-2* (Bcl-2) inhibisyonuna neden olan seramit oluşumunun artmasına neden olarak apoptotik etkiye katkıda bulunur. Bunun dışında, oluşumu artan ve hücreden dışarı salıverilen TNF- $\alpha$  öteki hücrelerde kendi reseptörüne bağlanarak, kaspaz-8'in etkinleşmesine, ardından da apoptoza neden olur (285).

ET'nin NF-kB aracılığı ile ekspresyonu artan iNOS aracılığı ile oluşan NO tarafından apoptozun düzenlenmesine proapoptotik ve antiapoptotik olarak iki yönlü katkısı bulunmaktadır. NO'nun bu iki yönlü etkisi doza bağımlı gibi görünmektedir. Yüksek derişimdeki NO'nun (> 10  $\mu$ M) endotelial apoptozu artırmasına karşın, daha az derişimdeki NO (<10  $\mu$ M) endotelial apoptoz gelişme olasılığını azaltmaktadır (290). Yapılan çeşitli çalışmalarda ET'nin damar düz kas hücrelerinde de NO ve peroksinitrit aracılığı ile apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (291-294). ET'nin damar düz kas hücrelerinde NO'nun p53 tümör baskılayıcı genini etkinleştirmesi sonucunda apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (294).

ET'nin NO aracılığı ile apoptoz oluşturma mekanizması tam olarak aydınlatılamamak ile birlikte, NO'nun doğrudan DNA zedelenmesine neden olarak veya süperoksit anyonları ile etkileşmesi sonucunda oluşan peroksinitritin apoptoza neden olabileceği ileri sürülmüştür (295-299). DNA zedelenmesinin p53 tümör baskılayıcı geninin indüklenmesinin ve mitokondriden sitokrom c salıverilmesinin ardından kaspazların etkinleşmesine neden olarak apoptoza neden olabileceği gösterilmiştir (47). Oluşan peoksinitrit ise PARS enziminin etkinleşmesi sonucunda hücrede nikotinamid adenin dinükleotit (NAD)<sup>+</sup> ve ATP tükenmesine neden olarak apoptoz olayını tetikleyebilmektedir. ET ile inkübe edilen damar düz kas hücrelerinde mitokondriyal solunumun azalmasında bu mekanizmanın geçerli olduğu gösterilmiştir (300).

NO'nun doğrudan etkilerinin dışında siklik GMP aracılıklı apoptotik etkileri de bulunmaktadır. Kardiyomiyositler ve pankreatik B hücrelerin de S-nitrozo-N-asetilpenisilamin (SNAP) ile tetiklenen apoptozun siklik GMP inhibitörü ODQ veya PKG inhibitörü KT5822 ile önlenildiği gösterilmiştir (301-303). Siklik sGMP analogları veya çGS etkinleştiricisi YC-1'in kardiyomiyositlerde (301), insan kolon hücrelerinde (304), pulmoner arter düz kas hücrelerinde (305) ve sinir hücrelerinde (306) apoptozu tetiklediği bildirilmiştir. Bu bulgular, NO/siklik GMP aracılıklı olarak gelişen apoptozda PKG'nin önemini ortaya koymaktadır. Siklik GMP aracılıklı apoptozun mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da, siklik GMP'nin kaspazların etkinleşmesine neden olan MEKK-stres ile etkinleştirilen protein kinaz (SAPK)/ERK kinaz 1 (SEK1)-JNK1 kaskadını uyararak PKG'yi etkinleştirerek apoptoza neden olduğu ileri sürülmüştür (47, 304).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 GEREÇ

##### 3.1.1 Deney Hayvanı ve Doku

Deneyleerde 250-350 g ağırlığında erkek ve on iki saat aydınlık on iki saat karanlık periyodunda senkronize edilen doksan dokuz adet Wistar sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezi'nden sağlanmıştır. Doku olarak endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış izole torasik aorta halka preparatları kullanılmıştır. Bu tezde sıçanlar üzerinde yapılan tüm işlemler için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (07/09/2006 tarih ve 08/02 sayılı karar).

##### 3.1.2 Sarf Malzemesi

%95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> içeren gaz karışımı (Tek Oksijen, Türkiye)

β-Gliserofosfat (G9891, Sigma, Amerika)

β-Merkaptoetanol (A1108, AppliChem, Almanya)

1,4-Diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien (U0126) (1144, Tocris, Amerika)

1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kinoksalin-1-on (ODQ) (O3636, Sigma, Amerika)

9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-hekzahidro-10-metoksi-2,9-dimetil-1-okso-9,12-epoksi-1H-diindolo-[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]-benzodiazosin-10-karboksilik asit metil ester (KT5823) (K1388, Sigma, Amerika)

Akrilamit 4K çözeltisi (%30) (161-0157, Bio-Rad, Amerika)

Amonyum persülfat (A2941, AppliChem, Almanya)

*Anti- $\alpha$  smooth muscle actin mouse monoclonal IgG* (A2547, Sigma, Amerika)  
*Anti-protein kinase G rabbit polyclonal antibody* (370661, Calbiochem, Amerika)

Aprotinin (A2132, AppliChem, Almanya)  
Asetik asit (64-197, Climax, Türkiye)  
Asetilkolin klorür (A6625, Sigma, Amerika)  
Askorbik asit (1.00127, Merck, Almanya)  
Benzamidin (B6506, Sigma, Amerika)  
Bradford rejanı (B6916, Sigma, Amerika)  
Bromfenol mavisi (A3640, AppliChem, Almanya)  
*Caspase-3 cellular activity assay Kit* (235419, Calbiochem, Amerika)  
Coomassie brilliant blue R 250 (1.12553, Merck, Almanya)  
*Cyclic GMP enzyme immunoassay kit* (581021, Cayman, Amerika)  
Dimetilsülfoksit (DMSO) (60153, Riedel-de-Haën, Almanya)  
Ditiyotreytol (A2948, AppliChem, Almanya)  
Düz tabanlı, 96 kuyucuklu kültür plakları (655160, Greiner, Almanya)  
*ECL plus western blotting detection reagents* (RPN2132, Amersham, İngiltere)  
Endotoksin (*Escherichia coli* lipopolisakkaridi, O111:B4) (ET) (L4130, Sigma, Türkiye)

Eppendorf tüp (0.5 ml) (667201, Greiner, Almanya)  
Eppendorf tüp (1.5 ml) (616201, Greiner, Almanya)  
*ERK1/2 [pTpY185/187] ELISA kit* (KHO0091, Biosource, Amerika)  
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (A2937, AppliChem, Almanya)  
Fenilefrin hidroklorür (P6126, Sigma, St. Louis, Amerika)  
Fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür (1,3-PBIT) (P8227, Sigma, Amerika)

Filtre kağıdı (*blot absorbent filter paper, thin*) (162-0118, Bio-Rad, Amerika)  
Gliseril trinitrat (Adeka, Türkiye)  
Gliserol (A2926, AppliChem, Almanya)  
Glisin (A1067, AppliChem, Almanya)  
Glukoz monohidrat (Glukoz.H<sub>2</sub>O) (1.04074, Merck, Almanya)  
*Goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase* (RPN4301, Amersham, İngiltere)

*Guanylate cyclase  $\beta 1$  subunit (soluble) polyclonal antibody* (160897, Cayman, Amerika)

HEPES (A3724, AppliChem, Almanya)

Hidroklorik asit (HCl) (100314, Merck, Almanya)

*iNOS/NOS type II mouse IgG1* (610432, BD Transduction Lab., Amerika)

İzobütanol (A1150, AppliChem, Almanya)

Kalsiyum klorür dihidrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (1.02381, Merck, Almanya)

Kültür plağı için yapışkanlı kapak (676001, Greiner, Almanya)

Löpeptin (L9783, Sigma, Amerika)

Magnezyum sülfat heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (1.05886, Merck, Almanya)

*MEK1 [pSpS218/222] ELISA Kit* (KHO0321, Biosource, Amerika)

*MEK1 mouse monoclonal IgG* (SC-6250, Santa Cruz, Amerika)

Metanol (1.06008, Merck, Almanya)

Molekül ağırlığı belirteci (*Kaleidoscope prestained standard*) (Biorad, 161-0324, Amerika)

Molekül ağırlığı belirteci (*Protein marker III, 6.5-200*) (A4402, AppliChem, Almanya)

Molekül ağırlığı belirteci (*Rainbow marker, full-range*) (RPN 800E, Amersham, İngiltere)

*Nitric oxide synthase assay kit, colorimetric* (482702, Calbiochem, Amerika)

Nitroselüloz membran (*nitrocellulose membrane*) (162-0112, Bio-Rad, Amerika)

Noradrenalin hidroklorür ([DL]-norepinephrine hydrochloride) (A7256, Sigma, St. Louis, Amerika)

*p44/42 MAPK rabbit polyclonal IgG* (9102, Cell Signalling, Amerika)

Pastör pipeti, plastik (3 ml)

Pipet ucu (3685290, Greiner, Almanya)

Pipet ucu (3686290, Greiner, Almanya)

Pipet ucu (685290, Greiner, Almanya)

Pipet ucu (686290, Greiner, Almanya)

Pipet ucu (770291, Greiner, Almanya)

Pipet, cam (5, 10, 20 ve 25 ml)

Ponceau S (A1405, AppliChem, Almanya)  
Potasyum dihidrojen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (1.04873, Merck, Almanya)  
Potasyum klorür (KCl) (1.04936, Merck, Almanya)  
*p-p44/42 MAPK mouse monoclonal IgG* (SC-7383, Santa Cruz, Amerika)  
p-VASP (16C2) (SC-101439, Santa Cruz, Amerika)  
Serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter, Türkiye)  
*Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase* (RPN4201, Amersham, İngiltere)  
Sığır serum albumini (SSA) (A7906, Sigma, Amerika)  
Sodyum bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) (1.02405, Merck, Almanya)  
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (A2263, AppliChem, Almanya)  
Sodyum klorür (NaCl) (1.06404, Merck, Almanya)  
Sodyum ortovanadat (A2196, AppliChem, Almanya)  
Sodyum pirofosfat (A2197, AppliChem, Almanya)  
*Spacer plate* (10.1 x 8.2 cm, 1.5 mm) (165-3312, Bio-Rad, Amerika)  
Sülfosalisilik asit (A0416, AppliChem, Almanya)  
Tetrametiletildiamin (TEMED) (A1148, AppliChem, Almanya)  
Trikloroasetik asit (A1431, AppliChem, Almanya)  
Tris (A2264, AppliChem, Almanya)  
Tween 20 (A4974, AppliChem, Almanya)  
Yağsız kurutulmuş süt tozu (*non-fat dry milk*) (A0830, AppliChem, Almanya)

ET ve 1,3-PBIT serum fizyolojik, U0126 DMSO (%71, hacim/hacim [h/h]), asetilkolin, fenilefrin ve gliseril trinitrat distile su, noradrenalin %0.1 (a/h) askorbik asit içeren 0.01 N HCl ve ODQ ile KT5823 DMSO (%0.3, h/h) içinde çözülerek hazırlanmıştır. Krebs-Henseleit çözeltisi olarak kullanılmak üzere NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 15 ve glukoz.H<sub>2</sub>O 11 mM derişimde olacak biçimde distile su içinde çözülmüştür (43).

### 3.1.3 Teçhizat

- %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> içeren gaz karışım tüpü (Tek Oksijen, Türkiye)
- Bilgisayarlı veri kayıt sistemi (MP30 Hardware Unit ve Student Lab Software, Biopac Systems Inc., Commat İletişim Ltd., Türkiye)
- 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)
- Comb* (10 wells, 1.5 mm) (165-3365, Bio-Rad, Amerika)
- 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 T8, IKA-WERKE GmbH & Co. KG, Almanya)
- Jel dokümantasyon ve analiz sistemi (UVP, EC3 imaging system, UK)
- Kan basıncı kayıt sistemi ve ısıtıcılı bölme (*Indirect Blood Pressure Recorder System*, Model BPHR 9610, Commat İletişim Ltd., Türkiye)
- Miyograf (*Tissue Bath Myograph*, Model 700MO) ve bilgisayar kontrollü özel kaydedici sistem (Commat İletişim Ltd., Türkiye)
- 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)
- Plak okuma cihazı (405, 450, 490, 550 ve 630 nm olmak üzere beş adet filtreli) (ELX800, Biotek, Türkiye)
- Protein elektroforez sistemi
- Mighty small II* (10x8 cm, complete) (SE250-10A-.75, Hofer, Almanya)
- EV 265 consort power supply* (230 VAC) (PS265-230V, Hofer, Almanya)
- TE 77X semi-dry transfer unit* (TE77X, Hofer, Almanya)
- Red rotor orbital shaker* (PR500-176, Hofer, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (Model Mikro 22R, Hettich, Almanya)



Ultrasonik banyo (ısıtmalı, frekans ayarlı) (Elmasonic S 40 / (H), Elma, Almanya)

Üstten kefeli terazi (Model SPB 52, Scaltec, Almanya)

Yüksek devirli ve soğutmalı santrifüj (Model Mikro 22R, Hettich, Almanya)

## 3.2 YÖNTEM

### 3.2.1 *In Vivo* Çalışmalar

Aşağıda belirtilen gruplarda *in vivo* çalışmalar yapılmıştır:

Grup 1. Kontrol grubu olarak serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) uygulanan sıçanlar (35-37, 39, 44, 307)

Grup 2. Endotoksik şok grubu olarak ET (10 mg/kg, IP) uygulanan sıçanlar (35-37, 39, 44, 307)

Grup 3. Seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) uygulanan sıçanlar (35, 36, 39, 44, 307)

Grup 4. ET ile birlikte 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) uygulanan sıçanlar (35, 36, 44, 39, 307)

Grup 5. MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 (5 mg/kg, IP) uygulanan sıçanlar (44)

Grup 6. ET ile birlikte U0126 (5 mg/kg, IP) uygulanan sıçanlar (44)

OAB ve KH ölçümleri için, sıçanların kuyruğundan ölçüm yapılmasına olanak veren kan basıncı kayıt sistemi kullanılmıştır. Sıçanlara serum fizyolojik veya ET enjeksiyonundan hemen önce ve uygulandıktan bir, iki, üç ve dört saat sonra OAB ve KH kayıtları alınmıştır. Serum fizyolojik veya ET enjeksiyonundan bir saat sonra ise 1,3-PBIT veya U0126 uygulanmasının ardından birinci, ikinci ve üçüncü saatlerde OAB ve KH kayıtları alınmıştır. Deneyler sonunda, sıçanlar öldürülerek kan ve torasik aortaları alınmıştır. Alınan kanlardan hazırlanan serum örnekleri iNOS etkinliği

ölçülmesine kadar -20 °C'de dondurularak saklanmıştır. Torasik aortaların bir parçası vasküler kontraktilete çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanmıştır; kalan parçası ise enzim protein ekspresyonu ve etkinliği ölçümü amacı ile doku homojenatları hazırlanmaya kadar -20° C'de dondurularak saklanmıştır.

### 3.2.2 Vasküler Kontraktilite Çalışmaları

Serum fizyolojik, ET, 1,3-PBIT ve/veya U0126 uygulanan sıçanlar servikal dislokasyon yapıldıktan sonra karotis arterleri kesilerek öldürülmüşlerdir. Arkus aortadan başlanarak izole edilen torasik aorta, içerisinde Krebs-Henseleit çözeltisi bulunan petri kabına alınarak çevre dokulardan temizlenmiştir. Bazı dokuların endotel tabakası bir forseps yardımı ile uzaklaştırılmıştır (308). Eni 2-3 mm olan halka biçiminde torasik aorta preparatlarının her biri 250 µm kalınlığında paslanmaz çelikten yapılmış teller arasına yerleştirilerek içinde 37 °C'de Krebs-Henseleit çözeltisi bulunan ve %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> gaz karışımı ile havalandırılan 6 ml hacimde banyo içeren miyografa yerleştirilmiştir. Dokular 1.5 g ön-gerim altında her on beş dakikada bir ortam çözeltisi değiştirilerek ve gerim kontrol edilerek dengelenmeye bırakılmışlardır. Bir buçuk saat sonra dengelenen dokulara α-adrenerjik reseptör agonisti olan fenilefrin submaksimal derişimde 2.6 µM (EC<sub>85</sub>, 2.6±0.3 µM, n= 22) (43) üç kez uygulanmıştır.

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü uygulanmasından üç saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastırılmış endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında fenilefrin ile elde edilen birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları ile ilgili bulgular Çizelge 3.1'de verilmiştir. Serum fizyolojik uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda, dokularda fenilefrin ile alınan birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında fark yokken ( $F= 2.85$ ,  $P > 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda fenilefrin ile alınan birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında farklılık olduğu görülmüştür ( $F= 6.77$ ,  $P= 0.0022$ ). İstatistiksel analizler tek-yönlü varyans analizi ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak yapıldığında, birinci kasılma yanıtları ikinci ve

**Çizelge 3.1.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastırılmış endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında fenilefrin ile elde edilen birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları.

	Fenilefrin		
	Birinci kasılma	İkinci kasılma	Üçüncü kasılma
<b>Kontrol</b>			
E(+)	1.02±0.08 (n= 22)	1.18±0.10 (n= 22)	1.36±0.12 (n= 22)
E(-)	1.61±0.11 (n= 21)	2.04±0.14 (n= 21) <sup>a</sup>	2.33±0.17 (n= 21) <sup>a</sup>
<b>ET</b>			
E(+)	0.91±0.09 (n= 21)	0.99±0.11 (n= 21)	1.13±0.14 (n= 21)
E(-)	1.41±0.08 (n= 21)	1.65±0.12 (n= 21)	1.93±0.12 (n= 21) <sup>a</sup>
<b>1,3-PBIT</b>			
E(+)	1.14±0.13 (n= 12)	1.34±0.15 (n= 12)	1.62±0.19 (n= 12)
E(-)	1.15±0.13 (n= 12)	1.42±0.11 (n= 12)	1.69±0.16 (n= 12) <sup>a</sup>
<b>ET+1,3-PBIT</b>			
E(+)	1.07±0.08 (n= 13)	1.14±0.11 (n= 13)	1.23±0.14 (n= 13)
E(-)	1.59±0.10 (n= 13)	1.80±0.15 (n= 13)	2.19±0.13 (n= 13) <sup>ab</sup>
<b>U0126</b>			
E(+)	0.82±0.06 (n= 10)	1.05±0.08 (n= 10)	1.36±0.12 (n= 10) <sup>ab</sup>
E(-)	1.21±0.07 (n= 10)	1.60±0.13 (n= 10) <sup>a</sup>	2.13±0.12 (n= 10) <sup>ab</sup>
<b>ET+U0126</b>			
E(+)	0.98±0.17 (n= 14)	1.19±0.20 (n= 14)	1.29±0.19 (n= 14)
E(-)	1.35±0.12 (n= 14)	1.61±0.17 (n= 14)	1.90±0.19 (n= 14)

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöre) dihidrobromür; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel taakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiy) bütadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Fenilefrin 2.6 µM derişimde kullanılmıştır. Sonuçlar g olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. <sup>a</sup> birinci ve <sup>b</sup> ikinci kasılma yanıtı değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi;  $P < 0.05$ ).

üçüncü kasılma yanıtlarından farklıyken ( $P < 0.05$ ), ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ). ET uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda, fenilefrin ile alınan birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında fark yokken ( $F= 1.00$ ,  $P > 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda fenilefrin ile alınan birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında farklılık olduğu görülmüştür ( $F= 6.17$ ,  $P= 0.0037$ ). İstatistiksel analizler tek-yönlü varyans analizi ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak yapıldığında, birinci kasılma yanıtları üçüncü kasılma yanıtlarından farklıyken ( $P < 0.05$ ), ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ). 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda, fenilefrin ile alınan birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında fark yokken ( $F= 2.35$ ,  $P > 0.05$ ), endotel

tabakası uzaklaştırılmış dokularda fenilefrin ile alınan birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında farklılık olduğu görülmüştür ( $F= 4.02, P= 0.0275$ ). İstatistiksel analizler tek-yönlü varyans analizi ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak yapıldığında, birinci kasılma yanıtları üçüncü kasılma yanıtlarından farklıyken ( $P < 0.05$ ), ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ). ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda, fenilefrin ile alınan birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında fark yokken ( $F= 0.49, P > 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda fenilefrin ile alınan birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında farklılık olduğu görülmüştür ( $F= 5.89, P= 0.0061$ ). İstatistiksel analizler tek-yönlü varyans analizi ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak yapıldığında, üçüncü kasılma yanıtları, birinci ve ikinci kasılma yanıtlarından farklıyken ( $P < 0.05$ ), birinci ve ikinci kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ). U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 9.21, P= 0.0009$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 18.06, P < 0.0001$ ) dokularda, fenilefrin ile alınan birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında farklılık olduğu görülmüştür. İstatistiksel analizler tek-yönlü varyans analizi ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak yapıldığında, endotel tabakası sağlam dokularda birinci ve ikinci kasılma yanıtları arasında fark yokken ( $P > 0.05$ ), üçüncü kasılma yanıtlarının birinci ve ikinci kasılma yanıtlarından farklı olduğu görülmüştür ( $P < 0.05$ ); endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında farklılık olduğu görülmüştür ( $P < 0.05$ ). ET ile birlikte U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 0.74, P > 0.05$ ) ve uzaklaştırılmış dokularda ( $F= 2.86, P > 0.05$ ), fenilefrin ile alınan birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında fark olmadığı görülmüştür. Bu bulgulara göre, üçüncü kez fenilefrin uygulanan dokuların dengelendiği kabul edilmiştir.

Dengelenen dokuların fenilefrin ( $2.6 \mu\text{M}$ ) ile üçüncü kez önceden kastırılmasının ardından, endotel hücrelerinde muskarinik  $M_3$ -reseptörlerin uyarılması sonucunda NOS aracılığı ile oluşan NO'nun salıverilmesine bağlı olarak gevşeme oluşturan bir madde olan asetilkolin ( $100 \mu\text{M}$ ) uygulanarak endotel tabakasının sağlam olup olmadığı kontrol edilmiştir (43, 309). Serum fizyolojik, ET, 1,3-PBIT, ET+1,3-

PBIT, U0126 veya ET+U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda, asetilkolin sırası ile  $0.81\pm 0.07$  g (n= 22),  $0.33\pm 0.07$  g (n= 21),  $0.77\pm 0.11$  g (n= 12),  $0.38\pm 0.06$  g (n= 13),  $0.75\pm 0.07$  g (n= 10) ve  $0.46\pm 0.14$  g (n= 14) gevşeme oluşturmuştur. Aynı deney gruplarında, fenilefrin ile oluşan kasılmanın %'si olarak hesaplandığında, asetilkolin ile oluşan  $63\pm 3$  (n= 22),  $33\pm 4$  (n= 21),  $55\pm 6$  (n= 12),  $30\pm 4$  (n= 13),  $56\pm 4$  (n= 10) ve  $34\pm 6$  (n= 14) oranındaki gevşeme yanıtları, çalışılan torasik aorta preparatlarının endotel tabakasının sağlam olduğunu ve endotelial NO aracılıklı düz kas gevşemelerinde bir sorun olmadığını göstermektedir. Serum fizyolojik, ET, 1,3-PBIT, ET+1,3-PBIT, U0126 veya ET+U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise, asetilkolin ile elde edilen gevşemelerin tamamen ortadan kalkması ( $P < 0.05$ ), çalışılan torasik aorta preparatlarının endotel tabakasının etkili bir biçimde uzaklaştırıldığını ve endotel hücrelerinden kaynaklanan NO'nun noradrenalin ile elde edilen kasılmalara katkısının olamayacağını göstermektedir.

Dokuların fenilefrin ile önceden kastırılmasının ve asetilkolin uygulamasının ardından, damar düz kas hücrelerinde NO veya bir NO türevine (S-nitrozotiyol) dönüşerek guanilil siklazın etkinleşmesi sonucunda artan siklik GMP aracılığı ile endotelden bağımsız olarak gevşeme oluşturan bir madde olan gliseril trinitrat ( $10 \mu\text{M}$ ) uygulanarak düz kasın gevşeme işlevi test edilmiştir (43, 310, 311). Serum fizyolojik, ET, 1,3-PBIT, ET+1,3-PBIT, U0126 veya ET+U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda, gliseril trinitrat sırası ile  $0.51\pm 0.07$  g (n= 22),  $0.58\pm 0.08$  g (n= 21),  $0.72\pm 0.13$  g (n= 12),  $0.68\pm 0.10$  g (n= 13),  $0.54\pm 0.09$  g (n= 10) ve  $0.66\pm 0.09$  g (n= 14) gevşeme oluşturmuştur. Aynı deney gruplarında, fenilefrin ile elde edilen kasılmanın %'si olarak hesaplandığında, gliseril trinitrat ile oluşan  $94\pm 2$  (n= 22),  $77\pm 2$  (n= 21),  $97\pm 4$  (n= 12),  $85\pm 3$  (n= 13),  $86\pm 2$  (n= 10) ve  $79\pm 1$  (n= 14) oranındaki gevşeme yanıtları, çalışılan torasik aorta preparatlarının, endotelial NO'dan bağımsız olarak gelişen düz kas gevşemelerinde bir sorun olmadığını göstermektedir. Serum fizyolojik, ET, 1,3-PBIT, ET+1,3-PBIT, U0126 veya ET+U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise, gliseril trinitrat sırası ile  $2.09\pm 0.14$  g (n= 21),  $1.70\pm 0.10$  g (n= 21),  $1.80\pm 0.19$  g (n= 12),  $2.09\pm 0.10$  g (n= 13),  $1.87\pm 0.14$  g (n= 10) ve  $1.61\pm 0.17$  g (n= 14) gevşeme oluşturmuştur. Aynı

deney gruplarında, fenilefrin ile elde edilen kasılmanın %'si olarak hesaplandığında, gliseril trinitrat ile oluşan  $96\pm3$  (n= 21),  $86\pm2$  (n= 21),  $102\pm3$  (n= 12),  $96\pm3$  (n= 13),  $93\pm2$  (n= 10) ve  $86\pm2$  (n= 14) oranındaki gevşeme yanıtları, çalışılan endotel tabakası uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarının, endotelial NO'dan bağımsız olarak gelişen düz kas gevşemelerinde bir sorun olmadığını göstermektedir.

Krebs-Henseleit çözeltisi ile yıkanarak başlangıç ön-gerimine ulaşan dokularda noradrenalin (0.001-100  $\mu\text{M}$ ) ile kümülatif derişim-yanıt eğrileri çıkarılmıştır. Noradrenalin ile kontrol derişim-yanıt eğrilerinin alınmasının ardından, noradrenalin ortamdan uzaklaştırılmış, dokular ortamda seçici  $\text{GS}$  inhibitörü ODQ ve seçici PKG inhibitörü KT5823'ün çözücüsü olan DMSO (%0.3, h/h) veya ODQ (3  $\mu\text{M}$ ) (312) veya KT5823 (1  $\mu\text{M}$ ) (313) yokken ve varken on beş dakika inkübe edilmiş ve noradrenalin derişim-yanıt eğrileri yinelenmiştir. Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarının DMSO, ODQ veya KT5823 ile on beş dakika inkübasyonu sonrasında bazal gerimde oluşan değişiklikler Çizelge 3.2'de verilmiştir. Serum fizyolojik, ET, 1,3-PBIT, ET+1,3-PBIT, U0126 veya ETU0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam veya uzaklaştırılmış dokuların DMSO veya KT5823 ile on beş dakika inkübasyonu sonrasında bazal gerimde bir değişiklik olmamıştır. Öte yandan, serum fizyolojik, ET, 1,3-PBIT, ET+1,3-PBIT, U0126 veya ET+U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam veya uzaklaştırılmış dokuların ODQ ile on beş dakika inkübasyonu sonrasında bazal gerim artmıştır. ET+1,3-PBIT grubundan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ODQ'nun bazal gerimi artırıcı etkisi kontrol ( $P= 0.0008$ ), ET ( $P= 0.0140$ ) ve 1,3-PBIT ( $P= 0.0221$ ) gruplarına göre daha azdır. ET+1,3-PBIT grubundan izole edilen endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise ODQ'nun bazal gerimi artırıcı etkisi 1,3-PBIT grubuna göre daha çoktur ( $P= 0.0228$ ). Endotel tabakasının uzaklaştırılması ile ODQ'nun bazal gerimi artırıcı etkisi kontrol grubunda azalmış ( $P= 0.0360$ ), ET+1,3-PBIT grubunda artmış ( $P= 0.0070$ ), ET ve 1,3-PBIT gruplarında ise değişmemiştir ( $P > 0.05$ ). Gerek kontrol ve gerekse endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası

sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda U0126'nın ODQ'nun bazal gerimi artırıcı etkisi üzerinde oluşturduğu değişiklikler arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ).

**Çizelge 3.2.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarının DMSO, ODQ veya KT5823 ile on beş dakika inkübasyonu sonrasında bazal gerimde oluşan değişiklikler.

<b>DMSO, ODQ veya KT5823 ile inkübasyondan sonra ölçülen kasılma (g)</b>		
	<b>E(+)</b>	<b>E(-)</b>
<b>Kontrol</b>		
<i>DMSO</i>	0.00±0.00 (n= 5)	0.00±0.00 (n= 5)
<i>ODQ</i>	1.30±0.14 (n= 11)	0.66±0.27 (n= 8) <sup>d</sup>
<i>KT5823</i>	0.00±0.00 (n= 6)	0.00±0.00 (n= 6)
<b>ET</b>		
<i>DMSO</i>	0.00±0.00 (n= 5)	0.00±0.00 (n= 5)
<i>ODQ</i>	1.37±0.26 (n= 8)	1.24±0.26 (n= 8)
<i>KT5823</i>	0.00±0.00 (n= 6)	0.00±0.00 (n= 6)
<b>1,3-PBIT</b>		
<i>DMSO</i>	0.00±0.00 (n= 5)	0.00±0.00 (n= 5)
<i>ODQ</i>	0.90±0.25 (n= 6)	0.34±0.22 (n= 6)
<i>KT5823</i>	0.00±0.00 (n= 6)	0.00±0.00 (n= 6)
<b>ET+1,3-PBIT</b>		
<i>DMSO</i>	0.00±0.00 (n= 7)	0.00±0.00 (n= 7)
<i>ODQ</i>	0.37±0.08 (n= 7) <sup>abc</sup>	1.08±0.18 (n= 7) <sup>cd</sup>
<i>KT5823</i>	0.00±0.00 (n= 6)	0.00±0.00 (n= 6)
<b>U0126</b>		
<i>DMSO</i>	0.00±0.00 (n= 5)	0.00±0.00 (n= 5)
<i>ODQ</i>	1.23±0.18 (n= 5)	0.52±0.33 (n= 5)
<i>KT5823</i>	0.00±0.00 (n= 5)	0.00±0.00 (n= 5)
<b>ET+U0126</b>		
<i>DMSO</i>	0.00±0.00 (n= 7)	0.00±0.00 (n= 7)
<i>ODQ</i>	1.19±0.20 (n= 7)	1.43±0.32 (n= 7)
<i>KT5823</i>	0.00±0.00 (n= 7)	0.00±0.00 (n= 7)

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöre) dihidrobromür; DMSO, dimetilsülfoksit; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; KT5823, (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-heksahidro-10-metoksi-2,9-dimetil-1-okso-9,12-epoksi-1H-diindolo-[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]-benzodiazosin-10-karboksilik asit metil ester; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; ODQ, 1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kinoksalin-1-on; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiy) bütadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Noradrenalin ile kontrol derişim-yanıt eğrilerinin alınmasının ardından, noradrenalin ortamdan uzaklaştırılmış ve dokular ortamda ODQ ve KT5823'ün çözücüsü olan DMSO (%0.3, h/h) veya ODQ (3 µM) veya KT5823 (1 µM) yokken ve varken on beş dakika inkübe edilmiştir. Sonuçlar g olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. <sup>a</sup> Kontrol/ODQ, <sup>b</sup> ET/ODQ, <sup>c</sup> 1,3-PBIT/ODQ ve <sup>d</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).

Serum fizyolojik veya ET uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam veya uzaklaştırılmış dokularda ortamda DMSO yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan maksimum etki ( $E_{maks}$ ) ve derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan %50 etki oluşturan derişim ( $EC_{50}$ ) değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı olmadığından ( $P > 0.05$ ), bu sonuçlar birleştirilerek değerlendirilmiştir (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya ET uygulamasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri üzerinde DMSO'nun etkisi.

	$E_{maks}$ (g)	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)
<b>Kontrol</b>		
<b>DMSO (-)</b>		
E(+)	1.51±0.13 (n= 11)	0.69±0.20 (n= 11)
E(-)	2.65±0.18 (n= 9)	0.15±0.06 (n= 9)
<b>DMSO (+)</b>		
E(+)	1.26±0.25 (n= 5)	0.39±0.10 (n= 5)
E(-)	2.24±0.26 (n= 5)	0.08±0.02 (n= 5)
<b>ET</b>		
<b>DMSO (-)</b>		
E(+)	1.22±0.22 (n= 8)	0.39±0.10 (n= 8)
E(-)	2.22±0.53 (n= 8)	0.22±0.08 (n= 8)
<b>DMSO (+)</b>		
E(+)	1.08±0.20 (n= 7)	0.81±0.28 (n= 7)
E(-)	1.94±0.43 (n= 7)	0.51±0.1 (n= 7)

DMSO, dimetilsülfoksit; DMSO (-), ortamda DMSO yok; DMSO (+), ortamda DMSO var; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ET, endotoksin. Serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) uygulanan sıçanlar in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Noradrenalin ile kontrol derişim-yanıt eğrilerinin alınmasının ardından, noradrenalin ortamdan uzaklaştırılmış, dokular ortamda 1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kinoksalin-1-on (ODQ) ve (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-heksahidro-10-metoksi-2,9-dimetil-1-okso-9,12-epoksi-1H-diindolo-[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]-benzodiazosin-10-karboksilik asit metil ester (KT5823)'ün çözücüsü olan DMSO (%0.3, h/h) yokken veya varken on beş dakika inkübe edilmiş ve noradrenalin derişim-yanıt eğrileri yinelenmiştir. Sonuçlar g veya  $\mu$ M olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir.

ET'nin noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında oluşturduğu değişiklikler üzerinde sistemik iNOS veya ERK1/2 inhibisyonunun etkilerinin araştırıldığı vasküler kontraktilite çalışmalarında serum fizyolojik, ET, 1,3-PBIT, ET+1,3-PBIT, U0126 veya ET+U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam veya uzaklaştırılmış dokularda noradrenalin ile ilk kez çıkarılan derişim-yanıt eğrileri değerlendirilmiştir.



ET'nin noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında oluşturduğu değişiklikler üzerinde sistemik iNOS veya ERK1/2 ile birlikte *in vitro* olarak çGS veya PKG inhibisyonunun etkilerinin araştırıldığı vasküler kontraktilite çalışmalarında ise serum fizyolojik, ET, 1,3-PBIT, ET+1,3-PBIT, U0126 veya ET+U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam veya uzaklaştırılmış dokularda noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan derişim-yanıt eğrileri değerlendirilmiştir.

### **3.2.3 Dokuların Homojenize Edilmesi ve Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması**

Dondurulmuş dokular çözüldükten sonra tartılmış ve üzerine 1.5 ml HEPES tamponu (mM: HEPES 20 [pH 7.5],  $\beta$ -gliserofosfat 20, sodyum pirofosfat 20, benzamidin 10, ditiyotreytol 1, sodyum ortovanadat 0.2, sodyum florür 20, EDTA 2, löpeptin 20 ve aprotinin 10) (35-37, 39, 44, 307) eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenatlar 36.000 x g'de on dakika 4 °C'de santrifüj edildikten sonra, süpernatantlar toplanmış, üzerlerine 50  $\mu$ l 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, MEK1, ERK1/2, iNOS, çGS, PKG,  $\alpha$ -düz kas düz kas aktini ve kaspaz-3 protein ekspresyonu ve/veya etkinliği ile ilgili ölçümler yapılincaya kadar dondurularak saklanmıştır.

### **3.2.4 Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Toplam Protein Düzeyinin Ölçülmesi**

Doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda toplam protein miktarı Coomassie mavisi yöntemi ile ölçülmüştür (314). Standart olarak kullanılan SSA'nın %1 ağırlık/hacim (a/h) derişimde olacak biçimde distile suda hazırlanan stok çözeltisinden, 0-50  $\mu$ l SSA içeren dizi dilüsyonları (0-50  $\mu$ g/ml) hazırlanmış ve toplam hacimleri distile su ile 800  $\mu$ l'ye ayarlanmıştır. Aynı biçimde, 5  $\mu$ l süpernatant üzerine 795  $\mu$ l distile su eklenerek 800  $\mu$ l hacimde çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler

üzerine 200 µl Bradford reajanı 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.

### **3.2.5 Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda $\alpha$ -Düz Kas Aktini Protein Ekspresyon Düzeyi ile MEK1, ERK1/2, iNOS, $\alpha$ GS, PKG ve Kaspaz-3 Protein Ekspresyon Düzeyleri ve/veya Etkinliğinin ve Serumda iNOS Etkinliğinin Ölçülmesi**

$\alpha$ -Düz kas aktini protein düzeyi ile MEK1, ERK1/2, iNOS,  $\alpha$ GS, PKG ve kaspaz-3 protein düzeyi ve/veya etkinliği daha önce tanımlanan yöntemlere göre ölçülmüştür (36, 39). 70 µl HEPES tamponu içinde 70-140 µg protein ve 5 µl Laemmlı örnek tamponu (5 ml tris çözeltisi [0.5 M, pH 6.8], 4 ml gliserol, 40 mg bromfenol mavisi, 0.8 g SDS ve 0.8 ml  $\beta$ -merkaptoetanol 10 ml distile su içinde; kullanılmadan hemen önce 1/4 oranında distile su ile seyreltilmiştir) içeren doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda iki dakika kaynatılmış, 4 °C'de 36.000 x g'de beş dakika santrifüj edilmiş, 50-60 µl'de 78-100 µg toplam protein olacak biçimde üst jelde oluşturulan çukurlardan üçüncü ve sekizinci çukurlara eklenmiş ve %10 SDS-poliakrilamit jel elektroforez yöntemi ile iki-dört saatlik bir sürede ayrılmıştır. Alt jel olarak 6.7 ml 30'luk akrilamit 4K çözeltisi, 5 ml tris çözeltisi (1.5 M, pH 8.8), 0.2 ml %10'luk SDS çözeltisi, 7.9 ml distile su, 0.2 ml %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0.008 ml TEMED, üst jel olarak da 1.7 ml 30'luk akrilamit 4K çözeltisi, 1.25 ml tris çözeltisi (1 M, pH 6.8), 0.1 ml %10'luk SDS çözeltisi, 6.8 ml distile su, 0.1 ml %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0.01 ml TEMED kullanılmıştır. Üst jelde oluşturulan çukurlardan birinci ve onuncu çukurlara 10 µl Laemmlı örnek tamponu, ikinci çukura renkli (12-225 kDa molekül ağırlığında protein standardı) ve dokuzuncu çukura renksiz (6.5-200 kDa molekül ağırlığında protein standardı) olmak üzere 10 µl molekül ağırlığı belirteci eklenmiştir. Elektroforez tampon çözeltisi olarak 500 ml distile su içinde 15 g

tris, 72 g glisin ve 5 g SDS içeren bir çözelti (pH 8.3) hazırlanmış ve kullanılmadan hemen önce 1/10 oranında seyreltilerek pH değeri 8.3'e ayarlanmıştır.

Jeldeki proteinler ise yarı-kuru aktarma (*semi-dry transfer*) yöntemi ile dört saatlik bir sürede nitroselüloz membrana aktarılmıştır; bu işlem için 800 ml distile su içinde 5.8 g tris, 2.9 g glisin ve 0.37 g SDS içeren bir çözelti (pH 8.3) hazırlanmış ve kullanılmadan hemen önce pH değeri 8.3'e ayarlanarak üzerine 200 ml etanol (%20) eklenmiştir.

Jelden proteinlerin nitroselüloz membrana ne derecede aktarıldığının anlaşılabilmesi için, jeller proteinleri özgül olmayan bir biçimde geri dönüşümsüz olarak bağlayan Coomassie mavisi boyama yöntemi ile boyanmıştır (315). Coomassie mavisi çözeltisi (1 L distile su içinde 0.25 g Coomassie *brilliant blue* R 250, 400 ml metanol ve 70 ml asetik asit) içinde 4 °C'de on iki saat inkübe edilen jeller, boyasızlaştırma çözeltisi I (*destaining solution I*) (20 ml metanol, 3.5 ml asetik asit ve 26.5 ml distile su) içinde otuz dakika inkübe edildikten sonra, boyasızlaştırma çözeltisi II (*destaining solution II*) (3.5 ml asetik asit, 2.5 ml metanol, 44 ml distile su ve 0.5 ml gliserol) içinde inkübe edilmiştir. Jelin zeminindeki mavi renk açılıncaya dek boyasızlaştırma çözeltisi II bir veya iki kez değiştirilmiştir. Ayrıca, jelden proteinlerin nitroselüloz membrana ne derecede aktarıldığının anlaşılabilmesi için membranlar proteinleri geri dönüşümlü olarak bağlayan Ponceau S boyası (100 ml distile su içinde 2 g Ponceau S, 30 g trikloroasetik asit, 30 g sülfosalisilik asit; kullanılmadan hemen önce 1/10 oranında distile su ile seyreltilmiştir) ile boyanmış ve distile su ile yıkanmıştır (316).

Proteinlerin jelden membrana aktarımının sağlandığı görüldükten sonra, membranlar tris tampon çözeltisi (TTÇ) (3 g tris, 8 g NaCl, 2 g KCl ve 0.5 ml Tween 20 [%0.05] 1 L distile içinde, pH 7.4) ile yıkanmış, yağsız kurutulmuş süt tozu (YKST) ve/veya SSA içeren TTÇ ile bloke edilmiş ve primer antikorlar ile oda sıcaklığında bir veya iki saat ya da 4 °C'de on iki saat inkübe edilmiştir. Membranlar, bağlanmamış proteinler TTÇ ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında bir saat inkübe edilmiştir. Bazı deneylerde etkin olmayan enzim protein

düzeylerini ölçmek için fosforile proteinler için kullanılan membranlar, TTÇ ile yıkandıktan sonra bir çözelti (*stripping solution*) (50 ml distile su içinde 0.35 ml  $\beta$ -merkaptoetanol, 3.125 ml tris çözeltisi [1.5 M, pH 8.8] ve 10 ml %10'luk SDS çözeltisi) ile 50 °C'de otuz dakika inkübe edilmiş, TTÇ ile yıkanmış, %2 YKST + %2 SSA karışımı ile bloke edilmiş, TTÇ ile yıkanmış ve fosforile olmayan proteinlere için primer ve sekonder antikorlar ile inkübe edilmeye hazır duruma getirilmiştir.  $\alpha$ -düz kas aktini protein düzeyi ile MEK1, ERK1/2, iNOS, çGS ve PKG protein ekspresyonu ve/veya etkinliğinin en iyi biçimde ölçülebilmesi için yapılan işlemler ve kullanılan antikorların özellikleri Çizelge 3.4'de özetlenmiştir.

Coomassie mavisi yöntemi ile boyanan jeller doğrudan, nitroselüloz membranda bulunan immünoreaktif proteinler ise membranların görüntüleme çözeltisi (*ECL plus western blotting detection reagents; RPN 2132, Amersham*) ile inkübe edilmesinin ardından Jel Dökümentasyon ve Analiz Sistemi kullanılarak belirlenmiştir.

Ayrıca, doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda MEK1 etkinliği *MEK1 [pSpS218/222] ELISA kit*, ERK1/2 etkinliği *ERK1/2 [pTpY185/187] ELISA kit*, iNOS etkinliği *Nitric oxide synthase assay kit, colorimetric*, çGS etkinliği *Cyclic GMP enzyme immunoassay kit* ve kaspaz-3 etkinliği *Caspase-3 cellular activity assay kit* ve serumda iNOS etkinliği *Nitric oxide synthase assay kit, colorimetric* kullanılarak prospektüslerinde yazıldığı biçimde *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* yöntemi ile ölçülmüştür.

**Çizelge 3.4.**  $\alpha$ -Düz kas aktini protein düzeyi ile MEK1, ERK1/2, iNOS, çGS ve PKG protein ekspresyonu ve/veya etkinliğinin ölçülmesinde yapılan işlemler ve kullanılan antikörlerin özellikleri.

Protein	Molekül Ağırlığı (kDa)	Membran Blokajı	Primer Antikor	Sekonder Antikor
$\alpha$ -Düz kas aktini	43	%5 YKST içeren TTÇ içinde, oda sıcaklığında bir saat; üç kez beş dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Anti-<math>\alpha</math> smooth muscle actin mouse monoclonal IgG</i> (A2547, Sigma) (%5 SSA içeren TTÇ içinde 1:500 oranında) (4 °C'de on iki saat inkübasyon); üç kez beş dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase</i> (RPN 4201, Amersham) (%0.1 SSA içeren TTÇ içinde 1:1.000 oranında) (oda sıcaklığında bir saat inkübasyon); üç kez beş dakika TTÇ ile yıkama
MEK1	45	%5 YKST içeren TTÇ içinde, oda sıcaklığında bir saat; dört kez on dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>MEK1 mouse monoclonal IgG</i> (SC-6250, Santa Cruz) (%5 SSA içeren TTÇ içinde 1:500 oranında) (4 °C'de on iki saat inkübasyon); üç kez beş dakika TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase</i> (RPN 4201, Amersham) (%0.1 SSA içeren TTÇ içinde 1:1.000 oranında) (oda sıcaklığında bir saat inkübasyon); üç kez on dakika TTÇ ile yıkama
Fosforile ERK1/2	44/42	%2 SSA içeren TTÇ içinde, oda sıcaklığında bir saat; dört kez on dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>p-p44/42 MAPK mouse monoclonal IgG</i> (SC-7383, Santa Cruz) (%5 SSA içeren TTÇ içinde 1:100 oranında) (4 °C'de on iki saat inkübasyon); üç kez beş dakika TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase</i> (RPN 4201, Amersham) (%5 YKST içeren TTÇ içinde 1:1.000 oranında) (oda sıcaklığında bir saat inkübasyon); üç kez on dakika TTÇ ile yıkama
ERK1/2	44/42	%5 SSA içeren TTÇ içinde, oda sıcaklığında bir saat; beş kez on dakika süre TTÇ ile yıkama (bazı deneyler için*)	<i>p44/42 MAPK rabbit polyclonal IgG</i> (9102, Cell Signalling) (%5 SSA içeren TTÇ içinde 1:500 oranında) (4 °C'de on iki saat inkübasyon); üç kez beş dakika TTÇ ile yıkama	<i>Goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase</i> (RPN 4301, Amersham) (%0.1 SSA içeren TTÇ içinde 1:1000 oranında) (oda sıcaklığında bir saat inkübasyon); üç kez on dakika TTÇ ile yıkama
iNOS	130	%5 YKST içeren TTÇ içinde, oda sıcaklığında bir saat; beş kez on dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>iNOS mouse monoclonal IgG1</i> (610432, BD Transduction Lab.) (%5 SSA içeren TTÇ içinde 1:500 oranında) (4 °C'de on iki saat inkübasyon); beş kez on dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase</i> (RPN 4201, Amersham) (%0.1 SSA içeren TTÇ içinde 1:1.000 oranında) (oda sıcaklığında bir saat inkübasyon); beş kez on dakika TTÇ ile yıkama

**Çizelge 3.4. (devam)**  $\alpha$ -Düz kas aktini protein düzeyi ile MEK1, ERK1/2, iNOS, çGS ve PKG protein ekspresyonu ve/veya etkinliğinin ölçülmesinde yapılan işlemler ve kullanılan antikorların özellikleri.

Protein	Molekül Ağırlığı (kDa)	Membran Blokajı	Primer Antikor	Sekonder Antikor
çGS	70	---*	<i>Guanylate cyclase <math>\beta</math>1 subunit (soluble) polyclonal antibody</i> (160897, Cayman) (%5 SSA içeren TTÇ içinde 1:500 oranında) (4 °C'de on iki saat inkübasyon); dört kez on dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase</i> (RPN 4301, Amersham) (%0.1 SSA içeren TTÇ içinde 1:1.000 oranında) (oda sıcaklığında bir saat inkübasyon); dört kez on dakika TTÇ ile yıkama
PKG	~ 78	%5 SSA içeren TTÇ içinde, oda sıcaklığında bir saat; dört kez on dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Anti-protein kinase G rabbit polyclonal antibody</i> (370661, Calbiochem) (%5 SSA içeren TTÇ içinde 1:500 oranında) (4 °C'de on iki saat inkübasyon); üç kez beş dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase</i> (RPN 4301, Amersham) (%0.1 SSA içeren TTÇ içinde 1:1.000 oranında) (oda sıcaklığında bir saat inkübasyon); dört kez beş dakika TTÇ ile yıkama
Fosforile VASP	46/50	%5 SSA içeren TTÇ içinde, oda sıcaklığında bir saat; dört kez on dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>p-VASP (16C2) (SC-101439, Santa Cruz)</i> (%5 SSA içeren TTÇ içinde 1:500 oranında) (4 °C'de on iki saat inkübasyon); üç kez beş dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase</i> (RPN 4201, Amersham) (%0.1 SSA içeren TTÇ içinde 1:1.000 oranında) (oda sıcaklığında bir saat inkübasyon); üç kez on dakika TTÇ ile yıkama

çGS, çözünebilir guanilil siklaz; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; PKG, protein kinaz G; SSA, sığır serum albumini; TTÇ, tris tampon çözeltisi; p-VASP, vazodilatör ile uyarılan fosfoprotein; YKST, yağsız kurutulmuş süt tozu. \* Daha önce kullanılıp da yeniden kullanıma hazır duruma getirilen membranlar kullanılmıştır.

### 3.2.6 Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama±ortalamların standart hatası olarak gösterilmiştir. Kullanılan sıçan sayısı  $n$  ile ifade edilmiştir. Asetilkolin ile oluşan gevşemeler, fenilefrin ile elde edilen maksimum kasılmanın %'si olarak hesaplanmıştır. Gliseril trinitrat ile oluşan gevşemeler ise, fenilefrin ile elde edilen maksimum kasılmadan asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtı çıkarıldıktan sonra kalan fenilefrin ile elde edilen kasılmanın %'si olarak hesaplanmıştır. Noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları gram olarak ifade edilmiştir. Aynı deney hayvanından izole edilen dokularda aynı koşullarda yapılan deneylerden elde edilen bazı sonuçlar birleştirilerek değerlendirilmiştir. Doğrusal olmayan regresyon yöntemi ile maksimumum kasılma yanıtı ( $E_{maks}$ ) ve maksimum kasılmanın %50'sini oluşturan noradrenalin derişimi ( $EC_{50}$ ) değerleri hesaplanmıştır. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Kruskal-Wallis testi ve ardından Dunns çoklu karşılaştırmalar testi ile Student's  $t$  testi veya Mann-Whitney  $U$  testleri kullanılmıştır.  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinin hesabı ile istatistiksel analizler GraphPad Prism version 3.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, Amerika) paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel olarak 0.05'ten küçük  $P$  değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1 *In Vivo* Çalışmalar

#### 4.1.1 ET'nin OAB ve KH Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya ET uygulanmasından sonra OAB ve KH'de oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Çizelge 4.1 ile Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Sıçanlara serum fizyolojik uygulanmasından sonra dört saat içinde OAB ( $F=0.76$ ,  $P > 0.05$ ) ve KH ( $F= 2.06$ ,  $P > 0.05$ ) değerlerinde bir değişiklik görülmemiştir. Öte yandan, ET uygulanmasından sonra dört saat içinde OAB azalırken ( $F= 44.63$ ,  $P < 0.0001$ ), KH'de artma gözlenmiştir ( $F= 4.48$ ,  $P= 0.0023$ ). Oluşan değişikliklerin birinci saatten itibaren kontrol grubundan da anlamlı bir biçimde farklı olması, sıçanlarda endotoksemik şok modelinin oluşturulduğunu göstermektedir.

#### 4.1.2 ET ile Azalan OAB ve Artan KH Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi

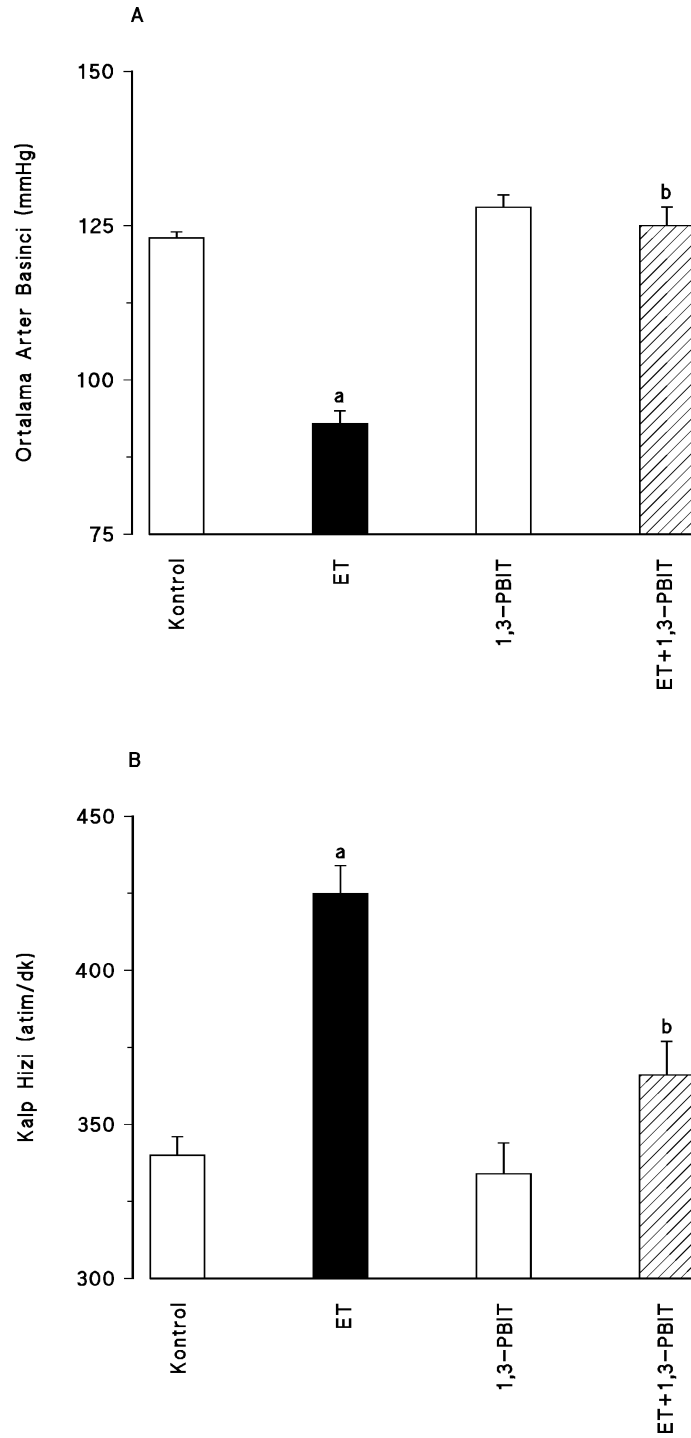
Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya ET enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanan seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile OAB ve KH'de oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.



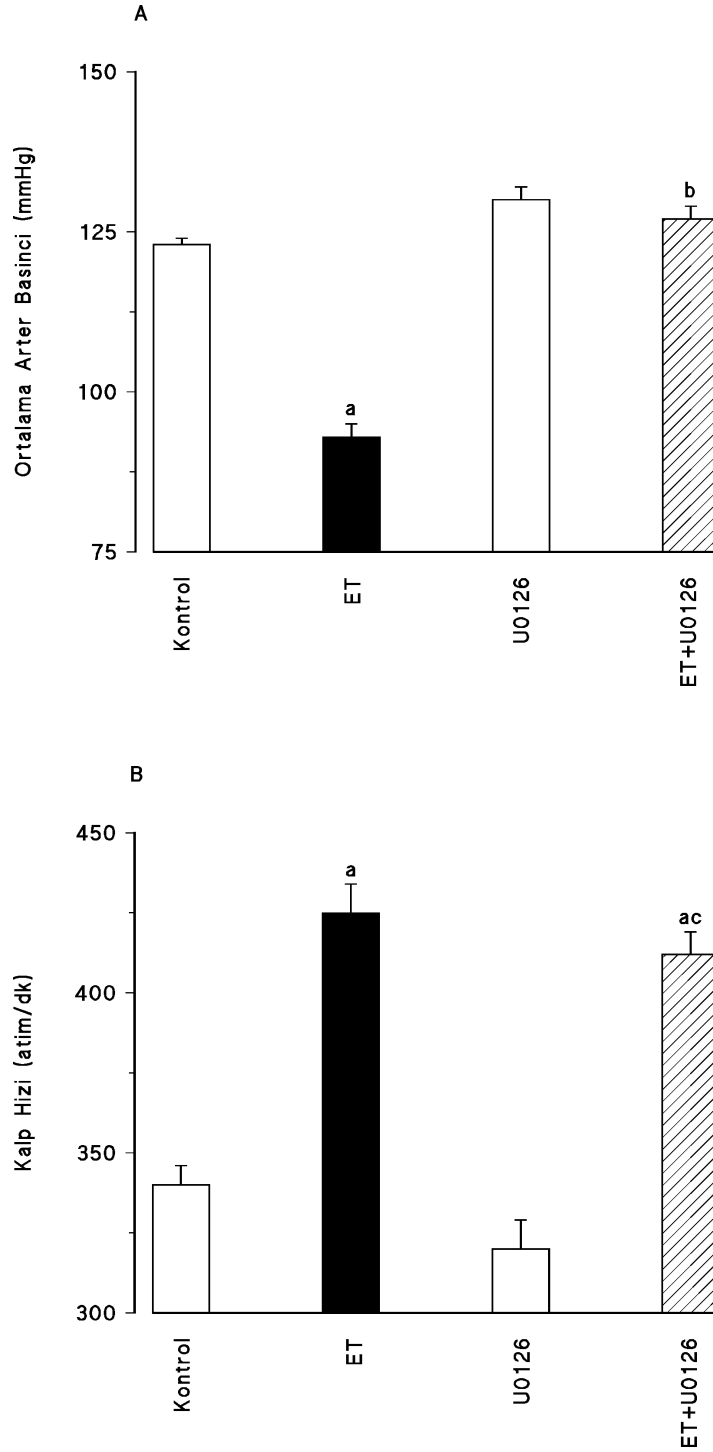
**Çizelge 4.1.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlarda seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın OAB ve KH üzerindeki etkisi.

	ET uygulanmasından sonra geçen süre (saat)				
	0	1	2	3	4
<b>Kontrol</b>					
<b>OAB</b>	124±1 (n= 29)	125±1 (n= 29)	125±2 (n= 18)	125±2 (n= 17)	123±1 (n= 29)
<b>KH</b>	358±5 (n= 29)	349±6 (n= 29)	348±7 (n= 18)	336±8 (n= 17)	340±6 (n= 29)
<b>ET</b>					
<b>OAB</b>	124±1 (n= 21)	94±2 <sup>ac</sup> (n= 21)	94±2 <sup>ac</sup> (n= 19)	95±2 <sup>ac</sup> (n= 19)	93±2 <sup>ac</sup> (n= 21)
<b>KH</b>	367±9 (n= 21)	405±8 <sup>ac</sup> (n= 21)	403±11 <sup>ac</sup> (n= 19)	412±14 <sup>ac</sup> (n= 19)	425±9 <sup>ac</sup> (n= 21)
<b>1,3-PBIT</b>					
<b>OAB</b>	126±1 (n= 12)	128±2 (n= 11)	127±2 (n= 12)	129±2 (n= 12)	128±2 (n= 12)
<b>KH</b>	352±8 (n= 12)	345±10 (n= 11)	343±14 (n= 12)	343±14 (n= 12)	334±10 (n= 12)
<b>ET+1,3-PBIT</b>					
<b>OAB</b>	129±2 (n= 13)	99±4 <sup>ace</sup> (n= 13)	120±3 <sup>bf</sup> (n= 10)	124±2 <sup>bf</sup> (n= 12)	125±3 <sup>bf</sup> (n= 13)
<b>KH</b>	369±10 (n= 13)	407±14 <sup>ace</sup> (n= 13)	367±11 <sup>bf</sup> (n= 10)	364±13 <sup>bf</sup> (n= 12)	366±11 <sup>bf</sup> (n= 13)
<b>U0126</b>					
<b>OAB</b>	129±1 (n= 10)	128±2 (n= 10)	130±2 (n= 9)	133±2 (n= 8)	130±2 (n= 8)
<b>KH</b>	337±10 (n= 10)	318±9 (n= 10)	317±13 (n= 9)	315±6 (n= 8)	320±9 (n= 8)
<b>ET+U0126</b>					
<b>OAB</b>	128±2 (n= 14)	97±2 <sup>ade</sup> (n= 14)	118±2 <sup>bdef</sup> (n= 10)	121±2 <sup>bdef</sup> (n= 13)	127±2 <sup>bfg</sup> (n= 14)
<b>KH</b>	347±6 (n= 14)	398±9 <sup>ade</sup> (n= 14)	398±12 <sup>ade</sup> (n= 10)	402±8 <sup>ade</sup> (n= 13)	412±7 <sup>ade</sup> (n= 14)

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; KH, kalp hızı; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; OAB, ortalama arter basıncı; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyö)butadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. OAB değerleri mmHg ve KH değerleri atım hızı/dakika olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> ET, <sup>c</sup> 1,3-PBIT ve <sup>d</sup> U0126 değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi;  $P < 0.05$ ). <sup>e</sup> 0., <sup>f</sup> 1. ve <sup>g</sup> 2. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi;  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.1.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlarda seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT'nin (A) OAB ve (B) KH üzerindeki etkisi. 1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyüüre) dihidrobromür; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; KH, kalp hızı; OAB, ortalama arter basıncı. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. 10-29 adet sıçandan serum fizyolojik veya ET uygulanmasından dört saat sonra elde edilen OAB değerleri mmHg ve KH değerleri atım hızı/dakika olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol ve <sup>b</sup> ET değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi;  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.2.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlarda MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın (A) OAB ve (B) KH üzerindeki etkisi. ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; KH, kalp hızı; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; OAB, ortalama arter basıncı; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien. U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. 10-29 adet sıçandan serum fizyolojik veya ET uygulanmasından dört saat sonra elde edilen OAB değerleri mmHg ve KH değerleri atım/dakika olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> ET ve <sup>c</sup> U0126 değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi;  $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT tek başına uygulandığında sıfırncı, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerde ölçülen OAB ve KH değerlerinde oluşan değişiklikler anlamlı değildir (OAB:  $F= 0.45, P > 0.05$ ; KH:  $F= 0.45, P > 0.05$ ). 1,3-PBIT tek başına uygulandığında ölçülen OAB ( $F= 1.59, P > 0.05$ ) ve KH ( $F= 0.33, P > 0.05$ ) ( $F= 1.01, P > 0.05$ ) değerleri kontrol grubundan da farklı değildir. ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan grupta, ET enjeksiyonundan bir saat sonra azalan OAB ( $F= 19.11, P < 0.0001$ ) ve artan KH ( $F= 2.56, P= 0.0486$ ), 1,3-PBIT uygulanmasından sonraki birinci, ikinci ve üçüncü saatlerde önlenmiştir. ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan grup, ET grubu ile karşılaştırıldığında ise 1,3-PBIT, ET ile oluşan OAB'deki azalmayı ( $F= 44.92, P < 0.0001$ ) ve KH'deki artmayı ( $F= 4.69, P < 0.0001$ ) ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerde önlediği görülmüştür. ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan grupta ölçülen OAB ve KH değerleri arasındaki farklılık birinci saat değerleri dışında kontrol (OAB:  $F= 14.59, P < 0.0001$ ; KH:  $F= 5.56, P < 0.0001$ ) veya 1,3-PBIT (OAB:  $F= 15.01, P < 0.0001$ ; KH:  $F= 3.47, P= 0.0008$ ) gruplarından farklı değildir. Bu bulgular, ET uygulanmasından bir saat sonra oluşan hipotansiyona ve KH'deki artmaya iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun katkıda bulunduğunu göstermektedir.

#### **4.1.3 ET ile Azalan OAB ve Artan KH Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi**

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya ET enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanan MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 ile OAB ve KH'de oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

U0126 tek başına uygulandığında sıfırncı, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerde ölçülen OAB ve KH değerlerinde oluşan değişiklikler anlamlı değildir (OAB:  $F= 0.79, P > 0.05$ ; KH:  $F= 0.90, P > 0.05$ ). U0126 tek başına uygulandığında ölçülen OAB ( $F= 3.33, P= 0.0009$ ) ve KH ( $F= 3.92, P= 0.0002$ ) değerleri kontrol grubundan farklıdır; öte yandan, U0126 ile sıfırncı, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerde ölçülen değerlerin kontrol grubundan farklı olmadığı görülmüştür ( $P > 0.05$ ). ET ile birlikte U0126 uygulanan grupta, ET enjeksiyonundan bir saat sonra azalan OAB ( $F=$

51.38,  $P < 0.0001$ ), U0126 uygulanmasından sonraki birinci, ikinci ve üçüncü saatlerde önlenmiştir; öte yandan, U0126 uygulandıktan sonra birinci, ikinci ve üçüncü saatlerde, ET enjeksiyonundan bir saat sonra artan KH ( $F= 10.32$ ,  $P < 0.0001$ ) değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ). ET ile birlikte U0126 uygulanan grup, ET grubu ile karşılaştırıldığında ise U0126, ET ile oluşan OAB'deki azalmayı ( $F= 59.12$ ,  $P < 0.0001$ ) ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerde önlemiştir; öte yandan, U0126 uygulandıktan sonra birinci, ikinci ve üçüncü saatlerde, ET enjeksiyonundan bir saat sonra artan KH ( $F= 5.37$ ,  $P < 0.0001$ ) değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ). ET ile birlikte U0126 uygulanan grupta ölçülen OAB değerleri arasındaki farklılık birinci saat değerleri dışında kontrol grubundan farklı değildir ( $F= 24.79$ ,  $P < 0.0001$ ); öte yandan, ET ile birlikte U0126 uygulanan grupta ölçülen KH değerleri arasındaki farklılık sıfırıncı saat değerleri dışında kontrol grubundan daha çoktur ( $KH: F= 15.61$ ,  $P < 0.0001$ ). ET ile birlikte U0126 uygulanan grupta ölçülen OAB değerleri arasındaki farklılık birinci, ikinci ve üçüncü saat değerleri dışında U0126 grubundan farklı değildir ( $F= 39.22$ ,  $P < 0.0001$ ); öte yandan, ET ile birlikte U0126 uygulanan grupta ölçülen KH değerleri arasındaki farklılık sıfırıncı saat değerleri dışında U0126 grubundan daha çoktur ( $KH: F= 21.14$ ,  $P < 0.0001$ ). Bu bulgular, ET uygulanmasından bir saat sonra oluşan hipotansiyona MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki, dolayısı ile etkinliğindeki artışın katkıda bulunduğunu göstermektedir; öte yandan, ERK1/2 etkinliğindeki artış, ET uygulanmasından bir saat sonra artan KH'ye katkıda bulunmamaktadır.

## 4.2 Vasküler Kontraktilite Çalışmaları

### 4.2.1 ET'nin Asetilkolin ve Gliseril Trinitrat ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastırılmış endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında asetilkolin ve gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları ile ilgili bulgular Çizelge 4.2 ile Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.

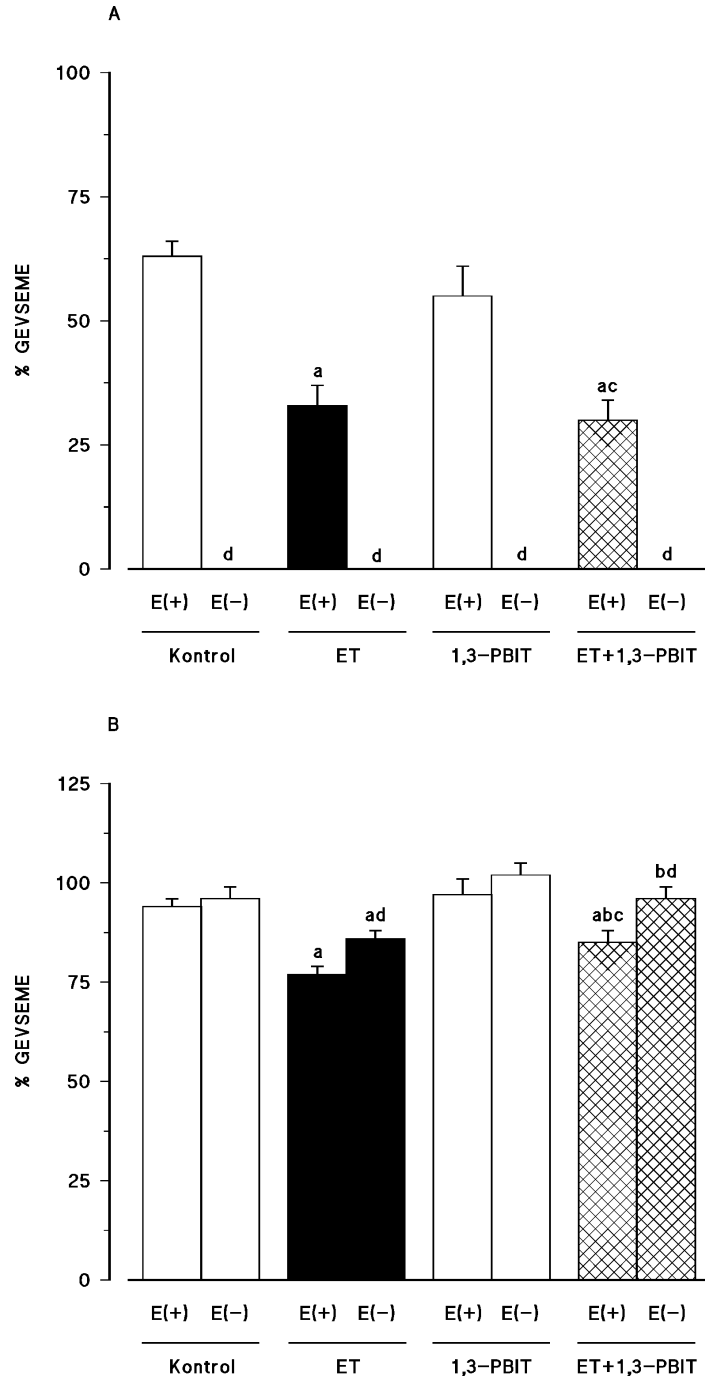
ET, endotel tabakası sağlam dokularda asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarında azalmaya neden olurken ( $P < 0.0001$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ). Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin torasik aorta endotel hücrelerinde muskarinik  $M_3$ -reseptörlerin uyarılması sonucunda NOS aracılığı ile NO oluşumunda azalmaya neden olarak NO aracılıklı gevşeme yanıtlarını bozduğunu göstermektedir.

ET, endotel tabakası sağlam ( $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $P= 0.0071$ ) dokularda gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtlarında azalmaya neden olmuştur. Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin torasik aorta preparatlarında NO veya S-nitrozotiyol oluşumu ile guanilil siklazın etkinleşmesi sonucunda artan siklik GMP aracılığı ile endotelden bağımsız olarak gelişen düz kas gevşeme yanıtlarını azalttığını göstermektedir.

**Çizelge 4.2.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastırılmış endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında asetilkolin ve gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları.

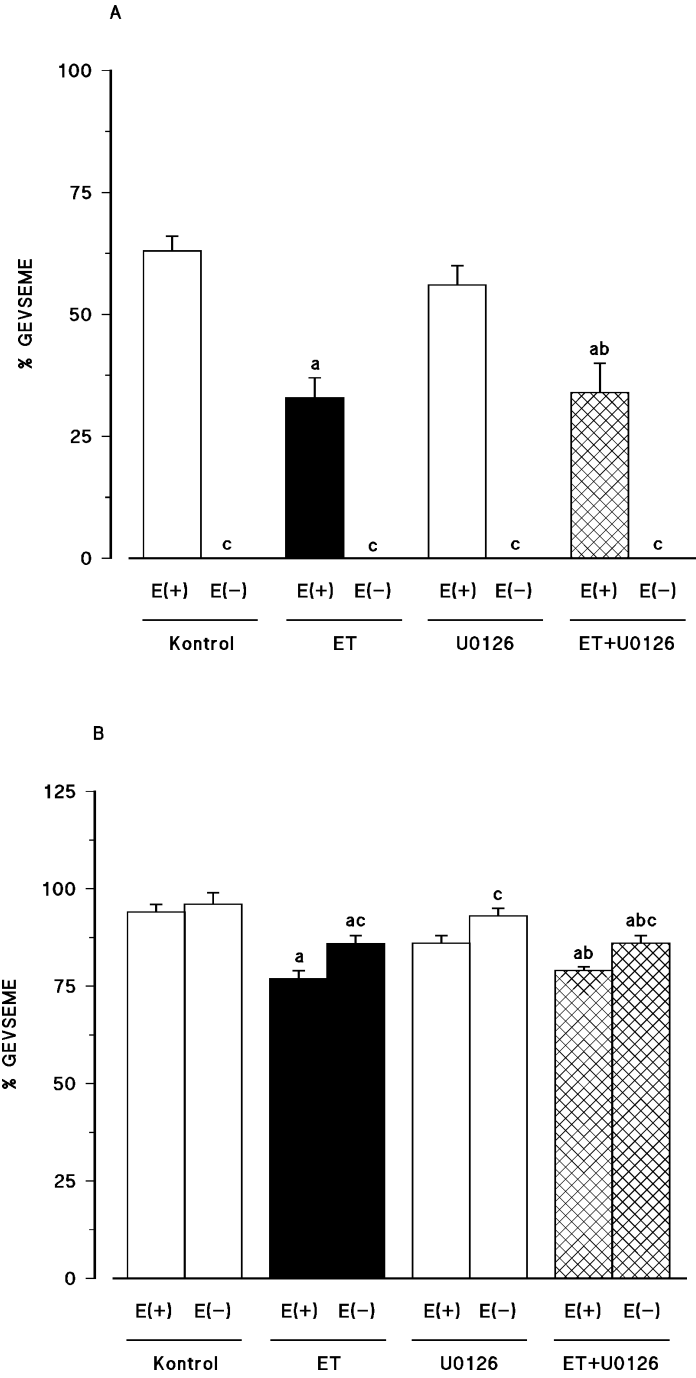
	Asetilkolin	Gliseril trinitrat
<b>Kontrol</b>		
E(+)	63±3 (n= 22)	94±2 (n= 22)
E(-)	0±0 <sup>e</sup> (n= 21)	96±3 (n= 21)
<b>ET</b>		
E(+)	33±4 <sup>a</sup> (n= 21)	77±2 <sup>a</sup> (n= 21)
E(-)	0±0 <sup>e</sup> (n= 21)	86±2 <sup>ac</sup> (n= 21)
<b>1,3-PBIT</b>		
E(+)	55±6 (n= 12)	97±4 (n= 12)
E(-)	0±0 <sup>e</sup> (n= 12)	102±3 (n= 12)
<b>ET+1,3-PBIT</b>		
E(+)	30±4 <sup>ac</sup> (n= 13)	85±3 <sup>abc</sup> (n= 13)
E(-)	0±0 <sup>e</sup> (n= 13)	96±3 <sup>bc</sup> (n= 13)
<b>U0126</b>		
E(+)	56±4 (n= 10)	86±2 (n= 10)
E(-)	0±0 <sup>e</sup> (n= 10)	93±2 <sup>e</sup> (n= 10)
<b>ET+U0126</b>		
E(+)	34±6 <sup>ad</sup> (n= 14)	79±1 <sup>ad</sup> (n= 14)
E(-)	0±0 <sup>e</sup> (n= 14)	86±2 <sup>adc</sup> (n= 14)

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromüre; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyö)bütadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Asetilkolin 100 µM ve gliseril trinitrat 10 µM derişimlerde kullanılmıştır. Sonuçlar % olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> ET, <sup>c</sup> 1,3-PBIT, <sup>d</sup> U0126 ve <sup>e</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.3.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastırılmış endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında (A) asetilkolin ve (B) gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları. 1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Asetilkolin 100  $\mu$ M ve gliseril trinitrat 10  $\mu$ M derişimlerde kullanılmıştır. 12-22 adet sıçandan elde edilen sonuçlar % olarak ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> ET, <sup>c</sup> 1,3-PBIT ve <sup>d</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).





**Şekil 4.4.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastrılmış endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında (A) asetilkolin ve (B) gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları. E(+), Endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien. U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Asetilkolin 100  $\mu$ M ve gliseril trinitrat 10  $\mu$ M derişimlerde kullanılmıştır. 10-22 adet sıçandan elde edilen sonuçlar % olarak ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> U0126 ve <sup>c</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).

#### 4.2.2 ET ile Azalan Asetilkolin ve Gliseril Trinitrat ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastrılmış endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında asetilkolin ve gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları ile ilgili bulgular Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

ET'nin endotel tabakası sağlam dokularda asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarında neden olduğu azalma, seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile önlenmemiştir ( $P > 0.05$ ). 1,3-PBIT tek başına endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarında bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ). ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtları, gerek kontrol ( $P < 0.0001$ ) ve gerekse 1,3-PBIT tek başına uygulandığında elde edilen yanıtlara göre daha azdır ( $P = 0.0022$ ).

Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin torasik aorta endotel hücrelerinde muskarinik  $M_3$ -reseptörlerin uyarılması sonucunda NOS aracılığı ile NO oluşumunda azalmaya neden olarak NO aracılıklı gevşeme yanıtlarını bozucu etkisine iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun katkıda bulunmadığını göstermektedir.

ET'nin endotel tabakası sağlam ( $P = 0.0444$ ) ve uzaklaştırılmış ( $P = 0.0037$ ) dokularda gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtlarında neden olduğu azalma, seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile önlenmiştir. 1,3-PBIT tek başına endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtlarında bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ). ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları, gerek kontrol ( $P = 0.0038$ ) ve gerekse 1,3-PBIT tek başına uygulandığında elde edilen yanıtlara göre daha azken ( $P = 0.0105$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin torasik aorta preparatlarında NO veya S-nitrozotiyol oluşumu ile guanilil siklazın etkinleşmesi sonucunda artan siklik GMP aracılığı ile endotelden bağımsız olarak gelişen düz kas gevşeme yanıtlarını azaltıcı etkisine endotel ve/veya düz kas hücrelerinde iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun katkıda bulunduğunu göstermektedir.

#### **4.2.3 ET ile Azalan Asetilkolin ve Gliseril Trinitrat ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastırılmış endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında asetilkolin ve gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları ile ilgili bulgular Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.

ET'nin endotel tabakası sağlam dokularda asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarında neden olduğu azalma, MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 ile önlenmemiştir ( $P > 0.05$ ). U0126 tek başına endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarında bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ). ET ile birlikte U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtları, gerek kontrol ( $P < 0.0001$ ) ve gerekse U0126 tek başına uygulandığında elde edilen yanıtlara göre daha azdır ( $P < 0.0001$ ). Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin torasik aorta endotel hücrelerinde muskarinik  $M_3$ -reseptörlerin uyarılması sonucunda NOS aracılığı ile NO oluşumunda azalmaya neden olarak NO aracılıklı gevşeme yanıtlarını bozucu etkisine MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki, dolayısı ile etkinliğindeki artışın katkıda bulunmadığını göstermektedir.

ET'nin endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtlarında neden olduğu azalma, MEK1 tarafından ERK1/2

fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 ile önlenememiştir ( $P > 0.05$ ). U0126 tek başına endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtlarında bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ). ET ile birlikte U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları, gerek kontrol ( $P < 0.0001$ ) ve gerekse U0126 tek başına uygulandığında elde edilen yanıtlara göre daha azdır ( $P = 0.0052$ ); endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları, gerek kontrol ( $P = 0.0184$ ) ve gerekse U0126 tek başına uygulandığında elde edilen yanıtlara göre daha azdır ( $P = 0.0204$ ).

Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin torasik aorta preparatlarında NO veya S-nitrozotiyol oluşumu ile guanilil siklazın etkinleşmesi sonucunda artan siklik GMP aracılığı ile endotelden bağımsız olarak gelişen düz kas gevşeme yanıtlarını azaltıcı etkisine endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki, dolayısı ile etkinliğindeki artışın katkıda bulunmadığını göstermektedir.

#### **4.2.4 Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının Asetilkolin ve Gliseril Trinitrat ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları Üzerindeki Etkisi**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen fenilefrin ile önceden kastırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının asetilkolin ve gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.2 ile Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.

Serum fizyolojik, ET, 1,3-PBIT, ET+1,3-PBIT, U0126 veya ET+U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtlarını tamamen ortadan kaldırmıştır ( $P < 0.05$ ). Endotel tabakasının uzaklaştırılması serum fizyolojik veya 1,3-PBIT uygulanan

sıçanlardan izole edilen dokularda gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtlarında bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ). Öte yandan, endotel tabakasının uzaklaştırılması ET ( $P= 0.0035$ ), ET+1,3-PBIT ( $P= 0.0109$ ), U0126 ( $P= 0.0353$ ) veya ET+U0126 ( $P= 0.0086$ ) uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardaki gevşeme yanıtlarının artmasına neden olmuştur.

Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin endotel tabakası uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında NO veya S-nitrozotiyol oluşumu ile guanilil siklazın etkinleşmesi sonucunda artan siklik GMP aracılığı ile endotelden bağımsız olarak gelişen düz kas gevşeme yanıtlarını azaltıcı etkisine endotel hücreleri olduğu kadar düz kas hücrelerinde iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun katkıda bulunduğunu göstermektedir. Öte yandan bulgularımız, ET'nin gliseril trinitrat ile oluşan gevşeme yanıtlarını azaltıcı etkisine endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki, dolayısı ile etkinliğindeki artışın katkıda bulunmadığı bulgusunu desteklemektedir.

#### **4.2.5 ET'nin Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtları Üzerindeki Etkisi**

##### **4.2.5.1 Derişim-Yanıt Eğrileri**

Sıçanlara serum fizyolojik veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları ile ilgili bulgular Çizelge 4.3 ile Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

Noradrenalin 0.001-100  $\mu$ M derişim aralığında, derişime bağımlı olarak bütün dokularda kasılma oluşturmuştur. ET, endotel tabakası sağlam ( $F= 64.02$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış dokularda ( $F= 87.62$ ;  $P < 0.0001$ ) noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir biçimde sağa kaymasına neden olmuştur.

Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.003-100  $\mu\text{M}$  ve uzaklaştırılmış dokularda özellikle 0.01-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları kontrol grubuna göre daha azdır ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2.5.2 $E_{\text{maks}}$ ve $EC_{50}$ değerleri

Sıçanlara serum fizyolojik veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{\text{maks}}$  ve  $EC_{50}$  değerleri Çizelge 4.4 ile Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

ET, endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda  $E_{\text{maks}}$  değerlerinde azalmaya ( $P$  değerleri sırası ile 0.0010 ve 0.0001),  $EC_{50}$  değerlerinde ise artmaya ( $P$  değerleri sırası ile 0.0013 ve 0.0053) neden olmuştur.

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyona aynı zamanda torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarında azalmanın da eşlik ettiğini göstermektedir.

#### 4.2.6 ET ile Azalan Noradrenalin Kasılma Yanıtları Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi

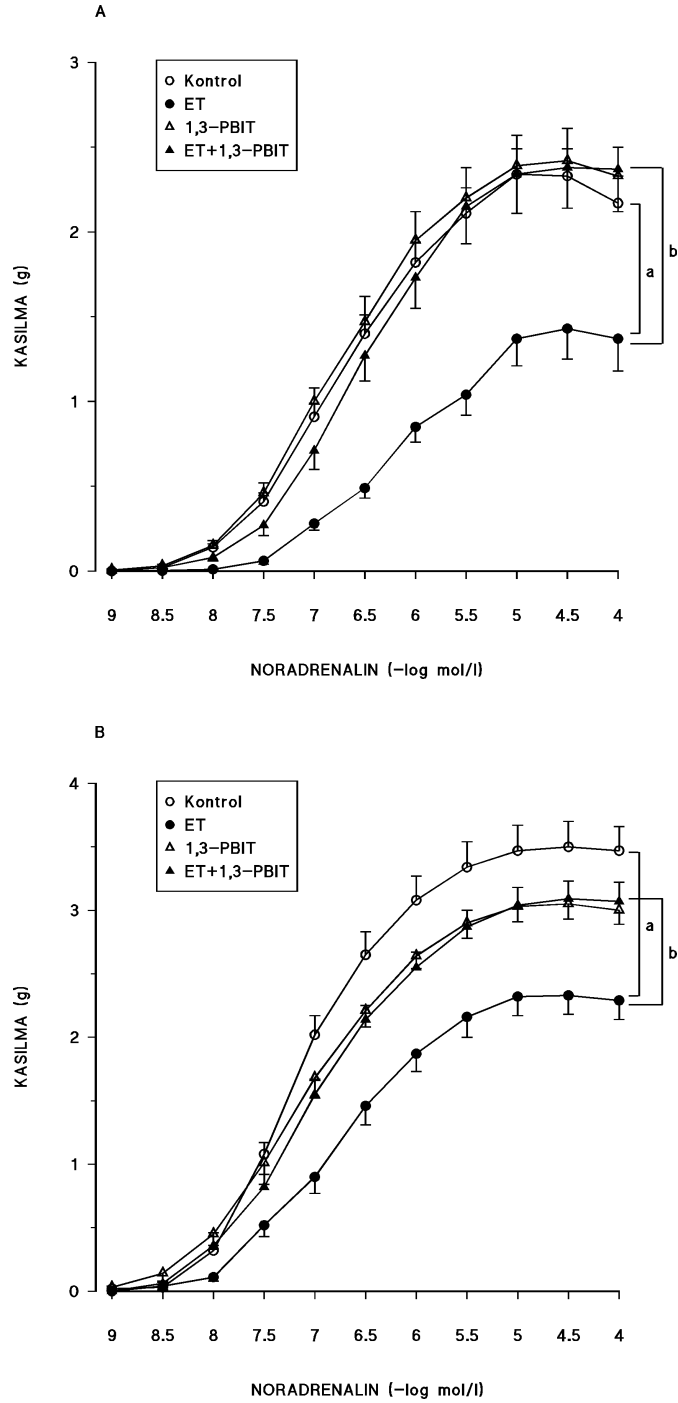
##### 4.2.6.1 Derişim-Yanıt Eğrileri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları ile ilgili bulgular Çizelge 4.3 ve Şekil 4.5'te verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları.

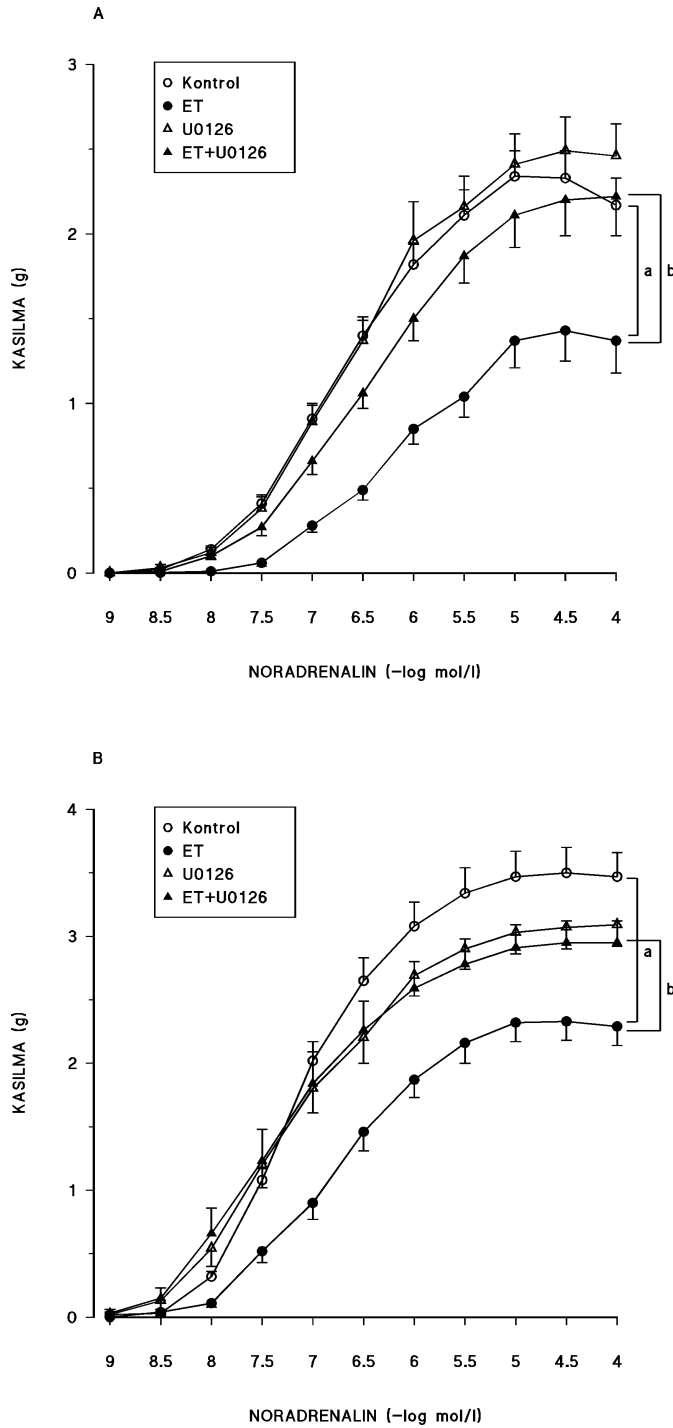
	Noradrenalin (µM)										
	0.001	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	100
<b>Kontrol</b>											
<b>E(+)</b>	0.00	0.02	0.14	0.41	0.91	1.40	1.82	2.11	2.34	2.33	2.17
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.00	0.01	0.02	0.05	0.08	0.11	0.12	0.15	0.15	0.16	0.16
	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)
<b>E(-)</b>	0.002	0.03	0.32 <sup>c</sup>	1.08 <sup>c</sup>	2.02 <sup>c</sup>	2.65 <sup>c</sup>	3.08 <sup>c</sup>	3.34 <sup>c</sup>	3.47 <sup>c</sup>	3.50 <sup>c</sup>	3.47 <sup>c</sup>
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.002	0.01	0.04	0.09	0.15	0.18	0.19	0.20	0.20	0.20	0.19
	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
<b>ET</b>											
<b>E(+)</b>	0.00	0.002 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.49 <sup>a</sup>	0.85 <sup>a</sup>	1.04 <sup>a</sup>	1.37 <sup>a</sup>	1.43 <sup>a</sup>	1.37 <sup>a</sup>
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.00	0.002	0.01	0.02	0.04	0.06	0.09	0.12	0.16	0.18	0.19
	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
<b>E(-)</b>	0.00	0.04 <sup>c</sup>	0.11 <sup>ac</sup>	0.52 <sup>ac</sup>	0.90 <sup>ac</sup>	1.46 <sup>ac</sup>	1.87 <sup>ac</sup>	2.16 <sup>ac</sup>	2.32 <sup>ac</sup>	2.33 <sup>ac</sup>	2.29 <sup>ac</sup>
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.00	0.03	0.03	0.09	0.13	0.15	0.14	0.16	0.15	0.15	0.15
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
<b>1,3-PBIT</b>											
<b>E(+)</b>	0.006	0.03	0.15	0.46	1.00	1.47	1.95	2.20	2.39	2.42	2.33
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.006	0.01	0.03	0.06	0.08	0.15	0.17	0.18	0.18	0.19	0.17
	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)
<b>E(-)</b>	0.03	0.14 <sup>c</sup>	0.45 <sup>c</sup>	1.01 <sup>c</sup>	1.68 <sup>c</sup>	2.21 <sup>c</sup>	2.64 <sup>c</sup>	2.90 <sup>c</sup>	3.03 <sup>c</sup>	3.05 <sup>c</sup>	3.00 <sup>c</sup>
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.02	0.07	0.12	0.17	0.16	0.13	0.10	0.12	0.12	0.12	0.11
	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)
<b>ET+1,3-PBIT</b>											
<b>E(+)</b>	0.00	0.02 <sup>b</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.27 <sup>b</sup>	0.71 <sup>b</sup>	1.27 <sup>b</sup>	1.73 <sup>b</sup>	2.15 <sup>b</sup>	2.34 <sup>b</sup>	2.38 <sup>b</sup>	2.37 <sup>b</sup>
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.00	0.01	0.02	0.06	0.11	0.15	0.18	0.22	0.23	0.24	0.25
	(n= 9)	(n= 9)	(n= 8)	(n= 9)	(n= 9)	(n= 9)	(n= 9)	(n= 9)	(n= 9)	(n= 9)	(n= 9)
<b>E(-)</b>	0.00	0.06	0.36 <sup>bc</sup>	0.82 <sup>bc</sup>	1.55 <sup>bc</sup>	2.14 <sup>bc</sup>	2.55 <sup>bc</sup>	2.87 <sup>bc</sup>	3.04 <sup>bc</sup>	3.09 <sup>bc</sup>	3.07 <sup>bc</sup>
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.00	0.02	0.10	0.10	0.12	0.11	0.12	0.13	0.14	0.14	0.15
	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)
<b>U0126</b>											
<b>E(+)</b>	0.00	0.03	0.12	0.38	0.89	1.37	1.96	2.16	2.41	2.49	2.46
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.00	0.02	0.03	0.07	0.11	0.12	0.23	0.18	0.18	0.20	0.19
	(n= 7)	(n= 7)	(n= 7)	(n= 7)	(n= 7)	(n= 7)	(n= 7)	(n= 7)	(n= 7)	(n= 7)	(n= 7)
<b>E(-)</b>	0.02	0.13 <sup>c</sup>	0.54 <sup>c</sup>	1.20 <sup>c</sup>	1.80 <sup>c</sup>	2.20 <sup>c</sup>	2.69 <sup>c</sup>	2.90 <sup>c</sup>	3.03 <sup>c</sup>	3.07 <sup>c</sup>	3.09 <sup>c</sup>
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.02	0.07	0.14	0.18	0.19	0.20	0.16	0.16	0.17	0.17	0.17
	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)
<b>ET+U0126</b>											
<b>E(+)</b>	0.00	0.01 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.27 <sup>b</sup>	0.66 <sup>b</sup>	1.06 <sup>b</sup>	1.50 <sup>b</sup>	1.87 <sup>b</sup>	2.11 <sup>b</sup>	2.20 <sup>b</sup>	2.22 <sup>b</sup>
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.00	0.01	0.02	0.05	0.08	0.09	0.13	0.16	0.19	0.21	0.23
	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)	(n= 11)
<b>E(-)</b>	0.03	0.15 <sup>c</sup>	0.66 <sup>bc</sup>	1.23 <sup>bc</sup>	1.84 <sup>bc</sup>	2.26 <sup>bc</sup>	2.59 <sup>bc</sup>	2.78 <sup>bc</sup>	2.91 <sup>bc</sup>	2.95 <sup>bc</sup>	2.95 <sup>bc</sup>
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.03	0.08	0.20	0.25	0.25	0.23	0.21	0.20	0.18	0.17	0.17
	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyüüre) dihidrobromür; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyü)butadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Her bir grupta kullanılan sıçanlardan noradrenalin ile ilk kez çıkarılan derişim-yanıt eğrilerinden elde edilen kasılma yanıtları birleştirilmiştir. Sonuçlar g olarak ortalama±ortalamların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> ET ve <sup>c</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi;  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.5.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen (A) endotel tabakası sağlam ve (B) uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları. 1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Her bir grupta kullanılan sıçanlardan noradrenalin ile ilk kez çıkarılan derişim-yanıt eğrilerinden elde edilen kasılma yanıtları birleştirilmiştir. 9-21 adet sıçandan elde edilen sonuçlar g olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol ve <sup>b</sup> ET değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA;  $P < 0.0001$ ).



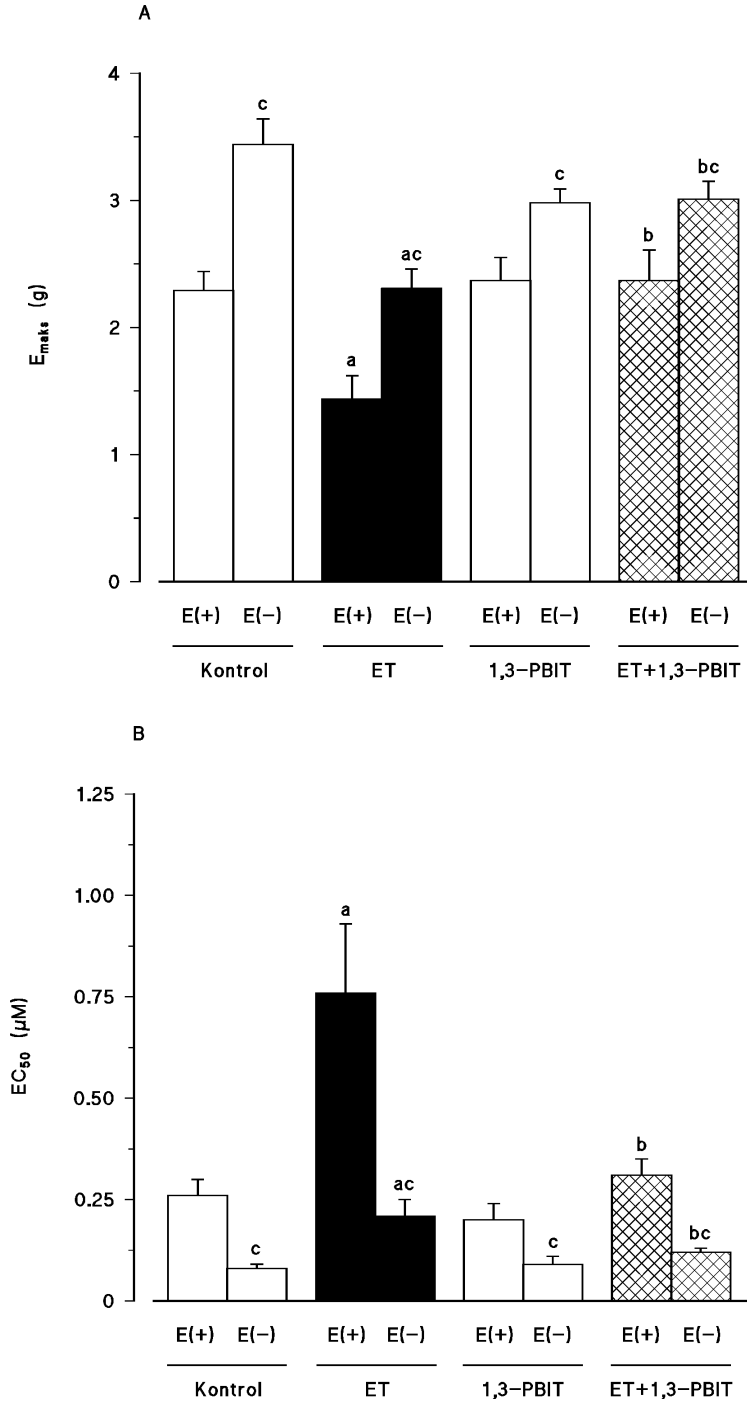


**Şekil 4.6.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen (A) endotel tabakası sağlam ve (B) uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yantı eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları. E(+), Endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien. U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Her bir grupta kullanılan sıçanlardan noradrenalin ile ilk kez çıkarılan derişim-yantı eğrilerinden elde edilen kasılma yanıtları birleştirilmiştir. 7-21 adet sıçandan elde edilen sonuçlar g olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol ve <sup>b</sup> ET değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA; P < 0.0001).

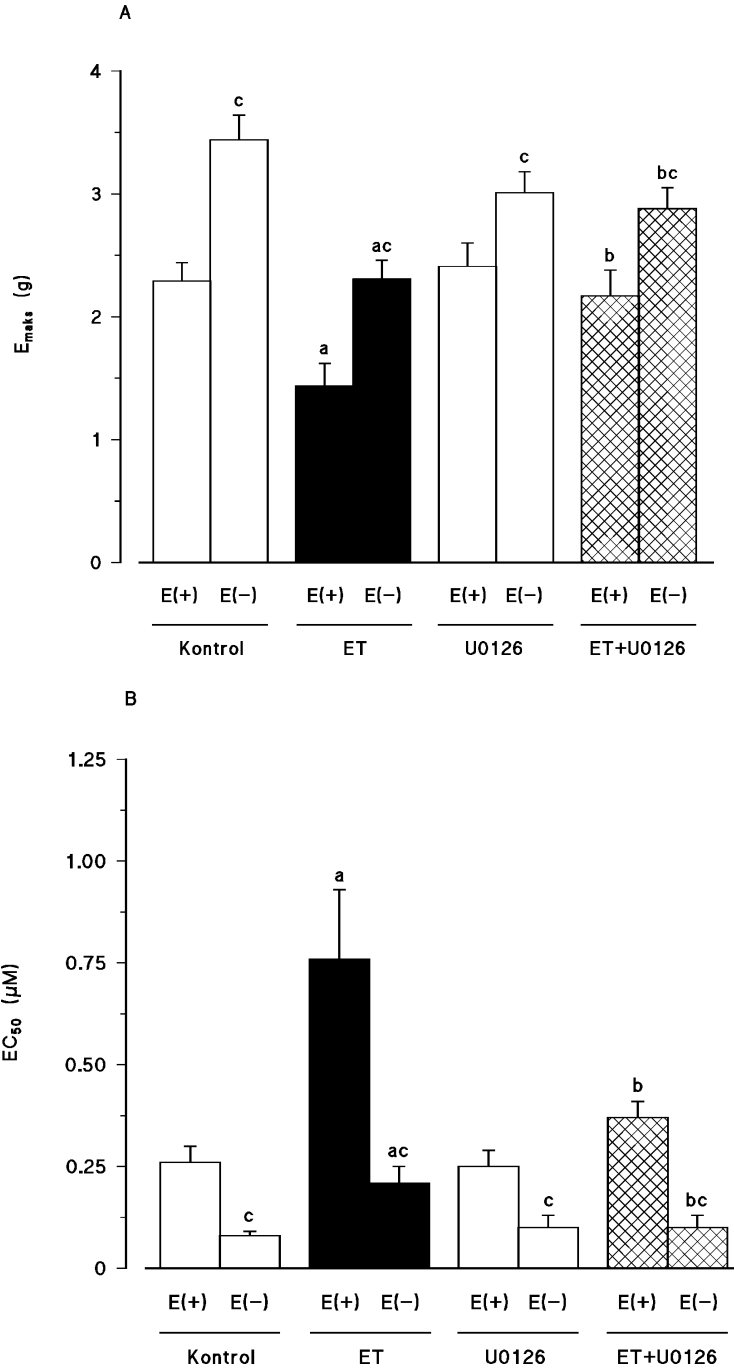
**Çizelge 4.4.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri.

	$E_{maks}$ (g)	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)
<b>Kontrol</b>		
E(+)	2.29±0.15 (n= 21)	0.26±0.04 (n= 21)
E(-)	3.44±0.20 (n= 11) <sup>c</sup>	0.08±0.01 (n= 11) <sup>c</sup>
<b>ET</b>		
E(+)	1.44±0.18 (n= 13) <sup>a</sup>	0.76±0.17 (n= 13) <sup>a</sup>
E(-)	2.31±0.15 (n= 12) <sup>ac</sup>	0.21±0.04 (n= 12) <sup>ac</sup>
<b>1,3-PBIT</b>		
E(+)	2.37±0.18 (n= 11)	0.20±0.04 (n= 11)
E(-)	2.98±0.11 (n= 11) <sup>c</sup>	0.09±0.02 (n= 11) <sup>c</sup>
<b>ET+1,3-PBIT</b>		
E(+)	2.37±0.24 (n= 9) <sup>b</sup>	0.31±0.04 (n= 9) <sup>b</sup>
E(-)	3.01±0.14 (n= 11) <sup>bc</sup>	0.12±0.01 (n= 11) <sup>bc</sup>
<b>U0126</b>		
E(+)	2.41±0.19 (n= 7)	0.25±0.04 (n= 7)
E(-)	3.01±0.17 (n= 10) <sup>c</sup>	0.10±0.03 (n= 10) <sup>c</sup>
<b>ET+U0126</b>		
E(+)	2.17±0.21 (n= 11) <sup>b</sup>	0.37±0.04 (n= 11) <sup>b</sup>
E(-)	2.88±0.17 (n= 10) <sup>bc</sup>	0.10±0.03 (n= 10) <sup>bc</sup>

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiy)butadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Her bir grupta kullanılan sıçanlardan noradrenalin (0.001-100  $\mu$ M) ile ilk kez çıkarılan derişim-yanıt eğrilerinden elde edilen kasılma yanıtları birleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama± ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> ET ve <sup>c</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.7.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A)  $E_{maks}$  ve (B)  $EC_{50}$  değerleri. 1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyüüre) dihidrobromür; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Her bir grupta kullanılan sıçanlardan noradrenalin (0.001-100  $\mu$ M) ile ilk kez çıkarılan derişim-yanıt eğrilerinden elde edilen kasılma yanıtları birleştirilmiştir. 9-21 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> ET ve <sup>c</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's *t* veya Mann-Whitney *U* testi;  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.8.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A)  $E_{maks}$  ve (B)  $EC_{50}$  değerleri. E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien. U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Her bir grupta kullanılan sıçanlardan noradrenalin (0.001-100  $\mu M$ ) ile ilk kez çıkarılan derişim-yanıt eğrilerinden elde edilen kasılma yanıtları birleştirilmiştir. 7-21 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> ET ve <sup>c</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).

Endotel tabakası sağlam ( $F= 65.20; P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 93.37; P < 0.0001$ ) dokularda 1,3-PBIT'nin noradrenalin derişim-yanıt eğrileri üzerinde oluşturduğu değişikliklerin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ). 1,3-PBIT endotel tabakası sağlam ( $F= 42.14; P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 93.18; P < 0.0001$ ) dokularda ET'nin neden olduğu noradrenalin derişim-yanıt eğrilerindeki sağa kaymayı önlemiştir. 1,3-PBIT, endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.003-100  $\mu\text{M}$  ve uzaklaştırılmış dokularda özellikle 0.01-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının ET grubuna göre daha çok artmasına neden olmuştur ( $P < 0.05$ ). Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 56.77; P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 101.10; P < 0.0001$ ) dokularda 1,3-PBIT'nin noradrenalin derişim-yanıt eğrileri üzerinde oluşturduğu değişikliklerin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ). Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 46.23; P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 110.50; P < 0.0001$ ) dokularda 1,3-PBIT'nin noradrenalin derişim-yanıt eğrileri üzerinde oluşturduğu değişikliklerin 1,3-PBIT grubuna göre anlamlı biçimde farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ).

#### 4.2.6.2 $E_{\text{maks}}$ ve $EC_{50}$ Değerleri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{\text{maks}}$  ve  $EC_{50}$  değerleri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

1,3-PBIT endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda  $E_{\text{maks}}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde kontrol grubuna göre bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ). 1,3-PBIT gerek endotel tabakası sağlam ( $P$  değerleri sırası ile 0.0049 ve 0.0412) gerekse uzaklaştırılmış ( $P$  değerleri sırası ile 0.0020 ve 0.0332) dokularda ET'nin neden olduğu  $E_{\text{maks}}$  değerlerindeki azalmayı ve  $EC_{50}$  değerlerindeki artmayı önlemiştir.

Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda 1,3-PBIT  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde kontrol grubuna göre bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ). Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda 1,3-PBIT'nin  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde oluşturduğu değişiklik 1,3-PBIT grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun katkıda bulunduğunu göstermektedir.

#### **4.2.7 ET ile Azalan Noradrenalin Kasılma Yanıtları Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi**

##### **4.2.7.1 Derişim-Yanıt Eğrileri**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları ile ilgili bulgular Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

Endotel tabakası sağlam ( $F= 58.77$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 73.46$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda U0126'nın noradrenalin derişim-yanıt eğrileri üzerinde oluşturduğu değişikliklerin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ). U0126 endotel tabakası sağlam ( $F= 44.81$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 49.21$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ET'nin neden olduğu noradrenalin derişim-yanıt eğrilerindeki sağa kaymayı önlemiştir. U0126, endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.003-100  $\mu M$  ve uzaklaştırılmış dokularda özellikle 0.01-100  $\mu M$  derişimlerde noradrenalin ile elde

edilen kasılma yanıtlarının ET grubuna göre daha çok artmasına neden olmuştur ( $P < 0.05$ ). Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 61.52$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 57.79$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda U0126'nın noradrenalin derişim-yanıt eğrileri üzerinde oluşturduğu değişikliklerin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ). Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 47.25$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 44.06$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda U0126'nın noradrenalin derişim-yanıt eğrileri üzerinde oluşturduğu değişikliklerin U0126 grubuna göre anlamlı biçimde farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ).

#### 4.2.7.2 $E_{maks}$ ve $EC_{50}$ Değerleri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

U0126 endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde kontrol grubuna göre bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ). U0126 gerek endotel tabakası sağlam ( $P$  değerleri sırası ile 0.0142 ve 0.0483) gerekse uzaklaştırılmış ( $P$  değerleri sırası ile 0.0189 ve 0.0263) dokularda ET'nin neden olduğu  $E_{maks}$  değerlerindeki azalmayı ve  $EC_{50}$  değerlerindeki artmayı önlemiştir.

Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda U0126  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde kontrol grubuna göre bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ). Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda U0126'nın  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde oluşturduğu değişiklik U0126 grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki, dolayısı ile etkinliğindeki artışın katkıda bulunduğunu göstermektedir.

#### **4.2.8 ET'nin Neden Olduğu ve Sistemik iNOS İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının Etkisi**

##### **4.2.8.1 Derişim-Yanıt Eğrileri**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.3 ve Şekil 4.5'te verilmiştir.

Endotel tabakasının uzaklaştırılması kontrol ( $F= 93.84; P < 0.0001$ ), ET ( $F= 57.63; P < 0.0001$ ), 1,3-PBIT ( $F= 80.88; P < 0.0001$ ) ve ET+1,3-PBIT ( $F= 74.43; P < 0.0001$ ) gruplarında noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinin anlamlı biçimde sola kaymasına neden olmuştur. Endotel tabakasının uzaklaştırılması sonucunda noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları 0.01-100  $\mu$ M noradrenalin derişimlerinde endotel tabakası sağlam dokulara göre daha çoktur ( $P < 0.05$ ).

##### **4.2.8.2 $E_{maks}$ ve $EC_{50}$ değerleri**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt



eğrilerinden hesaplanan  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.4 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

Endotel tabakasının uzaklaştırılması serum fizyolojik, ET, 1,3-PBIT ve ET+1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda  $E_{maks}$  değerlerinde artmaya (*P* değerleri sırası ile  $< 0.0001$ ,  $0.0013$ ,  $0.0089$  ve  $0.0248$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde ise azalmaya neden olmuştur (*P* değerleri sırası ile  $0.0024$ ,  $0.0058$ ,  $0.0148$  ve  $< 0.0001$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya endotel hücreleri olduğu kadar düz kas hücrelerinde de iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun da katkıda bulunduğunu göstermektedir.

#### **4.2.9 ET'nin Neden Olduğu ve Sistemik ERK1/2 İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının Etkisi**

##### **4.2.9.1 Derişim-Yanıt Eğrileri**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

Endotel tabakasının uzaklaştırılması U0126 ( $F= 55.75$ ;  $P < 0.0001$ ) ve ET+U0126 ( $F= 45.43$ ;  $P < 0.0001$ ) gruplarında noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinin anlamlı biçimde sola kaymasına neden olmuştur. Endotel tabakasının uzaklaştırılması sonucunda noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları  $0.003$ - $100 \mu\text{M}$  noradrenalin derişimlerinde endotel tabakası sağlam dokulara göre daha çoktur ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2.9.2 E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> Değerleri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının noradrenalin ile ilk kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerleri üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.4 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

Endotel tabakasının uzaklaştırılması U0126 ve ET+U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda E<sub>maks</sub> değerlerinde artmaya (*P* değerleri sırası ile 0.0341 ve 0.0176), EC<sub>50</sub> değerlerinde ise azalmaya neden olmuştur (*P* değerleri sırası ile 0.0061 ve < 0.0001).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya endotel hücreleri olduğu kadar düz kas hücrelerinde de MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki, dolayısı ile etkinliğindeki artışın da katkıda bulunduğunu göstermektedir.

#### 4.2.10 ET'nin Neden Olduğu Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde çGS İnhibisyonunun Etkisi

##### 4.2.10.1 Derişim-Yanıt Eğrileri

Sıçanlara serum fizyolojik veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları üzerinde seçici çGS inhibitörü ODQ'nun etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.5'te verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma üzerinde seçici çGS inhibitörü ODQ'nun etkisi.

	Noradrenalin ( $\mu$ M)										
	0.001	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	100
<b>Kontrol</b>											
<b>ODQ (-)</b>											
<b>E(+)</b>	0.01 $\pm$ 0.01 (n=12)	0.02 $\pm$ 0.01 (n=12)	0.06 $\pm$ 0.02 (n=12)	0.16 $\pm$ 0.04 (n=12)	0.40 $\pm$ 0.07 (n=12)	0.81 $\pm$ 0.10 (n=12)	1.16 $\pm$ 0.13 (n=12)	1.44 $\pm$ 0.14 (n=12)	1.50 $\pm$ 0.13 (n=12)	1.46 $\pm$ 0.13 (n=12)	1.26 $\pm$ 0.13 (n=12)
<b>E(-)</b>	0.07 <sup>j</sup> $\pm$ 0.03 (n=13)	0.15 <sup>j</sup> $\pm$ 0.04 (n=13)	0.42 <sup>j</sup> $\pm$ 0.05 (n=13)	0.88 <sup>j</sup> $\pm$ 0.08 (n=13)	1.42 <sup>j</sup> $\pm$ 0.11 (n=13)	1.85 <sup>j</sup> $\pm$ 0.11 (n=13)	2.21 <sup>j</sup> $\pm$ 0.13 (n=13)	2.44 <sup>j</sup> $\pm$ 0.15 (n=13)	2.56 <sup>j</sup> $\pm$ 0.15 (n=13)	2.55 <sup>j</sup> $\pm$ 0.17 (n=13)	2.51 <sup>j</sup> $\pm$ 0.17 (n=13)
<b>ODQ (+)</b>											
<b>E(+)</b>	0.10 <sup>a</sup> $\pm$ 0.03 (n=11)	0.23 <sup>a</sup> $\pm$ 0.04 (n=11)	0.47 <sup>a</sup> $\pm$ 0.05 (n=11)	0.82 <sup>a</sup> $\pm$ 0.10 (n=11)	1.37 <sup>a</sup> $\pm$ 0.15 (n=11)	1.75 <sup>a</sup> $\pm$ 0.17 (n=11)	2.10 <sup>a</sup> $\pm$ 0.18 (n=11)	2.25 <sup>a</sup> $\pm$ 0.24 (n=11)	2.48 <sup>a</sup> $\pm$ 0.18 (n=11)	2.51 <sup>a</sup> $\pm$ 0.19 (n=11)	2.55 <sup>a</sup> $\pm$ 0.19 (n=11)
<b>E(-)</b>	0.06 $\pm$ 0.02 (n=9)	0.13 $\pm$ 0.04 (n=9)	0.42 $\pm$ 0.09 (n=9)	0.76 $\pm$ 0.16 (n=9)	1.22 $\pm$ 0.23 (n=9)	1.55 $\pm$ 0.28 (n=9)	1.93 $\pm$ 0.31 (n=9)	2.15 $\pm$ 0.32 (n=9)	2.25 $\pm$ 0.33 (n=9)	2.29 $\pm$ 0.34 (n=9)	2.30 $\pm$ 0.34 (n=9)
<b>ET</b>											
<b>ODQ (-)</b>											
<b>E(+)</b>	0.00 $\pm$ 0.00 (n=12)	0.00 <sup>a</sup> $\pm$ 0.00 (n=12)	0.00 <sup>a</sup> $\pm$ 0.00 (n=12)	0.03 <sup>a</sup> $\pm$ 0.01 (n=12)	0.12 <sup>a</sup> $\pm$ 0.02 (n=12)	0.32 <sup>a</sup> $\pm$ 0.06 (n=12)	0.58 <sup>a</sup> $\pm$ 0.10 (n=12)	0.81 <sup>a</sup> $\pm$ 0.11 (n=12)	0.99 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12 (n=12)	0.96 <sup>a</sup> $\pm$ 0.14 (n=12)	0.84 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12 (n=12)
<b>E(-)</b>	0.04 <sup>j</sup> $\pm$ 0.02 (n=14)	0.09 <sup>j</sup> $\pm$ 0.05 (n=14)	0.25 <sup>j</sup> $\pm$ 0.13 (n=14)	0.49 <sup>j</sup> $\pm$ 0.20 (n=14)	0.82 <sup>j</sup> $\pm$ 0.25 (n=14)	1.11 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n=14)	1.46 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n=14)	1.76 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n=14)	1.89 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n=14)	1.89 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n=14)	1.81 <sup>j</sup> $\pm$ 0.28 (n=14)
<b>ODQ (+)</b>											
<b>E(+)</b>	0.12 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.05 (n=8)	0.25 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.08 (n=8)	0.53 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.13 (n=8)	0.90 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.24 (n=8)	1.44 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.28 (n=8)	1.85 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.39 (n=8)	2.26 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.44 (n=8)	2.57 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.50 (n=8)	2.73 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.51 (n=8)	2.79 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.53 (n=8)	2.78 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.52 (n=8)
<b>E(-)</b>	0.11 $\pm$ 0.05 (n=7)	0.30 $\pm$ 0.09 (n=7)	0.57 $\pm$ 0.15 (n=7)	0.92 $\pm$ 0.22 (n=7)	1.26 $\pm$ 0.24 (n=7)	1.47 $\pm$ 0.21 (n=7)	1.73 $\pm$ 0.25 (n=7)	1.88 $\pm$ 0.25 (n=7)	1.91 $\pm$ 0.27 (n=7)	1.96 $\pm$ 0.26 (n=7)	1.93 $\pm$ 0.26 (n=7)

**Çizelge 4.5. (devam)** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma üzerinde seçici çGS inhibitörü ODQ'nun etkisi.

	Noradrenalin ( $\mu\text{M}$ )										
	0.001	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	100
<b>1,3-PBIT</b>											
<b>ODQ (-)</b>											
<b>E(+)</b>	0.01 $\pm$ 0.01 (n=5)	0.01 $\pm$ 0.01 (n=5)	0.03 $\pm$ 0.02 (n=5)	0.06 <sup>a</sup> $\pm$ 0.02 (n=5)	0.13 <sup>a</sup> $\pm$ 0.05 (n=5)	0.28 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12 (n=5)	0.62 <sup>a</sup> $\pm$ 0.21 (n=5)	1.49 $\pm$ 0.35 (n=5)	1.76 $\pm$ 0.36 (n=5)	1.80 $\pm$ 0.36 (n=5)	1.75 $\pm$ 0.36 (n=5)
<b>E(-)</b>	0.13 <sup>j</sup> $\pm$ 0.09 (n=5)	0.24 <sup>j</sup> $\pm$ 0.09 (n=5)	0.48 <sup>j</sup> $\pm$ 0.11 (n=5)	0.74 <sup>j</sup> $\pm$ 0.22 (n=5)	1.13 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n=5)	1.48 <sup>j</sup> $\pm$ 0.33 (n=5)	1.82 <sup>j</sup> $\pm$ 0.35 (n=5)	2.54 <sup>j</sup> $\pm$ 0.30 (n=5)	2.84 <sup>j</sup> $\pm$ 0.28 (n=5)	2.93 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n=5)	2.94 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n=5)
<b>ODQ (+)</b>											
<b>E(+)</b>	0.12 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.05 (n=6)	0.20 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.06 (n=6)	0.51 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.05 (n=6)	0.72 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.09 (n=6)	1.21 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.12 (n=6)	1.63 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.14 (n=6)	2.06 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.16 (n=6)	2.90 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.22 (n=6)	3.16 <sup>abc</sup> $\pm$ 0.27 (n=6)	3.27 <sup>abc</sup> $\pm$ 0.30 (n=6)	3.31 <sup>abc</sup> $\pm$ 0.30 (n=6)
<b>E(-)</b>	0.08 $\pm$ 0.03 (n=6)	0.14 $\pm$ 0.04 (n=6)	0.35 $\pm$ 0.06 (n=6)	0.49 <sup>a</sup> $\pm$ 0.06 (n=6)	0.92 <sup>a</sup> $\pm$ 0.13 (n=6)	1.24 <sup>a</sup> $\pm$ 0.15 (n=6)	1.60 <sup>a</sup> $\pm$ 0.16 (n=6)	2.27 <sup>j</sup> $\pm$ 0.10 (n=6)	2.52 <sup>j</sup> $\pm$ 0.09 (n=6)	2.48 <sup>j</sup> $\pm$ 0.07 (n=6)	2.49 <sup>j</sup> $\pm$ 0.12 (n=6)
<b>ET+1,3-PBIT</b>											
<b>ODQ (-)</b>											
<b>E(+)</b>	0.00 $\pm$ 0.00 (n=5)	0.00 <sup>a</sup> $\pm$ 0.00 (n=5)	0.02 <sup>a</sup> $\pm$ 0.01 (n=5)	0.03 <sup>a</sup> $\pm$ 0.02 (n=5)	0.05 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.01 (n=5)	0.10 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.02 (n=5)	0.28 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.07 (n=5)	1.30 <sup>c</sup> $\pm$ 0.15 (n=5)	1.56 <sup>c</sup> $\pm$ 0.20 (n=5)	1.55 <sup>c</sup> $\pm$ 0.24 (n=5)	1.49 <sup>c</sup> $\pm$ 0.24 (n=5)
<b>E(-)</b>	0.03 $\pm$ 0.02 (n=5)	0.02 <sup>a</sup> $\pm$ 0.01 (n=5)	0.12 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.03 (n=5)	0.25 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.07 (n=5)	0.46 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.17 (n=5)	0.84 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.12 (n=5)	1.32 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.12 (n=5)	2.56 <sup>j</sup> $\pm$ 0.12 (n=5)	2.93 <sup>j</sup> $\pm$ 0.15 (n=5)	2.99 <sup>j</sup> $\pm$ 0.16 (n=5)	2.96 <sup>j</sup> $\pm$ 0.13 (n=5)
<b>ODQ (+)</b>											
<b>E(+)</b>	0.09 <sup>g</sup> $\pm$ 0.02 (n=7)	0.16 <sup>g</sup> $\pm$ 0.03 (n=7)	0.33 <sup>g</sup> $\pm$ 0.03 (n=7)	0.51 <sup>bg</sup> $\pm$ 0.06 (n=7)	0.75 <sup>bg</sup> $\pm$ 0.07 (n=7)	1.15 <sup>bg</sup> $\pm$ 0.12 (n=7)	1.65 <sup>ag</sup> $\pm$ 0.17 (n=7)	2.50 <sup>ag</sup> $\pm$ 0.18 (n=7)	2.82 <sup>ag</sup> $\pm$ 0.22 (n=7)	2.92 <sup>ag</sup> $\pm$ 0.23 (n=7)	2.96 <sup>ag</sup> $\pm$ 0.23 (n=7)
<b>E(-)</b>	0.07 $\pm$ 0.03 (n=6)	0.12 $\pm$ 0.05 (n=6)	0.25 $\pm$ 0.06 (n=6)	0.37 <sup>a</sup> $\pm$ 0.09 (n=6)	0.68 <sup>a</sup> $\pm$ 0.13 (n=6)	1.20 <sup>a</sup> $\pm$ 0.19 (n=6)	1.87 <sup>g</sup> $\pm$ 0.25 (n=6)	2.83 <sup>d</sup> $\pm$ 0.31 (n=6)	3.15 <sup>d</sup> $\pm$ 0.33 (n=6)	3.24 <sup>adf</sup> $\pm$ 0.35 (n=6)	3.22 <sup>adf</sup> $\pm$ 0.35 (n=6)

**Çizelge 4.5. (devam)** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma üzerinde seçici çGS inhibitörü ODQ'nun etkisi.

	Noradrenalin ( $\mu\text{M}$ )										
	0.001	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	100
<b>U0126</b>											
<b>ODQ (-)</b>											
<b>E(+)</b>	0.00 $\pm$ 0.00 (4)	0.01 $\pm$ 0.01 (4)	0.06 $\pm$ 0.03 (4)	0.17 $\pm$ 0.06 (4)	0.47 $\pm$ 0.13 (4)	0.74 $\pm$ 0.18 (4)	1.17 $\pm$ 0.15 (4)	1.45 $\pm$ 0.11 (4)	1.61 $\pm$ 0.13 (4)	1.62 $\pm$ 0.14 (4)	1.44 $\pm$ 0.08 (4)
<b>E(-)</b>	0.03 $\pm$ 0.02 (5)	0.07 $\pm$ 0.03 (5)	0.26 $\pm$ 0.07 (5)	0.62 $\pm$ 0.16 (5)	1.08 $\pm$ 0.23 (5)	1.49 $\pm$ 0.27 (5)	1.94 $\pm$ 0.28 (5)	2.23 $\pm$ 0.30 (5)	2.44 <sup>j</sup> $\pm$ 0.31 (5)	2.49 <sup>j</sup> $\pm$ 0.31 (5)	2.50 <sup>j</sup> $\pm$ 0.30 (5)
<b>ODQ (+)</b>											
<b>E(+)</b>	0.07 <sup>a</sup> $\pm$ 0.03 (5)	0.19 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.02 (5)	0.40 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.06 (5)	0.83 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.06 (5)	1.35 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.15 (5)	1.84 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.21 (5)	2.23 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.28 (5)	2.52 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.35 (5)	2.75 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.38 (5)	2.82 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.39 (5)	2.87 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.39 (5)
<b>E(-)</b>	0.00 $\pm$ 0.00 (5)	0.10 $\pm$ 0.07 (5)	0.33 $\pm$ 0.19 (5)	0.66 $\pm$ 0.33 (5)	1.07 $\pm$ 0.43 (5)	1.48 $\pm$ 0.43 (5)	1.87 $\pm$ 0.44 (5)	2.12 $\pm$ 0.43 (5)	2.31 $\pm$ 0.42 (5)	2.37 $\pm$ 0.43 (5)	2.38 $\pm$ 0.42 (5)
<b>ET+U0126</b>											
<b>ODQ (-)</b>											
<b>E(+)</b>	0.00 $\pm$ 0.00 (7)	0.00 $\pm$ 0.00 (7)	0.01 <sup>a</sup> $\pm$ 0.01 (7)	0.04 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.02 (7)	0.09 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.02 (7)	0.25 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.06 (7)	0.46 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.09 (7)	0.77 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.14 (7)	1.00 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.15 (7)	1.00 <sup>ah</sup> $\pm$ 0.15 (7)	0.92 <sup>h</sup> $\pm$ 0.14 (7)
<b>E(-)</b>	0.00 $\pm$ 0.00 (7)	0.02 $\pm$ 0.02 (7)	0.07 $\pm$ 0.06 (7)	0.19 <sup>a</sup> $\pm$ 0.11 (7)	0.43 <sup>a</sup> $\pm$ 0.16 (7)	0.65 <sup>a</sup> $\pm$ 0.22 (7)	1.05 <sup>a</sup> $\pm$ 0.28 (7)	1.39 <sup>a</sup> $\pm$ 0.33 (7)	1.63 <sup>a</sup> $\pm$ 0.34 (7)	1.63 <sup>a</sup> $\pm$ 0.35 (7)	1.58 <sup>a</sup> $\pm$ 0.36 (7)
<b>ODQ (+)</b>											
<b>E(+)</b>	0.08 <sup>ai</sup> $\pm$ 0.04 (6)	0.20 <sup>ai</sup> $\pm$ 0.03 (6)	0.44 <sup>ai</sup> $\pm$ 0.09 (6)	0.77 <sup>ai</sup> $\pm$ 0.17 (6)	1.26 <sup>ai</sup> $\pm$ 0.22 (6)	1.64 <sup>ai</sup> $\pm$ 0.25 (6)	1.98 <sup>ai</sup> $\pm$ 0.27 (6)	2.23 <sup>ai</sup> $\pm$ 0.31 (6)	2.39 <sup>ai</sup> $\pm$ 0.32 (6)	2.46 <sup>ai</sup> $\pm$ 0.33 (6)	2.47 <sup>ai</sup> $\pm$ 0.34 (6)
<b>E(-)</b>	0.06 $\pm$ 0.02 (6)	0.20 <sup>a</sup> $\pm$ 0.02 (6)	0.37 <sup>a</sup> $\pm$ 0.07 (6)	0.59 <sup>a</sup> $\pm$ 0.14 (6)	0.92 <sup>a</sup> $\pm$ 0.22 (6)	1.20 <sup>a</sup> $\pm$ 0.26 (6)	1.46 <sup>a</sup> $\pm$ 0.29 (6)	1.66 <sup>a</sup> $\pm$ 0.30 (6)	1.76 <sup>a</sup> $\pm$ 0.32 (6)	1.79 <sup>a</sup> $\pm$ 0.33 (6)	1.77 <sup>a</sup> $\pm$ 0.34 (6)

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür; çGS, çözünebilir guanilil siklaz; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; ODQ, 1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kinoksalin-1-on; ODQ (-), ortamda ODQ yok; ODQ (+), ortamda ODQ var; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyö)bütadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Noradrenalin ile kontrol derişim-yanıt eğrilerinin alınmasının ardından, noradrenalin ortamdan uzaklaştırılmış, dokular ortamda ODQ'nun çözücüsü olan DMSO (%0.3, h/h) veya ODQ (3  $\mu\text{M}$ ) yokken ve varken on beş dakika inkübe edilmiş ve noradrenalin derişim-yanıt eğrileri yinelenmiştir. Sonuçlar g olarak ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. <sup>a</sup> Kontrol/ODQ (-), <sup>b</sup> Kontrol/ODQ (+), <sup>c</sup> ET/ODQ (-), <sup>d</sup> ET/ODQ (+), <sup>e</sup> 1,3-PBIT/ODQ (-), <sup>f</sup> 1,3-PBIT/ODQ (+), <sup>g</sup> ET+1,3-PBIT/ODQ (-), <sup>h</sup> U0126/ODQ (-), <sup>i</sup> ET+U0126/ODQ (-) ve <sup>j</sup> E(+)  
değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi;  $P < 0.05$ ).

Serum fizyolojik uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 48.35$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 28.46$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ODQ'nun noradrenalin derişim-yanıt eğrileri üzerinde oluşturduğu değişiklikler anlamlıdır. ODQ endotel tabakası sağlam dokularda 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artışa neden olurken ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ).

ET uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 37.78$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 21.79$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubuna göre anlamlıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.003-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtı daha azken ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtı arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ).

Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 18.53$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 8.54$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ yokken ve varken noradrenalin derişim-yanıt eğrileri üzerinde oluşan değişiklikler anlamlıdır. ODQ, endotel tabakası sağlam dokularda 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artmaya neden olurken ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ).

Endotoksemik sıçanlardan izole edilen gerek endotel tabakası sağlam ( $F= 14.69$ ;  $P < 0.0001$ ) gerekse endotel tabakası uzaklaştırılmış ( $F= 10.79$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişikliklerin kontrol grubundan farklı olmasına karşın, kasılma yanıtı arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ).

Endotoksemik sıçanlardan izole edilen gerek endotel tabakası sağlam ( $F= 16.79$ ;  $P < 0.0001$ ) gerekse endotel tabakası uzaklaştırılmış ( $F= 34.55$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrileri kontrol grubunda ortamda ODQ yokken elde edilen eğrilere göre anlamlı biçimde sola kaymıştır. ODQ, endotel tabakası sağlam dokularda 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde

noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artmaya neden olurken ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ).

#### 4.2.10.2 $E_{maks}$ ve $EC_{50}$ Değerleri

Sıçanlara serum fizyolojik veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri seçici çGS inhibitörü ODQ'nun etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.6 ile Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

Serum fizyolojik uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ODQ  $E_{maks}$  değerlerinde artmaya ( $P = 0.0001$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde ise azalmaya ( $P = 0.0205$ ) neden olmuştur. Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise ODQ  $EC_{50}$  ve  $E_{maks}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ).

ET uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ yokken  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubuna göre azalmış ( $P$  değerleri sırası ile 0.0151 ve 0.0309),  $EC_{50}$  değerleri ise artmıştır ( $P$  değerleri sırası ile 0.0180 ve 0.0290).

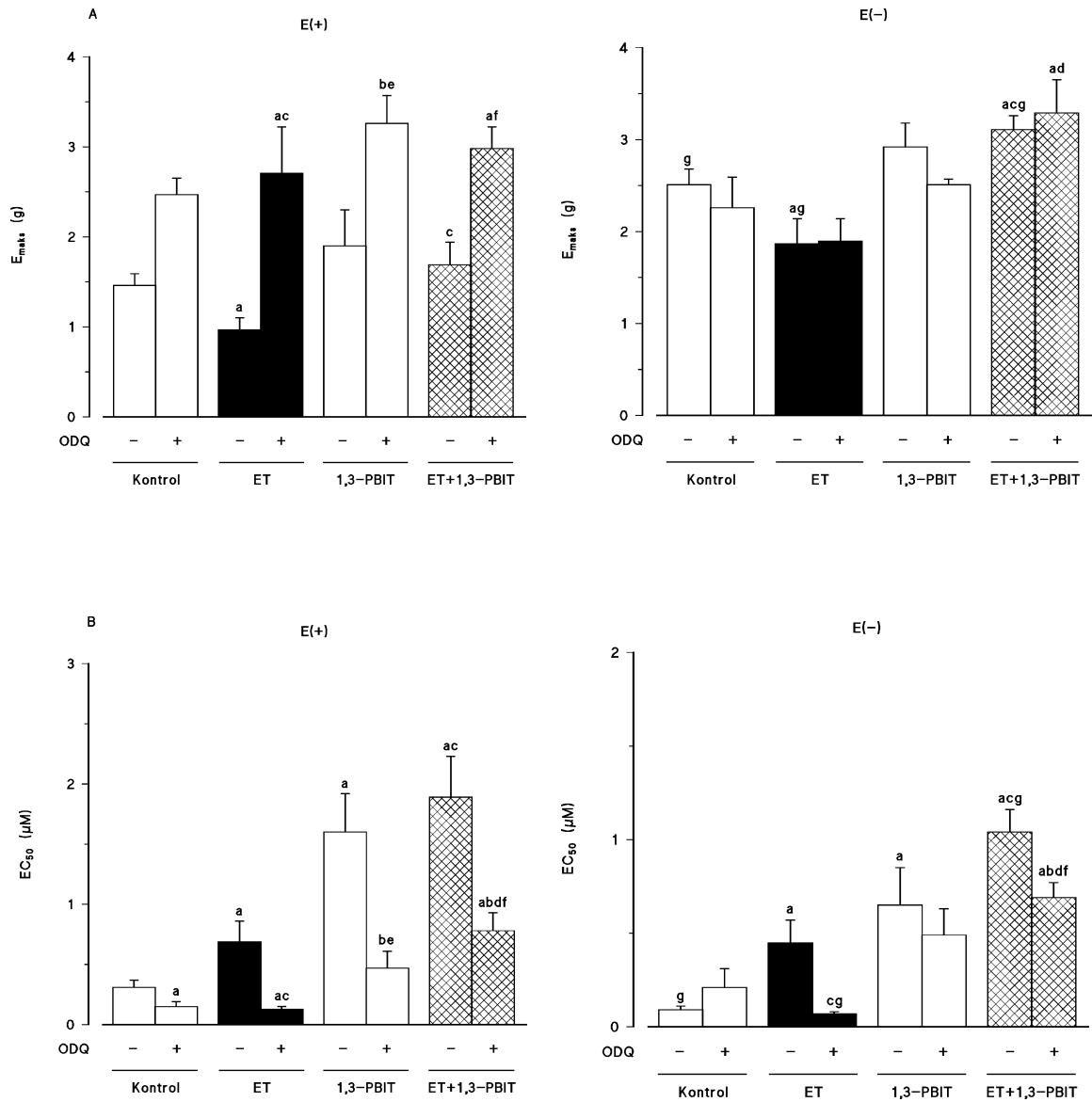
ODQ, endotel tabakası sağlam dokularda ET'nin neden olduğu  $E_{maks}$  değerlerindeki azalmayı ( $P = 0.0020$ ) ve  $EC_{50}$  değerlerindeki artmayı ( $P = 0.0003$ ) önlemiştir. Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise ODQ ET'nin neden olduğu  $EC_{50}$  değerlerindeki artmayı önlerken ( $P = 0.0402$ ),  $E_{maks}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ).

**Çizelge 4.6.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri üzerinde seçici çGS inhibitörü ODQ'nun etkisi.

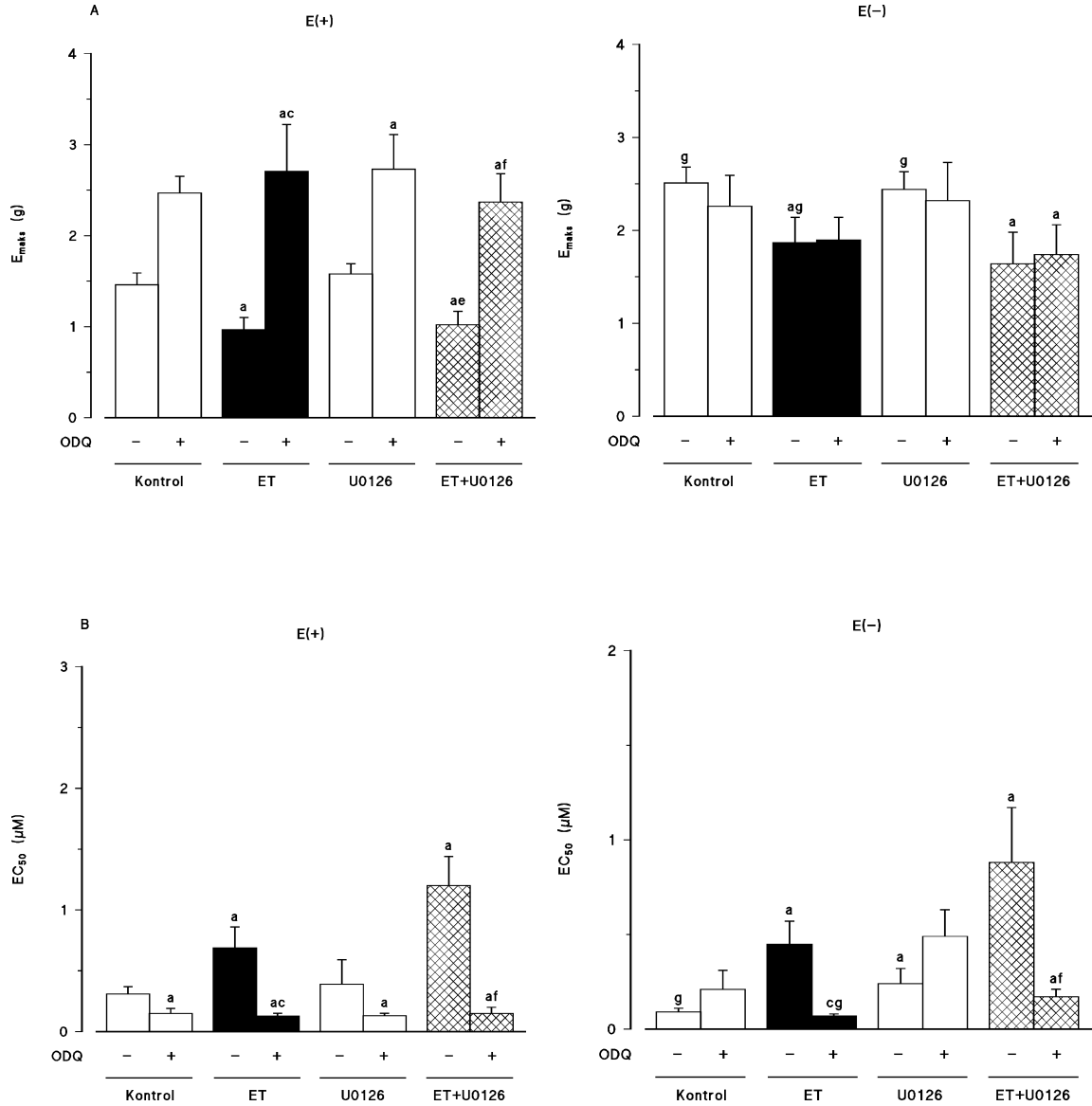
	$E_{maks}$ (g)	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)
<b>Kontrol</b>		
<b>ODQ (-)</b>		
E(+)	1.46±0.13 (n= 12)	0.31±0.06 (n= 12)
E(-)	2.51±0.17 (n= 13) <sup>i</sup>	0.09±0.02 (n= 13) <sup>i</sup>
<b>ODQ (+)</b>		
E(+)	2.47±0.18 (n= 11) <sup>a</sup>	0.15±0.04 (n= 11) <sup>a</sup>
E(-)	2.26±0.33 (n= 9)	0.21±0.10 (n= 9)
<b>ET</b>		
<b>ODQ (-)</b>		
E(+)	0.97±0.13 (n= 12) <sup>a</sup>	0.69±0.17 (n= 12) <sup>a</sup>
E(-)	1.87±0.27 (n= 14) <sup>ai</sup>	0.45±0.12 (n= 14) <sup>a</sup>
<b>ODQ (+)</b>		
E(+)	2.71±0.51 (n= 8) <sup>ac</sup>	0.13±0.02 (n= 8) <sup>ac</sup>
E(-)	1.90±0.24 (n= 7)	0.07±0.01 (n= 7) <sup>ci</sup>
<b>1,3-PBIT</b>		
<b>ODQ (-)</b>		
E(+)	1.90±0.40 (n= 5)	1.60±0.32 (n= 5) <sup>a</sup>
E(-)	2.92±0.26 (n= 5)	0.65±0.20 (n= 5) <sup>a</sup>
<b>ODQ (+)</b>		
E(+)	3.26±0.31 (n= 6) <sup>abe</sup>	0.47±0.14 (n= 6) <sup>abe</sup>
E(-)	2.51±0.06 (n= 6)	0.49±0.14 (n= 6)
<b>ET+1,3-PBIT</b>		
<b>ODQ (-)</b>		
E(+)	1.69±0.25 (n= 5) <sup>c</sup>	1.89±0.34 (n= 5) <sup>ac</sup>
E(-)	3.11±0.15 (n= 5) <sup>aci</sup>	1.04±0.13 (n= 5) <sup>aci</sup>
<b>ODQ (+)</b>		
E(+)	2.98±0.24 (n= 7) <sup>af</sup>	0.78±0.15 (n= 7) <sup>abdf</sup>
E(-)	3.29±0.36 (n= 6) <sup>ad</sup>	0.69±0.08 (n= 6) <sup>abdf</sup>
<b>U0126</b>		
<b>ODQ (-)</b>		
E(+)	1.58±0.11 (n= 4)	0.39±0.20 (n= 4)
E(-)	2.44±0.19 (n= 5) <sup>i</sup>	0.23±0.07 (n= 5) <sup>a</sup>
<b>ODQ (+)</b>		
E(+)	2.73±0.38 (n= 5) <sup>a</sup>	0.13±0.02 (n= 5) <sup>a</sup>
E(-)	2.32±0.41 (n= 5)	0.24±0.08 (n= 5)
<b>ET+U0126</b>		
<b>ODQ (-)</b>		
E(+)	1.02±0.15 (n= 7) <sup>ag</sup>	1.20±0.24 (n= 7) <sup>a</sup>
E(-)	1.64±0.34 (n= 7) <sup>a</sup>	0.88±0.29 (n= 7) <sup>a</sup>
<b>ODQ (+)</b>		
E(+)	2.37±0.31 (n= 6) <sup>ah</sup>	0.15±0.05 (n= 6) <sup>ah</sup>
E(-)	1.74±0.32 (n= 6) <sup>a</sup>	0.17±0.04 (n= 6) <sup>ah</sup>

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyüre) dihidrobromür; çGS, çözünebilir guanilil siklaz; DMSO, dimetilsülfoksit; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; ODQ, 1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kinoksalin-1-on; ODQ (-), ortamda ODQ yok; ODQ (+), ortamda ODQ var; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiy)butadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Noradrenalin (0.001-100  $\mu$ M) ile kontrol derişim-yanıt eğrilerinin alınmasının ardından, noradrenalin ortamdan uzaklaştırılmış, dokular ortamda ODQ'nun çözücüsü olan DMSO (%0.3, h/h) veya ODQ (3  $\mu$ M) yokken ve varken on beş dakika inkübe edilmiş ve noradrenalin derişim-yanıt eğrileri yinelenmiştir. Sonuçlar g veya  $\mu$ M olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. <sup>a</sup> Kontrol/ODQ (-), <sup>b</sup> Kontrol/ODQ (+); <sup>c</sup> ET/ODQ (-), <sup>d</sup> ET/ODQ (+), <sup>e</sup> 1,3-PBIT/ODQ (-), <sup>f</sup> ET+1,3-PBIT/ODQ (-), <sup>g</sup> U0126/ODQ (-), <sup>h</sup> ET+U0126/ODQ (-) ve <sup>i</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).





**Şekil 4.9.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A)  $E_{maks}$  ve (B)  $EC_{50}$  değerleri üzerinde seçici çGS inhibitörü ODQ'nun etkisi. 1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyoüre) dihidrobromür; çGS, çözünebilir guanilil siklaz; DMSO, dimetilsülfoksit; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ET, endotoksin; ODQ, 1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kinoksalin-1-on; ODQ (-), ortamda ODQ yok; ODQ (+), ortamda ODQ var. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Noradrenalin (0.001-100  $\mu$ M) ile kontrol derişim-yanıt eğrilerinin alınmasının ardından, noradrenalin ortamdan uzaklaştırılmış, dokular ortamda ODQ'nun çözücüsü olan DMSO (%0.3, h/h) veya ODQ (3  $\mu$ M) yokken ve varken on beş dakika inkübe edilmiş ve noradrenalin derişim-yanıt eğrileri yinelenmiştir. 5-13 adet sıçandan elde edilen sonuçlar g veya  $\mu$ M olarak ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol/ODQ (-), <sup>b</sup> Kontrol/ODQ (+); <sup>c</sup> ET/ODQ (-), <sup>d</sup> ET/ODQ (+), <sup>e</sup> 1,3-PBIT/ODQ (-), <sup>f</sup> ET+1,3-PBIT/ODQ (-) ve <sup>g</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.10.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A) E<sub>max</sub> ve (B) EC<sub>50</sub> değerleri üzerinde seçici çGS inhibitörü ODQ'nun etkisi. çGS, çözünebilir guanilil siklaz; DMSO, dimetilsülfoksit; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; ODQ, 1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kinoksalin-1-on; ODQ (-), ortamda ODQ yok; ODQ (+), ortamda ODQ var; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien. U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Noradrenalin (0.001-100 µM) ile kontrol derişim-yanıt eğrilerinin alınmasının ardından, noradrenalin ortamdan uzaklaştırılmış, dokular ortamda ODQ'nun çözücüsü olan DMSO (%0.3, h/h) veya ODQ (3 µM) yokken ve varken on beş dakika inkübe edilmiş ve noradrenalin derişim-yanıt eğrileri yinelenmiştir. 4-13 adet sıçandan elde edilen sonuçlar g veya µM olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol/ODQ (-), <sup>b</sup> Kontrol/ODQ (+); <sup>c</sup> ET/ODQ (-), <sup>d</sup> ET/ODQ (+), <sup>e</sup> U0126/ODQ (-), <sup>f</sup> ET+U0126/ODQ (-) ve <sup>g</sup> E(+)  
değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

ET uygulanan sıçanlardan izole edilen gerek endotel tabakası sağlam gerekse endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

ET uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubunda ortamda ODQ yokken elde edilen değerlerden daha çokken ( $P= 0.0111$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha azdır ( $P= 0.0168$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise  $E_{maks}$  değerleri ile kontrol grubu değerlerinden farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde oluşan iNOS kaynaklı NO'nun çGS enzimini etkinleştirerek siklik GMP oluşumunu artırmasının katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

#### **4.2.11 ET'nin Neden Olduğu ve çGS İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının Etkisi**

##### **4.2.11.1 Derişim-Yanıt Eğrileri**

Sıçanlara serum fizyolojik veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda seçici çGS inhibitörü ODQ yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Serum fizyolojik uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinin anlamlı biçimde sola kaymasına ( $F= 69.63; P < 0.0001$ ) ve 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artmaya neden olmuştur ( $P < 0.05$ ).

ET uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinin anlamlı biçimde sola kaymasına ( $F= 13.16; P < 0.0001$ ) ve 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artmaya neden olmuştur ( $P < 0.05$ ).

Serum fizyolojik ( $F= 20.71; P < 0.0001$ ) veya ET ( $F= 8.07; P < 0.0001$ ) uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması ile ortamda ODQ varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişikliklerin anlamlı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ).

#### 4.2.11.2 $E_{\text{maks}}$ ve $EC_{50}$ Değerleri

Sıçanlara serum fizyolojik veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda seçici  $\alpha\text{GS}$  inhibitörü ODQ yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{\text{maks}}$  ve  $EC_{50}$  değerleri üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.6 ve Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

Serum fizyolojik uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ yokken  $E_{\text{maks}}$  değerlerinde artmaya ( $P < 0.0001$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde ise azalmaya ( $P= 0.0005$ ) neden olmuştur.

ET uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ yokken  $E_{\text{maks}}$  değerlerinde artmaya neden olurken ( $P= 0.0070$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ).

Serum fizyolojik uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ varken  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ )

ET uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ varken  $EC_{50}$  değerlerinde azalmaya neden olurken ( $P=0.0153$ ),  $E_{maks}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, endotel hücreleri olduğu kadar düz kas hücrelerinde de oluşan iNOS kaynaklı NO'nun  $\text{çGS}$  enzimini etkinleştirerek siklik GMP oluşumunu artırmasının katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

#### **4.2.12 ET'nin Neden Olduğu ve $\text{çGS}$ İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi**

##### **4.2.12.1 Derişim-Yanıt Eğrileri**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında ortamda seçici  $\text{çGS}$  inhibitörü ODQ yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları ile ilgili bulgular Çizelge 4.5'te verilmiştir.

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 24.76$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 41.15$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklıdır.

Öte yandan, endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.03-1  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha az olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 39.66$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 16.48$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 10-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha çok olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 62.71$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 60.89$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler, ortamda ODQ yokken kontrol grubunda elde edilen kasılma yanıtlarından farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ varken 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının ortamda ODQ yokken kontrol grubunda elde edilen yanıtlara göre daha çok olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda özellikle 0.03-1  $\mu\text{M}$  derişimlerde daha azdır ( $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 33.04$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 32.31$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde ODQ ile oluşan değişiklikler anlamlıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının ortamda ODQ yokken elde edilen yanıtlara göre daha çok olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 33.83$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 65.60$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda

ortamda ODQ yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklıdır. Endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda özellikle 0.003-1  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtı ortamda kontrol grubuna göre daha azdır ( $P < 0.05$ ).

Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 28.90$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 12.67$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ yokken 1,3-PBIT ile noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler endotoksemik gruptan farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.1-1  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtının endotoksemik gruba göre daha az olmasına karşın, özellikle 3-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtı daha çoktur ( $P < 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise kasılma yanıtı arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 42.86$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 18.17$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.03-0.3  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtının kontrol grubuna göre daha az olmasına karşın, ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtı arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 62.05$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 50.73$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrileri, kontrol grubunda ortamda ODQ yokken elde edilen eğrilerden farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 1-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtı kontrol grubuna göre daha çoktur ( $P < 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise özellikle 0.03-0.3  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtının kontrol grubuna göre daha az olmasına karşın, 30-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtı daha çoktur ( $P < 0.05$ ).

ODQ, 1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 55.51; P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 45.09; P < 0.0001$ ) dokularda noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinin sola kaymasına neden olmuştur. Endotel tabakası sağlam dokularda 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları, ortamda ODQ yokken elde edilen değerlerden daha çoktur ( $P < 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının ortamda ODQ yokken elde edilen kasılma yanıtlarına göre artmış olmasına karşın, yalnızca 1  $\mu\text{M}$  derişimde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları anlamlı olarak daha çoktur ( $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 13.02; P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 21.60; P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler endotoksemik gruba göre farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının endotoksemik gruptan farklı olmamasına karşın, endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda 3-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları endotoksemik gruptan daha çoktur ( $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ yokken ( $F= 16.13; P < 0.0001$ ) ve varken ( $F= 52.80; P < 0.0001$ ) elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişikliklerin 1,3-PBIT grubundan farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ yokken ( $F= 35.41; P < 0.0001$ ) ve varken ( $F= 42.77; P < 0.0001$ ) elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişikliklerin 1,3-PBIT grubundan farklı olmasına karşın, ortamda ODQ varken 30 ve 100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının anlamlı biçimde artması ( $P < 0.05$ ) dışında, öteki derişimlerde elde edilen kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).



#### 4.2.12.2 E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> Değerleri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında ortamda seçici çGS inhibitörü ODQ yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.6 ve Şekil 4.9'da verilmiştir.

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ yokken elde edilen E<sub>maks</sub> değerleri kontrol grubundan farklı değilken ( $P > 0.05$ ), EC<sub>50</sub> değerleri kontrol grubuna göre daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0038 ve 0.0137).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ varken elde edilen E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerleri kontrol grubundan daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0291 ve 0.0348). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerleri kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ varken elde edilen E<sub>maks</sub> değerleri, kontrol grubunda ortamda ODQ yokken elde edilen değerlere göre daha çokken ( $P < 0.0001$ ), EC<sub>50</sub> değerleri farklı değildir ( $P > 0.05$ ). Öte yandan, endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ varken elde edilen E<sub>maks</sub> değerleri, kontrol grubunda ortamda ODQ yokken elde edilen değerlerden farklı değilken ( $P > 0.05$ ), EC<sub>50</sub> değerleri daha çoktur ( $P = 0.0005$ ).

ODQ, 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda E<sub>maks</sub> değerlerinde artmaya ( $P = 0.0221$ ), EC<sub>50</sub> değerlerinde ise azalmaya neden olmuştur ( $P = 0.0070$ ). ODQ, 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ yokken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubundan farklı değilken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha çoktur ( $P= 0.0019$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri kontrol grubuna göre daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0499 ve 0.0016).

1,3-PBIT, endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ yokken kontrol grubuna göre azalan  $E_{maks}$  değerlerinde artmaya ( $P$  değerleri sırası ile 0.0139 ve 0.0296), artan  $EC_{50}$  değerlerinde ise daha çok bir artmaya ( $P$  değerleri sırası ile 0.0030 ve 0.0109) neden olmuştur.

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubundan farklı değilken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerleri kontrol grubuna göre daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0021 ve 0.0050).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $P$  değerleri sırası ile  $< 0.0001$  ve 0.0143) ve uzaklaştırılmış ( $P$  değerleri sırası ile 0.0338 ve 0.0007) dokularda ortamda ODQ varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri, kontrol grubunda ortamda ODQ yokken elde edilen değerlerden daha çoktur.

ODQ, 1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda  $E_{maks}$  değerlerinde artmaya ( $P= 0.0044$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde ise azalmaya neden olmuştur ( $P= 0.0087$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise ODQ  $E_{maks}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmazken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde azalmaya neden olmuştur ( $P= 0.0351$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri, ET grubundan farklı değilken ( $P > 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ET grubundan daha çoktur ( $P= 0.0065$ ). Öte yandan,  $EC_{50}$  değerleri, ET grubundan daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0003 ve 0.0012).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ yokken ve varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri, 1,3-PBIT grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde NO dışında çGS etkinliğinde artışa neden olabilecek bir ya da birden çok mediyatörün katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

#### **4.2.13 Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının ET'nin Neden Olduğu çGS ve Sistemik iNOS İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Etkisi**

##### **4.2.13.1 Derişim-Yanıt Eğrileri**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda seçici çGS inhibitörü ODQ yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.5'te verilmiştir.

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinin anlamlı biçimde sola kaymasına ( $F= 18.21$ ;  $P < 0.0001$ ) ve 0.001-100  $\mu$ M derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artmaya neden olmuştur ( $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması, ortamda ODQ varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinin

anlamli biçimde sağa kaymasına ( $F= 57.91$ ;  $P < 0.0001$ ) ve özellikle 3-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında azalmaya neden olmuştur ( $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinin anlamli biçimde sola kaymasına ( $F= 80.88$ ;  $P < 0.0001$ ) ve özellikle 0.01-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde anlamli olmak üzere noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artmaya neden olmuştur ( $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ise ortamda ODQ varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişikliklerin anlamli olmasına karşın ( $F= 42.93$ ;  $P < 0.0001$ ), kasılma yanıtları arasındaki farklılık anlamli değildir ( $P > 0.05$ ).

#### 4.2.13.2 $E_{\text{maks}}$ ve $EC_{50}$ Değerleri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda seçici çGS inhibitörü ODQ yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{\text{maks}}$  ve  $EC_{50}$  değerleri üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.6 ve Şekil 4.9'da verilmiştir.

1,3-PBIT uygulanan gerek kontrol ve gerekse endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ yokken ve varken  $E_{\text{maks}}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ yokken  $E_{\text{maks}}$  değerlerinde artmaya ( $P= 0.0013$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde ise azalmaya neden olmuştur ( $P= 0.0490$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, düz kas hücrelerinde NO dışında çGS etkinliğinde artışa neden olabilecek bir ya da birden çok mediyatörün katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

#### **4.2.14 ET'nin Neden Olduğu ve çGS İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi**

##### **4.2.14.1 Derişim-Yanıt Eğrileri**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında ortamda seçici çGS inhibitörü ODQ yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları ile ilgili bulgular Çizelge 4.5'te verilmiştir.

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 31.74$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 41.62$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişikliklerin kontrol grubundan farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 27.76$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 9.21$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişikliklerin kontrol grubundan farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 38.41$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 27.91$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler, ortamda ODQ yokken kontrol grubunda elde edilen kasılma yanıtlarından farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ varken 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının ortamda ODQ yokken kontrol grubunda elde edilen yanıtlara göre daha çok olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 21.96$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 9.79$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde ODQ ile oluşan değişiklikler anlamlıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda 0.003-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının ortamda ODQ yokken elde edilen yanıtlara göre daha çok olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 33.31$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 35.31$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.01-30  $\mu\text{M}$ , uzaklaştırılmış dokularda ise özellikle 0.03-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları kontrol grubuna göre daha azdır ( $P < 0.05$ ).

Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 22.63$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 8.21$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ yokken U0126 ile noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler endotoksemik gruptan farklı olmasına karşın kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 25.41$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 9.96$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler

kontrol grubundan farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 30.95$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 34.15$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrileri, kontrol grubunda ortamda ODQ yokken elde edilen eğrilerden farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları kontrol grubuna göre daha çoktur ( $P < 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise özellikle 0.01-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha az olmasına karşın, 0.03  $\mu\text{M}$  derişimde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları daha çoktur ( $P < 0.05$ ).

ODQ'nun, U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 25.75$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 7.85$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşturduğu değişiklikler anlamlıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları, ortamda ODQ yokken elde edilen değerlerden daha çokken ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 8.46$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 8.86$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda ODQ varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler endotoksemik gruba göre farklıyken, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ yokken ( $F= 30.25$ ;  $P < 0.0001$ ) ve varken ( $F= 16.01$ ;  $P < 0.0001$ ) elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler U0126 grubundan farklıdır. Ortamda ODQ yokken noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının, özellikle 0.03-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde daha az olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), ortamda ODQ varken elde edilen kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ yokken ( $F= 12.72$ ;  $P < 0.0001$ ) ve varken ( $F= 7.25$ ;  $P < 0.0001$ ) elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişikliklerin U0126 grubundan farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

#### 4.2.14.2 E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> Değerleri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında ortamda seçici çGS inhibitörü ODQ yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.6 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ yokken elde edilen E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerleri kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ). Öte yandan, endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda E<sub>maks</sub> değerleri kontrol grubundan farklı değilken ( $P > 0.05$ ), EC<sub>50</sub> değerleri kontrol grubuna göre daha çoktur ( $P= 0.0384$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ varken elde edilen E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerleri kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ varken elde edilen E<sub>maks</sub> değerleri, kontrol grubunda ortamda ODQ yokken elde edilen değerlere göre daha çokken ( $P= 0.0019$ ), EC<sub>50</sub> değerleri daha azdır ( $P= 0.0399$ ). Öte yandan, endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ varken elde edilen E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerleri, kontrol grubunda ortamda ODQ yokken elde edilen değerlerden farklı değildir ( $P > 0.05$ ).



ODQ, U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ yokken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubundan daha azken ( $P$  değerleri sırası ile 0.0252 ve 0.0195),  $EC_{50}$  değerleri daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0011 ve 0.0013).

U0126, endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ yokken kontrol grubuna göre azalan  $E_{maks}$  ve artan  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ). Kontrol grubunda ortamda ODQ yokken elde edilen değerler karşılaştırıldığında, U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri daha çok ( $P= 0.0056$ ),  $EC_{50}$  değerleri ise daha azdır ( $P= 0.0440$ ). Öte yandan, kontrol grubunda ortamda ODQ yokken elde edilen değerler karşılaştırıldığında, U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri daha az ( $P= 0.0307$ ),  $EC_{50}$  değerleri ise daha çoktur ( $P= 0.0459$ ).

ODQ, U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda  $E_{maks}$  değerlerinde artmaya ( $P= 0.0018$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde ise azalmaya neden olmuştur ( $P= 0.0012$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise ODQ  $E_{maks}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmazken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde azalmaya neden olmuştur ( $P= 0.0221$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri ET grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda ODQ yokken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri U0126 grubundan daha azken ( $P= 0.0317$ ),  $EC_{50}$  değerleri arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda ODQ varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri, U0126 grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1/ERK1/2/iNOS yolu dışında  $\text{çGS}$  etkinliğinde artışa neden olabilecek bir ya da birden çok mediyatörün katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

#### **4.2.15 Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının ET'nin Neden Olduğu $\text{çGS}$ ve Sistemik ERK1/2 İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Etkisi**

##### **4.2.15.1 Derişim-Yanıt Eğrileri**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda seçici  $\text{çGS}$  inhibitörü ODQ yokken ve varken noradrenalin

ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtı üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.5'te verilmiştir.

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ yokken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinin anlamlı biçimde sola kaymasına ( $F= 20.78; P < 0.0001$ ) ve 10-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtında artmaya neden olmuştur ( $P < 0.05$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılmasının, ortamda ODQ varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşturduğu değişikliklerin anlamlı olmasına karşın ( $F= 10.46; P < 0.0001$ ), kasılma yanıtı arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda ODQ yokken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşturduğu değişikliklerin anlamlı olmasına karşın ( $F= 10.45; P < 0.0001$ ) kasılma yanıtı arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ise ortamda ODQ varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişikliklerin anlamlı olmasına karşın ( $F= 11.50; P < 0.0001$ ), kasılma yanıtı arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ).

#### **4.2.15.2 $E_{\text{maks}}$ ve $EC_{50}$ Değerleri**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda seçici çGS inhibitörü ODQ yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{\text{maks}}$  ve  $EC_{50}$  değerleri üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.6 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ yokken  $E_{maks}$  değerlerinde artmaya neden olurken ( $P=0.0444$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda ODQ yokken ve varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1/ERK1/2/iNOS yolu dışında çGS etkinliğinde artışa neden olabilecek bir ya da birden çok mediyatörün katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

#### **4.2.16 ET'nin Neden Olduğu Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde PKG İnhibisyonunun Etkisi**

##### **4.2.16.1 Derişim-Yanıt Eğrileri**

Sıçanlara serum fizyolojik veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları üzerinde seçici PKG inhibitörü KT5823'ün etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.7'de verilmiştir.

**Çizelge 4.7.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma üzerinde seçici PKG inhibitörü KT5823'ün etkisi.

	Noradrenalin ( $\mu\text{M}$ )										
	0.001	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	100
<b>Kontrol</b>											
<b>KT5823 (-)</b>											
<b>E(+)</b>	0.01 $\pm$ 0.01 (n= 12)	0.02 $\pm$ 0.01 (n= 12)	0.06 $\pm$ 0.02 (n= 12)	0.16 $\pm$ 0.04 (n= 12)	0.40 $\pm$ 0.07 (n= 12)	0.81 $\pm$ 0.10 (n= 12)	1.16 $\pm$ 0.13 (n= 12)	1.44 $\pm$ 0.14 (n= 12)	1.50 $\pm$ 0.13 (n= 12)	1.46 $\pm$ 0.13 (n= 12)	1.26 $\pm$ 0.13 (n= 12)
<b>E(-)</b>	0.07 <sup>j</sup> $\pm$ 0.03 (n= 13)	0.15 <sup>j</sup> $\pm$ 0.04 (n= 13)	0.42 <sup>j</sup> $\pm$ 0.05 (n= 13)	0.88 <sup>j</sup> $\pm$ 0.08 (n= 13)	1.42 <sup>j</sup> $\pm$ 0.11 (n= 13)	1.85 <sup>j</sup> $\pm$ 0.11 (n= 13)	2.21 <sup>j</sup> $\pm$ 0.13 (n= 13)	2.44 <sup>j</sup> $\pm$ 0.15 (n= 13)	2.56 <sup>j</sup> $\pm$ 0.15 (n= 13)	2.55 <sup>j</sup> $\pm$ 0.17 (n= 13)	2.51 <sup>j</sup> $\pm$ 0.17 (n= 13)
<b>KT5823 (+)</b>											
<b>E(+)</b>	0.00 $\pm$ 0.00 (6)	0.00 $\pm$ 0.00 (6)	0.01 $\pm$ 0.01 (6)	0.05 $\pm$ 0.02 (6)	0.12 <sup>a</sup> $\pm$ 0.04 (6)	0.27 <sup>a</sup> $\pm$ 0.04 (6)	0.45 <sup>a</sup> $\pm$ 0.06 (6)	0.87 <sup>a</sup> $\pm$ 0.19 (6)	1.64 $\pm$ 0.21 (6)	1.85 $\pm$ 0.19 (6)	1.82 <sup>a</sup> $\pm$ 0.18 (6)
<b>E(-)</b>	0.00 $\pm$ 0.00 (5)	0.03 $\pm$ 0.02 (5)	0.18 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.06 (5)	0.33 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.09 (5)	0.66 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.17 (5)	0.98 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.21 (5)	1.31 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.24 (5)	1.78 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.27 (5)	2.04 $\pm$ 0.29 (5)	2.14 $\pm$ 0.29 (5)	2.12 $\pm$ 0.29 (5)
<b>ET</b>											
<b>KT5823 (-)</b>											
<b>E(+)</b>	0.00 $\pm$ 0.00 (n= 12)	0.00 <sup>a</sup> $\pm$ 0.00 (n= 12)	0.00 <sup>a</sup> $\pm$ 0.00 (n= 12)	0.03 <sup>a</sup> $\pm$ 0.01 (n= 12)	0.12 <sup>a</sup> $\pm$ 0.02 (n= 12)	0.32 <sup>a</sup> $\pm$ 0.06 (n= 12)	0.58 <sup>a</sup> $\pm$ 0.10 (n= 12)	0.81 <sup>a</sup> $\pm$ 0.11 (n= 12)	0.99 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12 (n= 12)	0.96 <sup>a</sup> $\pm$ 0.14 (n= 12)	0.84 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12 (n= 12)
<b>E(-)</b>	0.04 <sup>j</sup> $\pm$ 0.02 (n= 14)	0.09 <sup>j</sup> $\pm$ 0.05 (n= 14)	0.25 <sup>j</sup> $\pm$ 0.13 (n= 14)	0.49 <sup>j</sup> $\pm$ 0.20 (n= 14)	0.82 <sup>j</sup> $\pm$ 0.25 (n= 14)	1.11 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n= 14)	1.46 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n= 14)	1.76 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n= 14)	1.89 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n= 14)	1.89 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n= 14)	1.81 <sup>j</sup> $\pm$ 0.28 (n= 14)
<b>KT5823 (+)</b>											
<b>E(+)</b>	0.00 $\pm$ 0.00 (6)	0.01 $\pm$ 0.01 (6)	0.03 $\pm$ 0.02 (6)	0.06 $\pm$ 0.03 (6)	0.14 <sup>a</sup> $\pm$ 0.08 (6)	0.17 <sup>a</sup> $\pm$ 0.08 (6)	0.43 <sup>a</sup> $\pm$ 0.11 (6)	1.02 $\pm$ 0.14 (6)	1.29 $\pm$ 0.20 (6)	1.38 <sup>c</sup> $\pm$ 0.20 (6)	1.40 <sup>c</sup> $\pm$ 0.22 (6)
<b>E(-)</b>	0.00 $\pm$ 0.00 (6)	0.06 $\pm$ 0.03 (6)	0.15 <sup>a</sup> $\pm$ 0.04 (6)	0.31 <sup>a</sup> $\pm$ 0.09 (6)	0.51 <sup>a</sup> $\pm$ 0.13 (6)	0.67 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12 (6)	0.87 <sup>a</sup> $\pm$ 0.16 (6)	1.17 <sup>a</sup> $\pm$ 0.17 (6)	1.32 <sup>a</sup> $\pm$ 0.18 (6)	1.34 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.20 (6)	1.35 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.21 (6)

**Çizelge 4.7. (devam)** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma üzerinde seçici PKG inhibitörü KT5823'ün etkisi.

	Noradrenalin ( $\mu\text{M}$ )										
	0.001	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	100
<b>1,3-PBIT</b>											
<b>KT 5823 (-)</b>											
E(+)	0.01 $\pm$ 0.01 (n= 5)	0.01 $\pm$ 0.01 (n= 5)	0.03 $\pm$ 0.02 (n= 5)	0.06 <sup>a</sup> $\pm$ 0.02 (n= 5)	0.13 <sup>a</sup> $\pm$ 0.05 (n= 5)	0.28 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12 (n= 5)	0.62 <sup>a</sup> $\pm$ 0.21 (n= 5)	1.49 $\pm$ 0.35 (n= 5)	1.76 $\pm$ 0.36 (n= 5)	1.80 $\pm$ 0.36 (n= 5)	1.75 $\pm$ 0.36 (n= 5)
E(-)	0.13 <sup>j</sup> $\pm$ 0.09 (n= 5)	0.24 <sup>j</sup> $\pm$ 0.09 (n= 5)	0.48 <sup>j</sup> $\pm$ 0.11 (n= 5)	0.74 <sup>j</sup> $\pm$ 0.22 (n= 5)	1.13 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n= 5)	1.48 <sup>j</sup> $\pm$ 0.33 (n= 5)	1.82 <sup>j</sup> $\pm$ 0.35 (n= 5)	2.54 <sup>j</sup> $\pm$ 0.30 (n= 5)	2.84 <sup>j</sup> $\pm$ 0.28 (n= 5)	2.93 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n= 5)	2.94 <sup>j</sup> $\pm$ 0.29 (n= 5)
<b>KT5823 (+)</b>											
E(+)	0.01 $\pm$ 0.01 (6)	0.02 $\pm$ 0.01 (6)	0.04 $\pm$ 0.02 (6)	0.08 $\pm$ 0.04 (6)	0.30 $\pm$ 0.08 (6)	0.69 <sup>b</sup> $\pm$ 0.14 (6)	1.03 <sup>b</sup> $\pm$ 0.17 (6)	1.82 <sup>b</sup> $\pm$ 0.25 (6)	2.06 <sup>a</sup> $\pm$ 0.28 (6)	2.08 <sup>a</sup> $\pm$ 0.26 (6)	1.93 <sup>a</sup> $\pm$ 0.28 (6)
E(-)	0.02 $\pm$ 0.02 (6)	0.07 $\pm$ 0.03 (6)	0.22 <sup>a</sup> $\pm$ 0.04 (6)	0.33 <sup>a</sup> $\pm$ 0.07 (6)	0.58 <sup>a</sup> $\pm$ 0.08 (6)	0.92 <sup>a</sup> $\pm$ 0.14 (6)	1.06 <sup>a</sup> $\pm$ 0.23 (6)	1.52 <sup>ad</sup> $\pm$ 0.15 (6)	1.66 <sup>ad</sup> $\pm$ 0.20 (6)	1.70 <sup>ad</sup> $\pm$ 0.21 (6)	1.67 <sup>ad</sup> $\pm$ 0.22 (6)
<b>ET+1,3-PBIT</b>											
<b>KT 5823 (-)</b>											
E(+)	0.00 $\pm$ 0.00 (n= 5)	0.00 <sup>a</sup> $\pm$ 0.00 (n= 5)	0.02 <sup>a</sup> $\pm$ 0.01 (n= 5)	0.03 <sup>a</sup> $\pm$ 0.02 (n= 5)	0.05 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.01 (n= 5)	0.10 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.02 (n= 5)	0.28 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.07 (n= 5)	1.30 <sup>c</sup> $\pm$ 0.15 (n= 5)	1.56 <sup>c</sup> $\pm$ 0.20 (n= 5)	1.55 <sup>c</sup> $\pm$ 0.24 (n= 5)	1.49 <sup>c</sup> $\pm$ 0.24 (n= 5)
E(-)	0.03 $\pm$ 0.02 (n= 5)	0.02 <sup>a</sup> $\pm$ 0.01 (n= 5)	0.12 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.03 (n= 5)	0.25 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.07 (n= 5)	0.46 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.17 (n= 5)	0.84 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.12 (n= 5)	1.32 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.12 (n= 5)	2.56 <sup>j</sup> $\pm$ 0.12 (n= 5)	2.93 <sup>j</sup> $\pm$ 0.15 (n= 5)	2.99 <sup>j</sup> $\pm$ 0.16 (n= 5)	2.96 <sup>j</sup> $\pm$ 0.13 (n= 5)
<b>KT5823 (+)</b>											
E(+)	0.00 $\pm$ 0.00 (6)	0.00 $\pm$ 0.00 (6)	0.01 $\pm$ 0.01 (6)	0.05 $\pm$ 0.03 (6)	0.12 <sup>a</sup> $\pm$ 0.07 (6)	0.23 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.10 (6)	0.40 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.14 (6)	0.77 <sup>acf</sup> $\pm$ 0.23 (6)	1.08 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.19 (6)	1.13 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.17 (6)	1.13 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.19 (6)
E(-)	0.07 $\pm$ 0.06 (6)	0.15 $\pm$ 0.10 (6)	0.20 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.11 (6)	0.29 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.12 (6)	0.52 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.14 (6)	0.75 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.15 (6)	0.97 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.13 (6)	1.30 <sup>ajf</sup> $\pm$ 0.13 (6)	1.66 <sup>ajf</sup> $\pm$ 0.10 (6)	1.76 <sup>ajf</sup> $\pm$ 0.09 (6)	1.78 <sup>ajf</sup> $\pm$ 0.09 (6)

**Çizelge 4.7. (devam)** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma üzerinde seçici PKG inhibitörü KT5823'ün etkisi.

	Noradrenalin ( $\mu\text{M}$ )										
	0.001	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	100
<b>U0126</b>											
<b>KT 5823 (-)</b>											
E(+)	0.00 ± 0.00 (4)	0.01 ± 0.01 (4)	0.06 ± 0.03 (4)	0.17 ± 0.06 (4)	0.47 ± 0.13 (4)	0.74 ± 0.18 (4)	1.17 ± 0.15 (4)	1.45 ± 0.11 (4)	1.61 ± 0.13 (4)	1.62 ± 0.14 (4)	1.44 ± 0.08 (4)
E(-)	0.03 ± 0.02 (5)	0.07 ± 0.03 (5)	0.26 ± 0.07 (5)	0.62 ± 0.16 (5)	1.08 ± 0.23 (5)	1.49 ± 0.27 (5)	1.94 ± 0.28 (5)	2.23 ± 0.30 (5)	2.44 <sup>j</sup> ± 0.31 (5)	2.49 <sup>j</sup> ± 0.31 (5)	2.50 <sup>j</sup> ± 0.30 (5)
<b>KT5823 (+)</b>											
E(+)	0.01 ± 0.01 (5)	0.06 ± 0.02 (5)	0.14 <sup>b</sup> ± 0.05 (5)	0.36 <sup>b</sup> ± 0.08 (5)	0.64 <sup>b</sup> ± 0.11 (5)	1.07 <sup>bh</sup> ± 0.17 (5)	1.51 <sup>b</sup> ± 0.18 (5)	1.91 <sup>abh</sup> ± 0.14 (5)	2.15 <sup>abh</sup> ± 0.14 (5)	2.19 <sup>ah</sup> ± 0.13 (5)	2.12 <sup>ah</sup> ± 0.15 (5)
E(-)	0.05 ± 0.05 (5)	0.13 ± 0.05 (5)	0.27 ± 0.10 (5)	0.43 <sup>a</sup> ± 0.12 (5)	0.74 <sup>a</sup> ± 0.17 (5)	0.97 <sup>a</sup> ± 0.19 (5)	1.18 <sup>a</sup> ± 0.21 (5)	1.36 <sup>ah</sup> ± 0.23 (5)	1.46 <sup>ahj</sup> ± 0.25 (5)	1.50 <sup>ahj</sup> ± 0.26 (5)	1.50 <sup>ahj</sup> ± 0.25 (5)
<b>ET+U0126</b>											
<b>KT 5823 (-)</b>											
E(+)	0.00 ± 0.00 (7)	0.00 ± 0.00 (7)	0.01 <sup>a</sup> ± 0.01 (7)	0.04 <sup>ah</sup> ± 0.02 (7)	0.09 <sup>ah</sup> ± 0.02 (7)	0.25 <sup>ah</sup> ± 0.06 (7)	0.46 <sup>ah</sup> ± 0.09 (7)	0.77 <sup>ah</sup> ± 0.14 (7)	1.00 <sup>ah</sup> ± 0.15 (7)	1.00 <sup>ah</sup> ± 0.15 (7)	0.92 <sup>h</sup> ± 0.14 (7)
E(-)	0.00 ± 0.00 (7)	0.02 ± 0.02 (7)	0.07 ± 0.06 (7)	0.19 <sup>a</sup> ± 0.11 (7)	0.43 <sup>a</sup> ± 0.16 (7)	0.65 <sup>a</sup> ± 0.22 (7)	1.05 <sup>a</sup> ± 0.28 (7)	1.39 <sup>a</sup> ± 0.33 (7)	1.63 <sup>a</sup> ± 0.34 (7)	1.63 <sup>a</sup> ± 0.35 (7)	1.58 <sup>a</sup> ± 0.36 (7)
<b>KT5823 (+)</b>											
E(+)	0.01 ± 0.01 (5)	0.03 ± 0.02 (5)	0.05 ± 0.02 (5)	0.09 ± 0.02 (5)	0.23 ± 0.08 (5)	0.38 ± 0.10 (5)	0.91 ± 0.18 (5)	1.87 ± 0.58 (5)	2.64 <sup>ai</sup> ± 0.99 (5)	2.71 <sup>ai</sup> ± 1.02 (5)	2.71 <sup>ai</sup> ± 0.10 (5)
E(-)	0.19 ± 0.19 (5)	0.34 ± 0.20 (5)	0.57 ± 0.27 (5)	0.79 ± 0.36 (5)	1.12 ± 0.41 (5)	1.32 ± 0.42 (5)	1.55 ± 0.42 (5)	1.73 ± 0.42 (5)	1.84 ± 0.42 (5)	1.85 ± 0.41 (5)	1.86 ± 0.41 (5)

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyoyüre) dihidrobromür; çGS, çözünebilir guanilil siklaz; DMSO, dimetilsülfoksit; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; KT5823, (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-heksahidro-10-metoksi-2,9-dimetil-1-okso-9,12-epoksi-1H-diindolo-[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]-benzodiazosin-10-karboksilik asit metil ester; KT5823 (-), ortamda KT5823 yok; KT5823 (+), ortamda KT5823 var; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; PKG, protein kinaz G; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyobütadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Noradrenalin ile kontrol derişim-yanıt eğrilerinin alınmasından ardından, noradrenalin ortamdan uzaklaştırılmış, dokular ortamda KT5823'ün çözücüsü olan DMSO (%0.3, h/h) veya KT5823 (3  $\mu\text{M}$ ) yokken ve varken on beş dakika inkübe edilmiş ve noradrenalin derişim-yanıt eğrileri yinelenmiştir. Sonuçlar g olarak ortalama $\pm$ ortalamların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. <sup>a</sup> Kontrol/KT5823 (-), <sup>b</sup> Kontrol/KT5823 (+); <sup>c</sup> ET/KT5823 (-), <sup>d</sup> 1,3-PBIT/KT5823 (-), <sup>e</sup> 1,3-PBIT/KT5823 (+), <sup>f</sup> ET+1,3-PBIT/KT5823 (-), <sup>g</sup> ET+1,3-PBIT/KT5823 (+), <sup>h</sup> U0126/KT5823 (-), <sup>i</sup> ET+U0126/KT5823 (-) ve <sup>j</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).

Serum fizyolojik uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 38.04$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 43.78$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda KT5823'ün noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşturduğu değışiklikler anlamlıdır. KT5823 endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.1-3 ile 100  $\mu\text{M}$  ve endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda özellikle 0.01-3  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında azalmaya neden olmuştur.

ET uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 37.78$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 21.79$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değışiklikler kontrol grubuna göre anlamlıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.003-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları daha azken ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ).

ET uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 24.98$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 8.03$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda KT5823'ün noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşturduğu değışiklikler anlamlıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 10 ve 30  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları ortamda KT5823 yokken elde edilen değerlere göre daha çokken ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ).

Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 31.72$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 51.71$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrileri üzerinde oluşan değışiklikler, kontrol grubunda ortamda KT5823 yokken elde edilen değerlere göre anlamlıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.1-1  $\mu\text{M}$  ve endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda özellikle 0.01-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları kontrol grubuna göre daha azdır ( $P < 0.05$ ).



Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 30.70$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 17.40$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrileri üzerinde oluşan değişiklikler kontrol grubunda ortamda KT5823 varken elde edilen değerlere göre anlamlıdır. Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda özellikle 30 ve 100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları kontrol grubuna göre daha azken ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası sağlam dokularda kasılma yanıtları arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ).

#### 4.2.16.2 $E_{\text{maks}}$ ve $EC_{50}$ Değerleri

Sıçanlara serum fizyolojik veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{\text{maks}}$  ve  $EC_{50}$  değerleri üzerinde seçici PKG inhibitörü KT5823'ün etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.8 ile Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir.

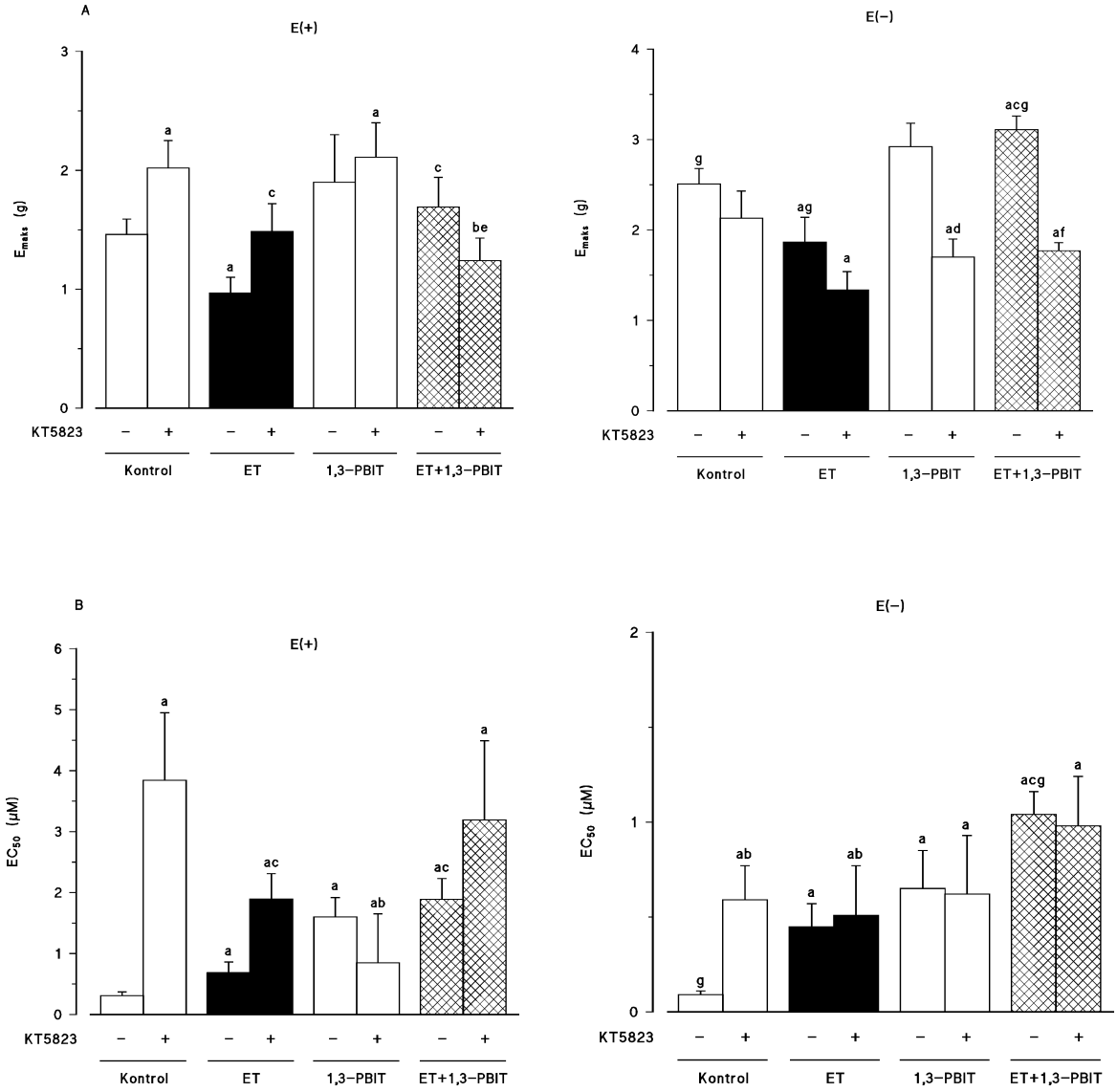
Serum fizyolojik uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda KT5823  $E_{\text{maks}}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde artmaya neden olmuştur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0352 ve 0.0009). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise KT5823  $E_{\text{maks}}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmazken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde artmaya neden olmuştur ( $P= 0.0058$ ).

ET uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda KT5823 yokken  $E_{\text{maks}}$  değerleri kontrol grubuna göre azalmış ( $P$  değerleri sırası ile 0.0151 ve 0.0309),  $EC_{50}$  değerleri ise artmıştır ( $P$  değerleri sırası ile 0.0180 ve 0.0290).

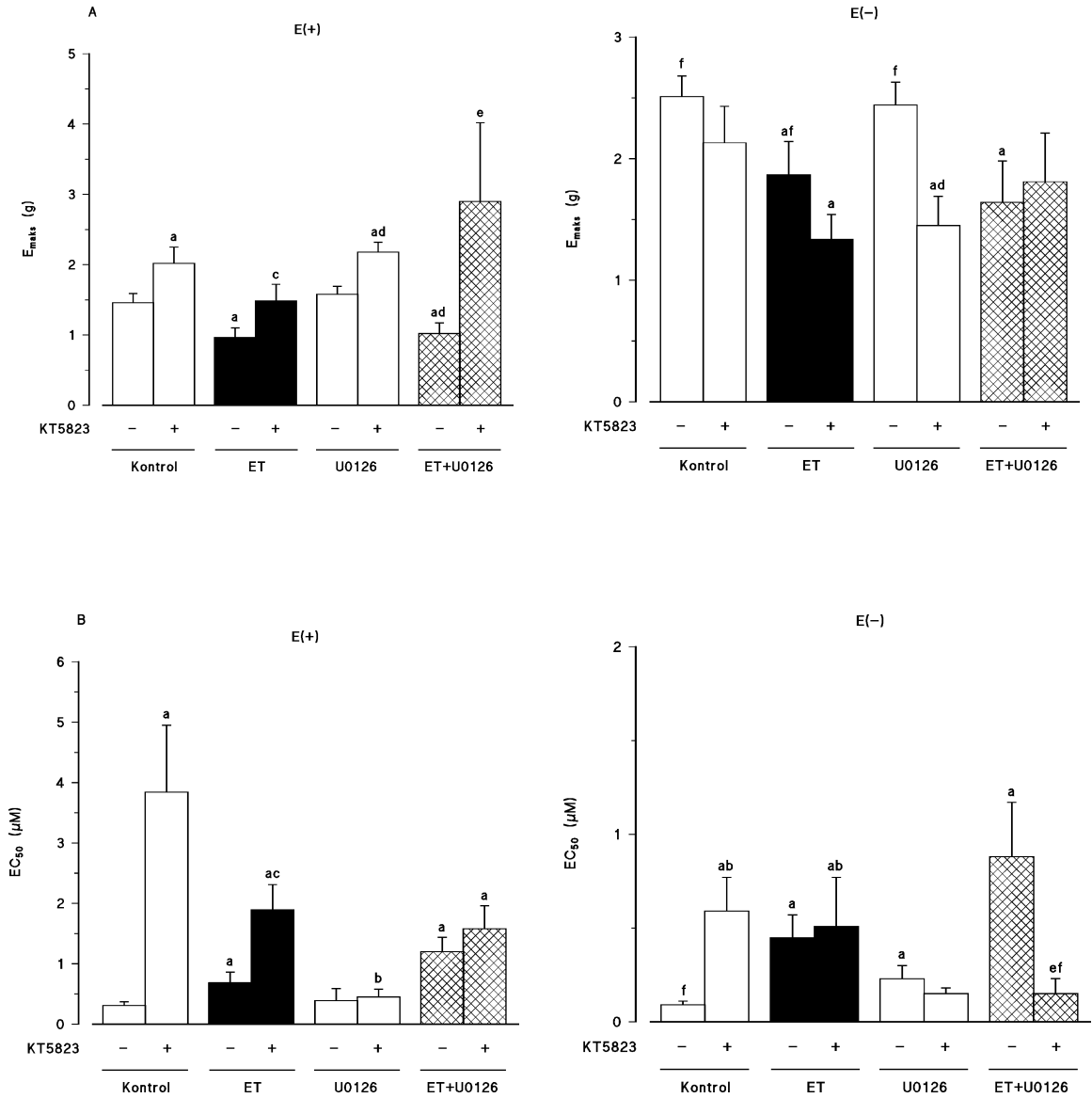
**Çizelge 4.8.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri üzerinde seçici PKG inhibitörü KT5823'ün etkisi.

	$E_{maks}$ (g)	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)
<b>Kontrol</b>		
<b>KT5823 (-)</b>		
E(+)	1.46±0.13 (n= 12)	0.31±0.06 (n= 12)
E(-)	2.51±0.17 (n= 13) <sup>j</sup>	0.09±0.02 (n= 13) <sup>j</sup>
<b>KT5823 (+)</b>		
E(+)	2.02±0.23 (n= 6) <sup>a</sup>	3.84±1.11 (n= 6) <sup>a</sup>
E(-)	2.13±0.30 (n= 5)	0.59±0.18 (n= 5) <sup>ab</sup>
<b>ET</b>		
<b>KT5823 (-)</b>		
E(+)	0.97±0.13 (n= 12) <sup>a</sup>	0.69±0.17 (n= 12) <sup>a</sup>
E(-)	1.87±0.27 (n= 14) <sup>aj</sup>	0.45±0.12 (n= 14) <sup>a</sup>
<b>KT5823 (+)</b>		
E(+)	1.49±0.23 (n= 6) <sup>c</sup>	1.90±0.41 (n= 6) <sup>ac</sup>
E(-)	1.34±0.20 (n= 6) <sup>a</sup>	0.51±0.26 (n= 6) <sup>ab</sup>
<b>1,3-PBIT</b>		
<b>KT5823 (-)</b>		
E(+)	1.90±0.40 (n= 5)	1.60±0.32 (n= 5) <sup>a</sup>
E(-)	2.92±0.26 (n= 5)	0.65±0.20 (n= 5) <sup>a</sup>
<b>KT5823 (+)</b>		
E(+)	2.11±0.29 (n= 6) <sup>a</sup>	0.85±0.28 (n= 6) <sup>ab</sup>
E(-)	1.70±0.20 (n= 6) <sup>ad</sup>	0.62±0.31 (n= 6) <sup>a</sup>
<b>ET+1,3-PBIT</b>		
<b>KT5823 (-)</b>		
E(+)	1.69±0.25 (n= 5) <sup>c</sup>	1.89±0.34 (n= 5) <sup>ac</sup>
E(-)	3.11±0.15 (n= 5) <sup>aci</sup>	1.04±0.13 (n= 5) <sup>aci</sup>
<b>KT5823 (+)</b>		
E(+)	1.24±0.19 (n= 6) <sup>bc</sup>	3.19±1.30 (n= 6) <sup>a</sup>
E(-)	1.77±0.09 (n= 6) <sup>af</sup>	0.98±0.26 (n= 6) <sup>a</sup>
<b>U0126</b>		
<b>KT5823 (-)</b>		
E(+)	1.58±0.11 (n= 4)	0.39±0.20 (n= 4)
E(-)	2.44±0.19 (n= 5) <sup>j</sup>	0.23±0.07 (n= 5) <sup>a</sup>
<b>KT5823 (+)</b>		
E(+)	2.18±0.14 (n= 5) <sup>ag</sup>	0.45±0.13 (n= 5) <sup>b</sup>
E(-)	1.45±0.24 (n= 5) <sup>ag</sup>	0.15±0.03 (n= 5)
<b>ET+U0126</b>		
<b>KT5823 (-)</b>		
E(+)	1.02±0.15 (n= 7) <sup>ag</sup>	1.20±0.24 (n= 7) <sup>a</sup>
E(-)	1.64±0.34 (n= 7) <sup>a</sup>	0.88±0.29 (n= 7) <sup>a</sup>
<b>KT5823 (+)</b>		
E(+)	2.90±1.12 (n= 5) <sup>h</sup>	1.58±0.38 (n= 5) <sup>a</sup>
E(-)	1.81±0.40 (n= 5)	0.15±0.08 (n= 5) <sup>hi</sup>

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöre) dihidrobromür; DMSO, dimetilsülfoksit; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; KT5823, (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-heksahidro-10-metoksi-2,9-dimetil-1-okso-9,12-epoksi-1H-diindolo-[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i] [1,6]-benzodiazosin-10-karboksilik asit metil ester; KT5823 (-), ortamda KT5823 yok; KT5823 (+), ortamda KT5823 var; PKG, protein kinaz G; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiy)butadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Noradrenalin (0.001-100  $\mu$ M) ile kontrol derişim-yanıt eğrilerinin alınmasının ardından, noradrenalin ortamdan uzaklaştırılmış, dokular ortamda KT5823'ün çözücüsü olan DMSO (%0.3, h/h) veya KT5823 (1  $\mu$ M) yokken ve varken on beş dakika inkübe edilmiş ve noradrenalin derişim-yanıt eğrileri yinelenmiştir. Sonuçlar g veya  $\mu$ M olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. <sup>a</sup> Kontrol/KT5823 (-), <sup>b</sup> Kontrol/KT5823 (+), <sup>c</sup> ET/KT5823 (-), <sup>d</sup> 1,3-PBIT/KT5823 (-), <sup>e</sup> 1,3-PBIT/KT5823 (+), <sup>f</sup> ET+1,3-PBIT/KT5823 (-), <sup>g</sup> U0126/KT5823 (-), <sup>h</sup> ET+U0126/KT5823 (-) ve <sup>i</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.11.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A)  $E_{maks}$  ve (B)  $EC_{50}$  değerleri üzerinde seçici PKG inhibitörü KT5823'ün etkisi. 1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür; DMSO, dimetilsülfoksit; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ET, endotoksin; KT5823, (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-heksahidro-10-metoksi-2,9-dimetil-1-okso-9,12-epoksi-1H-diindolo-[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]-benzodiazosin-10-karboksilik asit metil ester; KT5823 (-), ortamda KT5823 yok; KT5823 (+), ortamda KT5823 var; PKG, protein kinaz G. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Noradrenalin ile kontrol derişim-yanıt eğrilerinin alınmasının ardından, noradrenalin ortamdan uzaklaştırılmış, dokular ortamda KT5823'ü çözücüsü olan DMSO (%0.3, h/h) veya KT5823 (1 µM) yokken ve varken on beş dakika inkübe edilmiş ve noradrenalin derişim-yanıt eğrileri yinelenmiştir. 5-13 adet sıçandan elde edilen sonuçlar g veya µM olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol/KT5823 (-), <sup>b</sup> Kontrol/KT5823 (+), <sup>c</sup> ET/KT5823 (-), <sup>d</sup> 1,3-PBIT/KT5823 (-), <sup>e</sup> 1,3-PBIT/KT5823 (+), <sup>f</sup> ET+1,3-PBIT/KT5823 (-) ve <sup>g</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.12.** Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A) E<sub>max</sub> ve (B) EC<sub>50</sub> değerleri üzerinde seçici PKG inhibitörü KT5823'ün etkisi. DMSO, dimetilsülfoksit; E(+), endotel tabakası sağlam; E(-), endotel tabakası uzaklaştırılmış; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; KT5823, (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-heksahidro-10-metoksi-2,9-dimetil-1-okso-9,12-epoksi-1H-diindolo-[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]-benzodiazosin-10-karboksilik asit metil ester; KT5823 (-), ortamda KT5823 yok; KT5823 (+), ortamda KT5823 var; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; PKG, protein kinaz G; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien. U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 mg/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Noradrenalin ile kontrol derişim-yanıt eğrilerinin alınmasının ardından, noradrenalin ortamdan uzaklaştırılmış, dokular ortamda KT5823'ü çözücüsü olan DMSO (%0.3, h/h) veya KT5823 (1 µM) yokken ve varken on beş dakika inkübe edilmiş ve noradrenalin derişim-yanıt eğrileri yinelenmiştir. 4-13 adet sıçandan elde edilen sonuçlar g veya µM olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol/KT5823 (-), <sup>b</sup> Kontrol/KT5823 (+); <sup>c</sup> ET/KT5823 (-), <sup>d</sup> U0126/KT5823 (-), <sup>e</sup> ET+U0126/KT5823 (-) ve <sup>f</sup> E(+) değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

KT5823, endotel tabakası sağlam dokularda ET'nin neden olduğu  $E_{maks}$  değerlerindeki azalmayı önlerken ( $P= 0.0480$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde daha da çok bir artışa neden olmuştur ( $P= 0.0048$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise KT5823 ET'nin neden olduğu  $E_{maks}$  değerlerindeki azalma ve  $EC_{50}$  değerlerindeki artmayı önlememiştir ( $P > 0.05$ ).

ET uygulanan sıçanlardan izole edilen gerek endotel tabakası sağlam gerekse endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

ET uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubunda ortamda KT5823 yokken elde edilen değerlerden farklı değilken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha çoktur ( $P= 0.0009$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubu değerlerinden daha azken ( $P= 0.0007$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha çoktur ( $P= 0.0141$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde oluşan iNOS kaynaklı NO'nun  $\text{cGS/PKG}$  yolunu etkinleştirmesi sonucunda neden olduğu siklik GMP düzeylerindeki artmanın katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

## 4.2.17 ET'nin Neden Olduğu ve PKG İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının Etkisi

### 4.2.17.1 Derişim-Yanıt Eğrileri

Sıçanlara serum fizyolojik veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda seçici PKG inhibitörü KT5823 yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Serum fizyolojik uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda KT5823 yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinin anlamlı biçimde sola kaymasına ( $F= 69.63; P < 0.0001$ ) ve 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artmaya neden olmuştur ( $P < 0.05$ ).

Serum fizyolojik ( $F= 26.04; P < 0.0001$ ) veya ET ( $F= 18.13; P < 0.0001$ ) uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması ile ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler anlamlıdır. Serum fizyolojik uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması özellikle 0.01-3  $\mu\text{M}$  derişimde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artmaya neden olurken ( $P < 0.05$ ), endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokularda kasılma yanıtları arasındaki farklılık anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ).

#### 4.2.17.2 E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> Değerleri

Sıçanlara serum fizyolojik veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda seçici PKG inhibitörü KT5823 yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerleri üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.8 ile Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir.

Serum fizyolojik uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda KT5823 yokken E<sub>maks</sub> değerlerinde artmaya ( $P < 0.0001$ ), EC<sub>50</sub> değerlerinde ise azalmaya ( $P = 0.0005$ ) neden olmuştur.

Serum fizyolojik veya ET uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda KT5823 varken E<sub>maks</sub> değerlerinde bir değişikliğe neden olmazken ( $P > 0.05$ ), EC<sub>50</sub> değerlerinde azalmaya neden olmuştur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0087 ve 0.0168).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, endotel hücreleri olduğu kadar düz kas hücrelerinde de oluşan iNOS kaynaklı NO'nun çGS/PKG yolunu etkinleştirmesi sonucunda neden olduğu siklik GMP düzeylerindeki artmanın katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

## 4.2.18 ET'nin Neden Olduğu ve PKG İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi

### 4.2.18.1 Derişim-Yanıt Eğrileri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında ortamda seçici PKG inhibitörü KT5823 yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları ile ilgili bulgular Çizelge 4.7'de verilmiştir.

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 17.66$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 22.38$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda KT5823'ün noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler anlamlıdır. Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre özellikle 3  $\mu$ M derişimde daha çok ve 3-100  $\mu$ M derişimde daha az olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası sağlam dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 24.76$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 41.15$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.03-10  $\mu$ M derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha az olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 30.37$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 18.63$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan



farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.3-3  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha çok olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 34.06$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 49.76$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler, ortamda KT5823 yokken elde edilen kontrol grubu değerlerinden farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 10-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha çok olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda özellikle 0.01-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde daha azdır ( $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 20.37$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 78.95$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda KT5823 ile noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler anlamlıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 3  $\mu\text{M}$  ve endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda özellikle 3-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları, ortamda KT5823 yokken elde edilen değerlerden daha azdır ( $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 33.83$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 65.60$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklıdır. Endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda özellikle 0.003-1  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha azdır ( $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 25.44$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 22.87$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 10-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha

az olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 28.32$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 55.45$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler, ortamda KT5823 yokken elde edilen kontrol grubu değerlerinden farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.1-3  $\mu\text{M}$  ve endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda özellikle 0.01-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları kontrol grubuna göre daha azdır ( $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 16.13$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 35.41$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler 1,3-PBIT grubundan farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 22.86$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 25.22$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler 1,3-PBIT grubundan farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 1-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha az olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 28.90$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 12.67$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler ET grubundan farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.1-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha çok olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 17.35$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 22.53$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler ET grubundan farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

#### 4.2.18.2 $E_{maks}$ ve $EC_{50}$ Değerleri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında ortamda seçici PKG inhibitörü KT5823 yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.8 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda KT5823 yokken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubundan farklı değilken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha çöktür ( $P$  değerleri sırası ile  $< 0.0001$  ve  $0.0137$ ).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubundan farklı değilken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha azdır ( $P= 0.0087$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  ( $P= 0.0296$ ) ve  $EC_{50}$  ( $P= 0.0192$ ) değerleri, ortamda KT5823 yokken kontrol grubundaki değerlerden daha çöktür. Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise  $E_{maks}$  değerleri daha az ( $P= 0.0107$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha çöktür ( $P= 0.0033$ ).

KT5823, 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ). Endotel

tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise KT5823  $E_{maks}$  değerlerinde azalmaya neden olurken ( $P= 0.0041$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda KT5823 yokken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubundaki değerlerden farklı değilken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha çoktur ( $P < 0.0001$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri kontrol grubundaki değerlerden daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0499 ve 0.0016).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda KT5823 varken elde edilen  $EC_{50}$  değerleri kontrol grubundan farklı değilken ( $P > 0.05$ ),  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubuna göre daha azdır ( $P= 0.0230$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri, kontrol grubunda ortamda KT5823 yokken elde edilen değerlerden farklı değilken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha çoktur ( $P= 0.0023$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubunda elde edilen değerlerden daha azken ( $P= 0.0058$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha çoktur ( $P= 0.0007$ ).

KT5823, 1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise KT5823  $E_{maks}$  değerlerinde azalmaya neden olurken ( $P < 0.0001$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $P$  değerleri sırası ile 0.0139 ve 0.0030) ve uzaklaştırılmış ( $P$  değerleri sırası ile 0.0296 ve 0.0138) dokularda ortamda KT5823 yokken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri ET grubundaki değerlerden daha çoktur.

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri ET grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda KT5823 yokken ve varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri 1,3-PBIT grubundan daha azken ( $P = 0.0284$ ),  $EC_{50}$  değerleri farklı değildir ( $P > 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri 1,3-PBIT grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde oluşan iNOS kaynaklı NO'nun çGS/PKG yolunu etkinleştirilmesi sonucunda neden olduğu siklik GMP düzeylerindeki artmanın katkıda bulunabileceği düşüncesini desteklemektedir.

#### **4.2.19 Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının ET'nin Neden Olduğu PKG ve Sistemik iNOS İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Etkisi**

##### **4.2.19.1 Derişim-Yanıt Eğrileri**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda seçici PKG inhibitörü KT5823 yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.7'de verilmiştir.

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması sonucunda ortamda KT5823 yokken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerindeki değişiklikler anlamlıdır ( $F= 18.21; P < 0.0001$ ). Endotel tabakasının uzaklaştırılması özellikle 0.001-100  $\mu\text{M}$  derişimde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artmaya neden olmuştur ( $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması sonucunda ortamda KT5823 varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerindeki değişikliklerin anlamlı olmasına karşın ( $F= 22.84; P < 0.0001$ ), kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması sonucunda ortamda KT5823 yokken ( $F= 80.88; P < 0.0001$ ) ve varken ( $F= 24.77; P < 0.0001$ ) elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerindeki değişiklikler anlamlıdır. Endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda KT5823 yokken özellikle 0.003-100  $\mu\text{M}$  ve ortamda KT5823 varken özellikle 0.01-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artmaya neden olmuştur ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2.19.2 $E_{\text{maks}}$ ve $EC_{50}$ Değerleri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda seçici PKG inhibitörü KT5823 yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{\text{maks}}$  ve  $EC_{50}$  değerleri üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.8 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda KT5823 yokken ve varken elde edilen  $E_{\text{maks}}$  ve  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda KT5823 yokken elde edilen  $E_{maks}$  değerlerinde artmaya ( $P= 0.0013$ ) ve  $EC_{50}$  değerlerinde azalmaya neden olmuştur ( $P= 0.0490$ ).

1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  değerlerinde artmaya neden olurken ( $P= 0.0266$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, endotel hücreleri olduğu kadar düz kas hücrelerinde de oluşan iNOS kaynaklı NO'nun çGS/PKG yolunu etkinleştirmesi sonucunda neden olduğu siklik GMP düzeylerindeki artmanın katkıda bulunabileceği düşüncesini desteklemektedir.

#### **4.2.20 ET'nin Neden Olduğu ve PKG İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi**

##### **4.2.20.1 Derişim-Yanıt Eğrileri**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında ortamda seçici PKG inhibitörü KT5823 yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları ile ilgili bulgular Çizelge 4.7'de verilmiştir.

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 47.28$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 15.79$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda KT5823'ün noradrenalin

derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler anlamlıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre özellikle 0.3-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde daha çok olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda özellikle 3-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde daha çoktur ( $P < 0.05$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 31.74$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 41.62$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 49.28$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 13.53$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.01-10  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha çok olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 43.12$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 43.04$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler, ortamda KT5823 yokken elde edilen kontrol grubu değerlerinden farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 3-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha çok olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda özellikle 0.03-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde daha azdır ( $P < 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 6.97$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 5.43$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda KT5823 ile noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler anlamlıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 10-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları, ortamda KT5823 yokken elde edilen değerlerden daha çok olmasına karşın ( $P$



$< 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 33.31$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 35.31$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.01-30  $\mu\text{M}$  ve endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda özellikle 0.03-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre daha azdır ( $P < 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 7.14$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 6.25$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklı olmasına karşın kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 11.63$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 24.17$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler, ortamda KT5823 yokken elde edilen kontrol grubu değerlerinden farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 10-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde daha çok olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 30.25$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 12.72$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler U0126 grubundan farklıdır. Endotel tabakası sağlam dokularda özellikle 0.03-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde daha az olmasına karşın ( $P < 0.05$ ), endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 6.47$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 4.46$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda

KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler U0126 grubundan farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 22.63$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 8.21$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 yokken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler ET grubundan farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ( $F= 6.40$ ;  $P < 0.0001$ ) ve uzaklaştırılmış ( $F= 5.86$ ;  $P < 0.0001$ ) dokularda ortamda KT5823 varken noradrenalin derişim-yanıt eğrilerinde oluşan değişiklikler ET grubundan farklı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

#### 4.2.20.2 $E_{maks}$ ve $EC_{50}$ Değerleri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında ortamda seçici PKG inhibitörü KT5823 yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.8 ve Şekil 4.12'de verilmiştir.

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda KT5823 yokken elde edilen  $E_{maks}$   $EC_{50}$  değerleri kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubundan farklı değilken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha çoktur ( $P= 0.0384$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubundan farklı değilken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha azdır ( $P= 0.0043$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri ortamda KT5823 yokken kontrol grubundaki değerlerden daha çokken ( $P= 0.0057$ ),  $EC_{50}$  değerleri arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri ortamda KT5823 yokken kontrol grubundaki değerlerden daha azken ( $P= 0.0034$ ),  $EC_{50}$  değerleri arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

KT5823, U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda  $E_{maks}$  değerlerinde artmaya neden olurken ( $P= 0.0138$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise KT5823  $E_{maks}$  değerlerinde azalmaya neden olurken ( $P= 0.0320$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda KT5823 yokken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri kontrol grubundaki değerlerden daha azken ( $P$  değerleri sırası ile 0.0494 ve 0.0195),  $EC_{50}$  değerleri daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0011 ve 0.0013).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri, kontrol grubunda ortamda KT5823 yokken elde edilen değerlerden farklı değilken ( $P > 0.05$ ),  $EC_{50}$  değerleri daha çoktur ( $P= 0.0052$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

KT5823, U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda  $E_{maks}$  değerlerinde artmaya neden olurken ( $P= 0.0480$ ),  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise KT5823  $EC_{50}$  değerlerinde azalmaya neden olurken ( $P= 0.0480$ ),  $E_{maks}$  değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda KT5823 yokken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri ET grubundaki değerlerden farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri ET grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam dokularda ortamda KT5823 yokken elde edilen  $E_{maks}$  değerleri U0126 grubundan daha azken ( $P= 0.0317$ ),  $EC_{50}$  değerleri farklı değildir ( $P > 0.05$ ). Öte yandan, ortamda KT5823 varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ). Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise ortamda KT5823 yokken ve varken elde edilen  $E_{maks}$  ve  $EC_{50}$  değerleri U0126 grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1/ERK1/2/iNOS yolu dışında PKG etkinliğinde artışa neden olabilecek bir ya da birden çok mediyatörün katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

#### 4.2.21 Endotel Tabakasının Uzaklaştırılmasının ET'nin Neden Olduğu PKG ve Sistemik ERK1/2 İnhibisyonu ile Önlenebilen Noradrenalin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarındaki Azalma Üzerinde Etkisi

##### 4.2.21.1 Derişim-Yanıt Eğrileri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda seçici PKG inhibitörü KT5823 yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.7'de verilmiştir.

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması sonucunda ortamda KT5823 yokken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerindeki değişiklikler anlamlıdır ( $F= 20.78$ ;  $P < 0.0001$ ). Endotel tabakasının uzaklaştırılması özellikle 10-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında artmaya neden olmuştur ( $P < 0.05$ ).

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması sonucunda ortamda KT5823 varken elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerindeki değişiklikler anlamlıdır ( $F= 22.78$ ;  $P < 0.0001$ ). Endotel tabakasının uzaklaştırılması özellikle 10-100  $\mu\text{M}$  derişimlerde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında azalmaya neden olmuştur ( $P < 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması sonucunda ortamda KT5823 yokken ( $F= 10.45$ ;  $P < 0.0001$ ) ve varken ( $F= 3.87$ ;  $P < 0.0001$ ) elde edilen noradrenalin derişim-yanıt eğrilerindeki değişiklikler anlamlı olmasına karşın, kasılma yanıtları arasında fark yoktur ( $P > 0.05$ ).

#### 4.2.21.2 E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> Değerleri

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında endotel tabakasının uzaklaştırılmasının ortamda seçici PKG inhibitörü KT5823 yokken ve varken noradrenalin ile ikinci kez çıkarılan kümülatif derişim-yanıt eğrilerinden hesaplanan E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerleri üzerindeki etkisi ile ilgili bulgular Çizelge 4.8 ve Şekil 4.12'de verilmiştir.

U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda KT5823 yokken elde edilen E<sub>maks</sub> değerlerinde artmaya neden olurken ( $P = 0.0444$ ), EC<sub>50</sub> değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ). Öte yandan, endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda KT5823 varken elde edilen E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ).

U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokulardan endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda KT5823 yokken elde edilen E<sub>maks</sub> ve EC<sub>50</sub> değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ). Öte yandan, endotel tabakasının uzaklaştırılması ortamda KT5823 varken elde edilen EC<sub>50</sub> değerlerinde azalmaya neden olurken ( $P = 0.0079$ ), E<sub>maks</sub> değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu hipotansiyon ve torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, endotel hücreleri olduğu kadar düz kas hücrelerinde de MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki, dolayısı ile etkinliğindeki artışın çGS/PKG yolunu etkinleştirmesi sonucunda neden olduğu siklik GMP düzeylerindeki artmanın katkıda bulunabileceği düşüncesini desteklemektedir.

### **4.3 Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda $\alpha$ -Düz Kas Aktini ile MEK1, ERK1/2, iNOS, çGS, PKG ve Kaspaz-3 Protein Ekspresyonu ve/veya Etkinliğinin ve Serumda iNOS Etkinliğinin Ölçüldüğü Çalışmalar**

#### **4.3.1 ET, 1,3-PBIT ve/veya U0126'nın $\alpha$ -Düz Kas Aktini Protein Ekspresyon Düzeyi Üzerindeki Etkisi**

Sıçanlara serum fizyolojik veya ET ile birlikte 1,3-PBIT veya U0126 uygulanmasından sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında  $\alpha$ -düz kas aktini protein ekspresyon düzeyi ile ilgili bulgular Çizelge 4.9 ve Şekil 4.13'te verilmiştir.

Serum fizyolojik, ET, 1,3-PBIT ve/veya U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda  $\alpha$ -düz kas aktini protein ekspresyon düzeyinde oluşan değişiklikler bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur ( $P > 0.05$ ). Bundan dolayı, etkinlikleri ölçülen enzimlerin protein ekspresyonu ile ilgili bulgular, ölçülen enzim proteini düzeylerinin ilgili gruba ilişkin ortalama  $\alpha$ -düz kas aktini protein ekspresyon değerine oranlanarak verilmiştir.

#### **4.3.2 ET'nin MEK1 Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi**

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında MEK1 protein ekspresyonu ve fosforile MEK1 protein düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.10 ve Şekil 4.14'te verilmiştir.

**Çizelge 4.9.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında  $\alpha$ -düz kas aktini protein ekspresyon düzeyi üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi.

<b><math>\alpha</math>-Düz kas aktini protein ekspresyon düzeyi (göreceli yoğunluk)</b>	
<b>Kontrol</b>	5539±610 (n= 13)
<b>ET</b>	4548±590 (n= 12)
<b>1,3-PBIT</b>	3906±625 (n= 11)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	4672±538 (n= 12)
<b>U0126</b>	3876±713 (n= 12)
<b>ET+U0126</b>	4529±750 (n= 10)

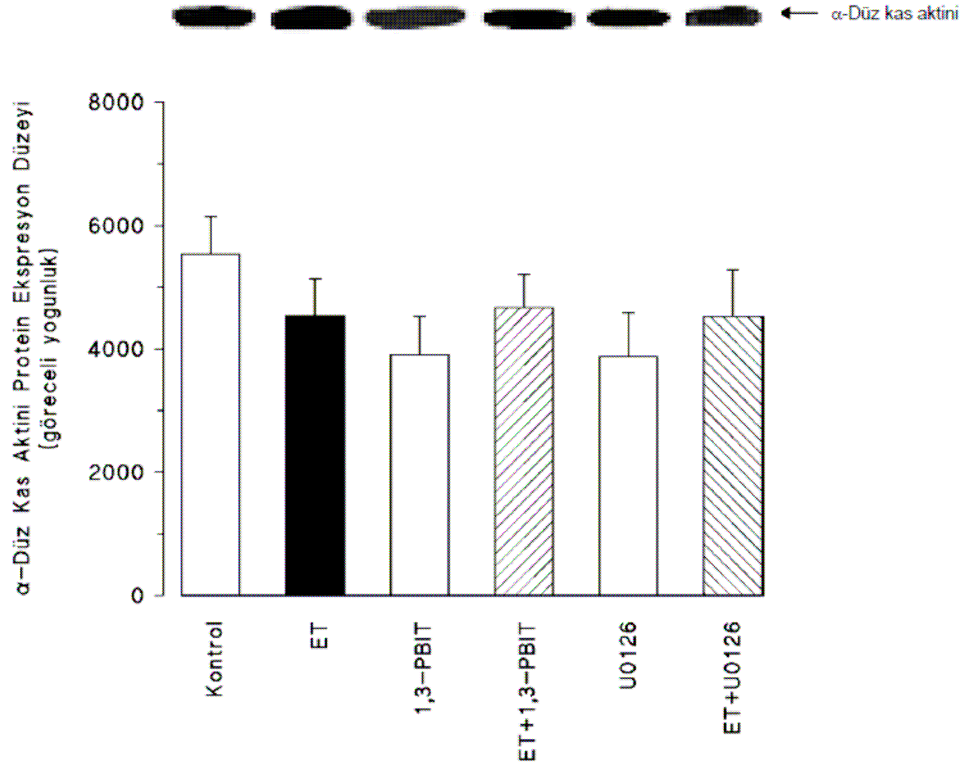
1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöre) dihidrobromür; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiy)butadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P > 0.05$ ).

**Çizelge 4.10.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında MEK1 protein ekspresyon düzeyi ve etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi.

<b>MEK1 protein ekspresyon düzeyi (göreceli yoğunluk/<math>\alpha</math>-düz kas aktini)</b>	
<b>Kontrol</b>	1.02±0.17 (n= 8)
<b>ET</b>	0.99±0.16 (n= 8)
<b>1,3-PBIT</b>	1.09±0.19 (n= 8)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	0.95±0.15 (n= 8)
<b>U0126</b>	1.23±0.20 (n= 8)
<b>ET+U0126</b>	1.00±0.16 (n= 8)
<b>Fosforile MEK1 protein düzeyi (kontrolün %'si)</b>	
<b>Kontrol</b>	100±4.20 (n= 10)
<b>ET</b>	113±10.75 (n= 7) <sup>a</sup>
<b>1,3-PBIT</b>	96±8.04 (n= 11)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	130±13.19 (n= 9) <sup>ab</sup>
<b>U0126</b>	100±9.15 (n= 8)
<b>ET+U0126</b>	131±10.67 (n= 9) <sup>ac</sup>

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöre) dihidrobromür; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiy)butadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> 1,3-PBIT veya <sup>c</sup> U0126 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).

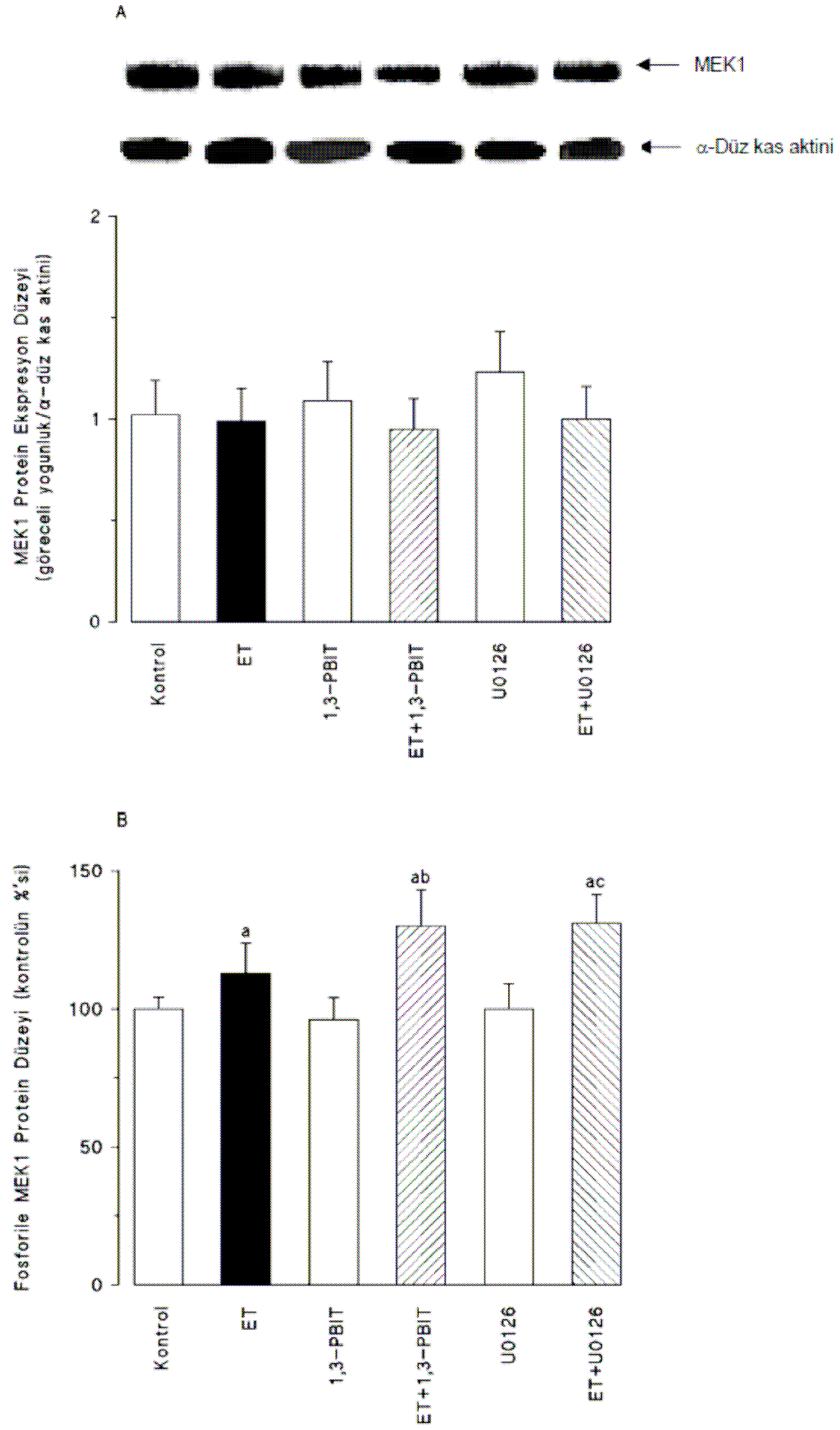




**Şekil 4.13.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında α-düz kas aktini protein ekspresyon düzeyi üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi. *1,3-PBIT*, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyoiüre) dihidrobromür; *ERK1/2*, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; *ET*, endotoksin; *1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)butadien*; *MEK1*, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; *U0126*, *1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene*. *1,3-PBIT* (10 mg/kg, IP) veya *U0126* (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya *ET* (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *n*= 10-13.

ET, MEK1 protein ekspresyon düzeyinde bir değişikliğe neden olmazken ( $P > 0.05$ ), MEK1 etkinliğinin bir göstergesi olarak ELISA yöntemi ile ölçülen fosforile MEK1 protein düzeyinde artmaya neden olmuştur ( $P= 0.0413$ ).

Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin torasik aorta endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1 protein ekspresyon düzeyinde bir değişikliğe neden olmaksızın, etkinliğinde artmaya neden olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.14.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında MEK1 (A) protein ekspresyonu ve (B) etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi. 1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 7-11. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> 1,3-PBIT veya <sup>c</sup> U0126 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

#### **4.3.2.1 Endotoksemik Sıçanlarda MEK1 Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında MEK1 protein ekspresyonu ve fosforile MEK1 protein düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.10 ve Şekil 4.14'te verilmiştir.

1,3-PBIT'nin gerek tek başına ve gerekse ET ile birlikte uygulanması durumunda MEK1 protein ekspresyon düzeyinde oluşan değişiklikler kontrol ve/veya ET gruplarından farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT tek başına uygulandığında fosforile MEK1 protein düzeyinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ). ET'nin fosforile MEK1 protein düzeyinde neden olduğu artma, seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile önlenmemiştir ( $P > 0.05$ ). ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda ölçülen fosforile MEK1 protein düzeyi, gerek kontrol ve gerekse 1,3-PBIT tek başına uygulandığında elde edilen değerlere göre daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0355 ve 0.0322).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu MEK1 etkinliğindeki artmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun katkıda bulunmadığını göstermektedir.

#### **4.3.2.2 Endotoksemik Sıçanlarda MEK1 Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında MEK1 protein ekspresyonu ve fosforile MEK1 protein düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.10 ve Şekil 4.14'te verilmiştir.

U0126'nın gerek tek başına ve gerekse ET ile birlikte uygulanması durumunda MEK1 protein ekspresyon düzeyinde oluşan değişiklikler kontrol ve/veya ET gruplarından farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

ET'nin fosforile MEK1 protein düzeyinde neden olduğu artma, MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 ile önlenmemiştir ( $P > 0.05$ ). U0126 tek başına uygulandığında fosforile MEK1 protein düzeyinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ). ET ile birlikte U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda ölçülen fosforile MEK1 protein düzeyi, gerek kontrol ve gerekse U0126 tek başına uygulandığında elde edilen değerlere göre daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0116 ve 0.0455).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu MEK1 etkinliğindeki artmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki, dolayısı ile etkinliğindeki artışın katkıda bulunmadığını göstermektedir.

#### **4.3.3 ET'nin ERK1/2 Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi**

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında ERK1/2 ve fosforile ERK1/2 protein ekspresyonu ile fosforile ERK1/2 protein düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.11 ve Şekil 4.15'te verilmiştir.

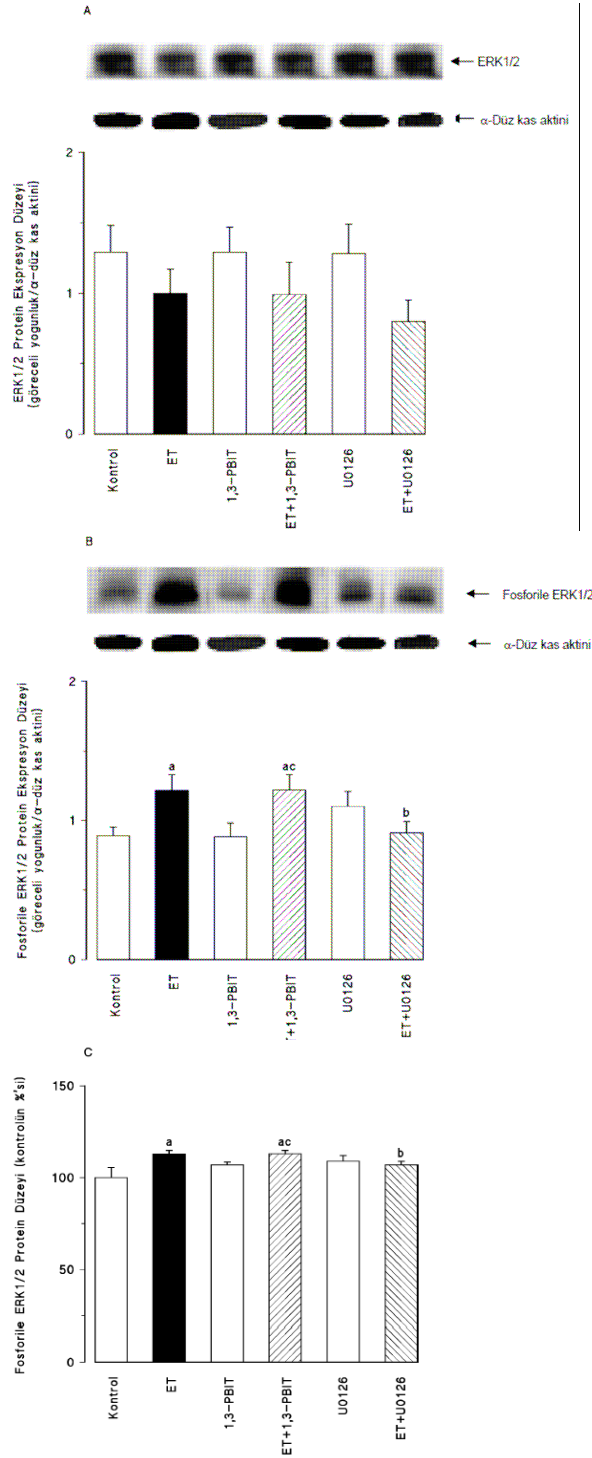
ET, ERK1/2 protein ekspresyon düzeyinde bir değişikliğe neden olmazken ( $P > 0.05$ ), ERK1/2 etkinliğinin bir göstergesi olarak gerek jel elektroforezi yöntemi ile ölçülen fosforile ERK1/2 protein ekspresyonu ve gerekse ELISA yöntemi ile ölçülen fosforile ERK1/2 protein düzeylerinde artmaya neden olmuştur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0223 ve 0.0434).

**Çizelge 4.11.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında ERK1/2 protein ekspresyonu ve etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi.

<b>ERK1/2 protein ekspresyon düzeyi (göreceli yoğunluk/<math>\alpha</math>-düz kas aktini)</b>	
<b>Kontrol</b>	1.29 $\pm$ 0.19 (n= 7)
<b>ET</b>	1.00 $\pm$ 0.17 (n= 7)
<b>1,3-PBIT</b>	1.29 $\pm$ 0.18 (n= 6)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	0.99 $\pm$ 0.23 (n= 6)
<b>U0126</b>	1.28 $\pm$ 0.21 (n= 6)
<b>ET+U0126</b>	0.80 $\pm$ 0.15 (n= 6)
<b>Fosforile ERK1/2 protein ekspresyon düzeyi (göreceli yoğunluk/<math>\alpha</math>-düz kas aktini)</b>	
<b>Kontrol</b>	0.89 $\pm$ 0.06 (n= 6)
<b>ET</b>	1.22 $\pm$ 0.11 (n= 5) <sup>a</sup>
<b>1,3-PBIT</b>	0.88 $\pm$ 0.10 (n= 5)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	1.22 $\pm$ 0.11 (n= 5) <sup>ac</sup>
<b>U0126</b>	1.10 $\pm$ 0.11 (n= 6)
<b>ET+U0126</b>	0.91 $\pm$ 0.08 (n= 6) <sup>b</sup>
<b>Fosforile ERK1/2 protein düzeyi (kontrolün %'si)</b>	
<b>Kontrol</b>	100 $\pm$ 5.46 (n= 8)
<b>ET</b>	113 $\pm$ 1.89 (n= 10) <sup>a</sup>
<b>1,3-PBIT</b>	107 $\pm$ 1.48 (n= 10)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	113 $\pm$ 1.87 (n= 12) <sup>ac</sup>
<b>U0126</b>	109 $\pm$ 2.98 (n= 10)
<b>ET+U0126</b>	107 $\pm$ 1.82 (n= 11) <sup>b</sup>

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> ET veya <sup>c</sup> 1,3-PBIT grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin torasik aorta endotel ve/veya düz kas hücrelerinde ERK1/2 protein ekspresyonunu değiştirmeksizin, etkinliğinde artmaya neden olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.15.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında (A) ERK1/2 protein ekspresyonu, (B) fosforile ERK1/2 protein ekspresyonu ve (C) ERK1/2 etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi. 1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyüüre) dihidrobromür; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 5-12. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> ET veya <sup>c</sup> 1,3-PBIT grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

#### 4.3.3.1 Endotoksemik Sıçanlarda ERK1/2 Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında ERK1/2 ve fosforile ERK1/2 protein ekspresyonu ile fosforile ERK1/2 protein düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.11 ve Şekil 4.15'te verilmiştir.

1,3-PBIT'nin gerek tek başına ve gerekse ET ile birlikte uygulanması durumunda gerek jel elektroforezi yöntemi ile ölçülen ERK1/2 ve fosforile ERK1/2 protein ekspresyonu ve gerekse ELISA yöntemi ile ölçülen fosforile ERK1/2 protein düzeylerinde oluşan değişiklikler kontrol ve/veya ET gruplarından farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

ET'nin gerek jel elektroforezi yöntemi ile ölçülen fosforile ERK1/2 protein ekspresyonu ve gerekse ELISA yöntemi ile ölçülen fosforile ERK1/2 protein düzeylerinde neden olduğu artma 1,3-PBIT ile önlenmemiştir ( $P > 0.05$ ). ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda ELISA yöntemi ile ölçülen fosforile ERK1/2 protein düzeyleri, gerek kontrol ve gerekse 1,3-PBIT tek başına uygulandığında elde edilen değerlere göre daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0221 ve 0.0464). ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda ELISA yöntemi ile ölçülen fosforile ERK1/2 protein düzeyleri, gerek kontrol ve gerekse 1,3-PBIT tek başına uygulandığında elde edilen değerlere göre de daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0305 ve 0.0400).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu ERK1/2 etkinliğindeki artmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun katkıda bulunmadığını göstermektedir.

#### 4.3.3.2 Endotoksemik Sıçanlarda ERK1/2 Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında ERK1/2 ve fosforile ERK1/2 protein ekspresyonu ile fosforile ERK1/2 protein düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.11 ve Şekil 4.15'te verilmiştir.

U0126'nın gerek tek başına ve gerekse ET ile birlikte uygulanması durumunda gerek jel elektroforezi yöntemi ile ölçülen ERK1/2 ve fosforile ERK1/2 protein ekspresyonu ve gerekse ELISA yöntemi ile ölçülen fosforile ERK1/2 protein düzeylerinde oluşan değişiklikler kontrol ve/veya ET gruplarından farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

ET'nin gerek jel elektroforezi yöntemi ile ölçülen fosforile ERK1/2 protein ekspresyonu ve gerekse ELISA yöntemi ile ölçülen fosforile ERK1/2 protein düzeylerinde neden olduğu artma U0126 ile önlenmiştir ( $P$  değerleri sırası ile 0.0434 ve 0.0202). ET ile birlikte U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda ELISA yöntemi ile ölçülen fosforile ERK1/2 protein düzeyi, gerek kontrol ve gerekse U0126 tek başına uygulandığında elde edilen değerlerden farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu ERK1/2 etkinliğindeki artmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki artışın katkıda bulunduğunu göstermektedir.



#### **4.3.4 ET'nin iNOS Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi**

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında iNOS protein ekspresyonu ile doku ve serum nitrit+nitrat düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.12 ve Şekil 4.16'de verilmiştir.

ET, doku iNOS protein ekspresyon düzeyi ile birlikte iNOS etkinliğinin bir göstergesi olarak ELISA yöntemi ile ölçülen serum ve doku nitrit+nitrat düzeylerinde artmaya neden olmuştur (*P değerleri sırası ile 0.0287, 0.0100 ve 0.0392*).

Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin torasik aorta endotel ve/veya düz kas hücrelerinde iNOS protein ekspresyonu ve etkinliğinde artmaya neden olduğunu göstermektedir.

##### **4.3.4.1 Endotoksemik Sıçanlarda iNOS Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi**

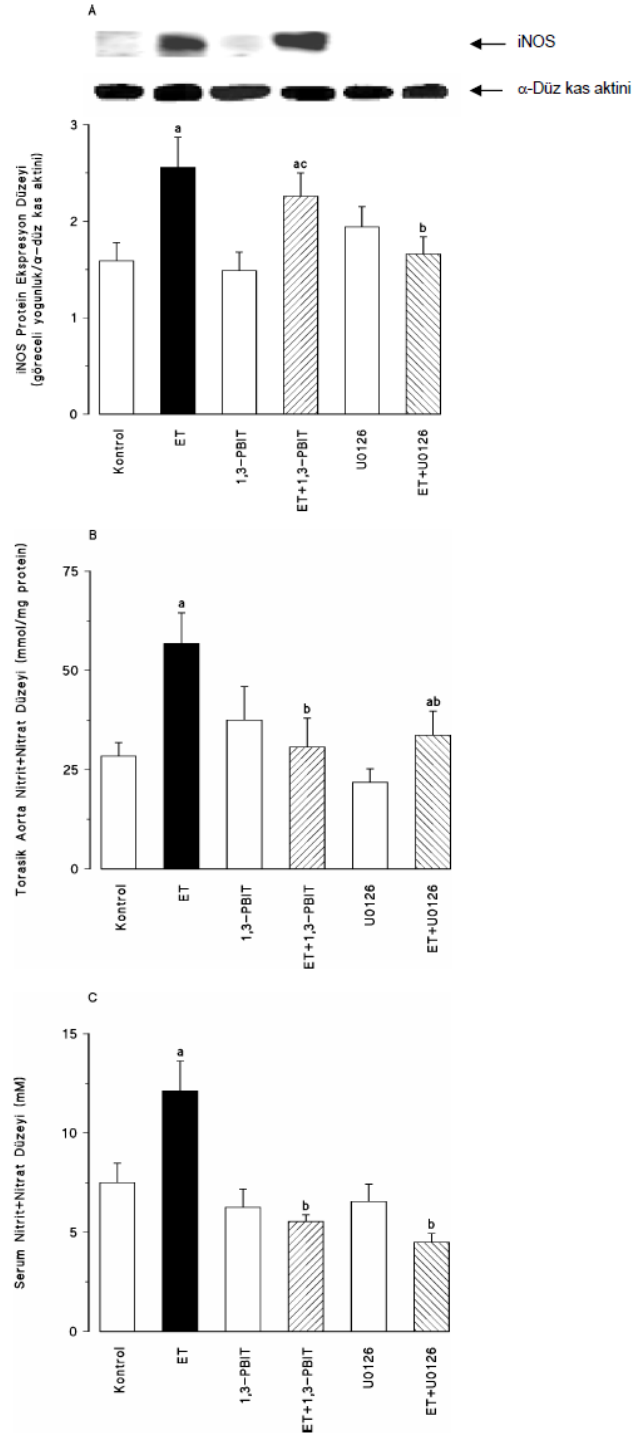
Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında iNOS protein ekspresyonu ile doku ve serum nitrit+nitrat düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.12 ve Şekil 4.16'da verilmiştir.

1,3-PBIT'nin gerek tek başına ve gerekse ET ile birlikte uygulanması durumunda iNOS protein ekspresyon düzeylerinde oluşan değişiklikler kontrol ve/veya ET gruplarından farklı değildir (*P > 0.05*).

**Çizelge 4.12.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında iNOS protein ekspresyonu ile doku ve serum nitrit+nitrat düzeyleri üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi.

<b>iNOS protein ekspresyon düzeyi (göreceli yoğunluk/<math>\alpha</math>-düz kas aktini)</b>	
<b>Torasik aorta</b>	
<b>Kontrol</b>	1.59±0.19 (n= 8)
<b>ET</b>	2.56±0.31 (n= 11) <sup>a</sup>
<b>1,3-PBIT</b>	1.49±0.19 (n= 8)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	2.26±0.24 (n= 10) <sup>ac</sup>
<b>U0126</b>	1.94±0.21 (n= 9)
<b>ET+U0126</b>	1.66±0.18 (n= 8) <sup>b</sup>
<b>Nitrit+nitrat düzeyi (mmol/mg protein)</b>	
<b>Torasik aorta</b>	
<b>Kontrol</b>	28.40±3.42 (n= 5)
<b>ET</b>	56.80±7.74 (n= 5) <sup>a</sup>
<b>1,3-PBIT</b>	37.50±8.44 (n= 5)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	30.70±7.32 (n= 5) <sup>b</sup>
<b>U0126</b>	21.83±3.40 (n= 6)
<b>ET+U0126</b>	33.70±6.06 (n= 5) <sup>ab</sup>
<b>Nitrit+nitrat düzeyi (mM)</b>	
<b>Serum</b>	
<b>Kontrol</b>	7.50±0.98 (n= 6)
<b>ET</b>	12.14±1.49 (n= 7) <sup>a</sup>
<b>1,3-PBIT</b>	6.25±0.93 (n= 6)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	5.54±0.34 (n= 7) <sup>b</sup>
<b>U0126</b>	6.55±0.87 (n= 6)
<b>ET+U0126</b>	4.49±0.45 (n= 6) <sup>b</sup>

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöre) dihidrobromür; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiy)butadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülerek torasik aortaları izole edilmiş, alınan kanlardan ise serum örnekleri hazırlanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> ET veya <sup>c</sup> 1,3-PBIT grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.16.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında (A) iNOS protein ekspresyonu ve (B) nitrit+nitrat düzeyleri ile (C) serum nitrit+nitrat düzeyleri üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi. 1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülerek torasik aortaları izole edilmiş, alınan kanlardan ise serum örnekleri hazırlanmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 5-11. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> ET veya <sup>c</sup> 1,3-PBIT grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

ET'nin iNOS protein ekspresyon düzeylerinde neden olduğu artma 1,3-PBIT ile önlenemezken ( $P > 0.05$ ), 1,3-PBIT serum ve dokularda ET'nin neden olduğu nitrit+nitrat düzeylerindeki artmayı önlemiştir ( $P$  değerleri sırası ile 0.0399 ve 0.0006). ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan sıçanların serum ve dokularında ölçülen nitrit+nitrat düzeyleri kontrol ve 1,3-PBIT uygulanan gruplardan farklı değilken ( $P > 0.05$ ), iNOS protein düzeyleri gerek kontrol ve gerekse 1,3-PBIT tek başına uygulanan gruplardan daha çoktur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0286 ve 0.0461).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu iNOS protein ekspresyonu ve etkinliğindeki artmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun katkıda bulunduğunu göstermektedir.

#### **4.3.4.2 Endotoksemik Sıçanlarda iNOS Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında iNOS protein ekspresyonu ile doku ve serum nitrit+nitrat düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.12 ve Şekil 4.16'da verilmiştir.

U0126'nın gerek tek başına ve gerekse ET ile birlikte uygulanması durumunda iNOS protein ekspresyon düzeylerinde oluşan değişiklikler kontrol ve/veya ET gruplarından farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

ET'nin iNOS protein ekspresyon düzeyleri ile serum ve dokularda nitrit+nitrat düzeylerinde neden olduğu artma U0126 ile önlenmiştir ( $P$  değerleri sırası ile 0.0370, 0.0467 ve 0.012). ET ile birlikte U0126 uygulanan sıçanların serum ve dokularında ölçülen nitrit+nitrat düzeyleri kontrol ve U0126 uygulanan gruplardan farklı değilken ( $P > 0.05$ ), doku nitrit+nitrat düzeyleri kontrol grubundan daha çoktur ( $P = 0.0154$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu iNOS protein ekspresyonu ve etkinliğindeki artmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki artışın katkıda bulunduğunu göstermektedir.

#### **4.3.5 ET'nin çGS Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi**

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında çGS protein ekspresyonu ve siklik GMP düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.13 ve Şekil 4.17'de verilmiştir.

ET, çGS protein ekspresyon düzeylerinde bir değişikliğe neden olmazken ( $P > 0.05$ ), çGS etkinliğinin bir göstergesi olarak ELISA yöntemi ile ölçülen siklik GMP düzeylerinde artmaya neden olmuştur ( $P = 0.0382$ ).

Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin torasik aorta endotel ve/veya düz kas hücrelerinde çGS protein ekspresyonunda bir değişiklik oluşturmaksızın, etkinliğinde artmaya neden olduğunu göstermektedir.

#### **4.3.5.1 Endotoksemik Sıçanlarda çGS Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında çGS protein ekspresyonu ve siklik GMP düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.13 ve Şekil 4.17'de verilmiştir.

1,3-PBIT'nin gerek tek başına ve gerekse ET ile birlikte uygulanması durumunda çGS protein ekspresyon düzeylerinde oluşan değişiklikler kontrol ve/veya ET gruplarından farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

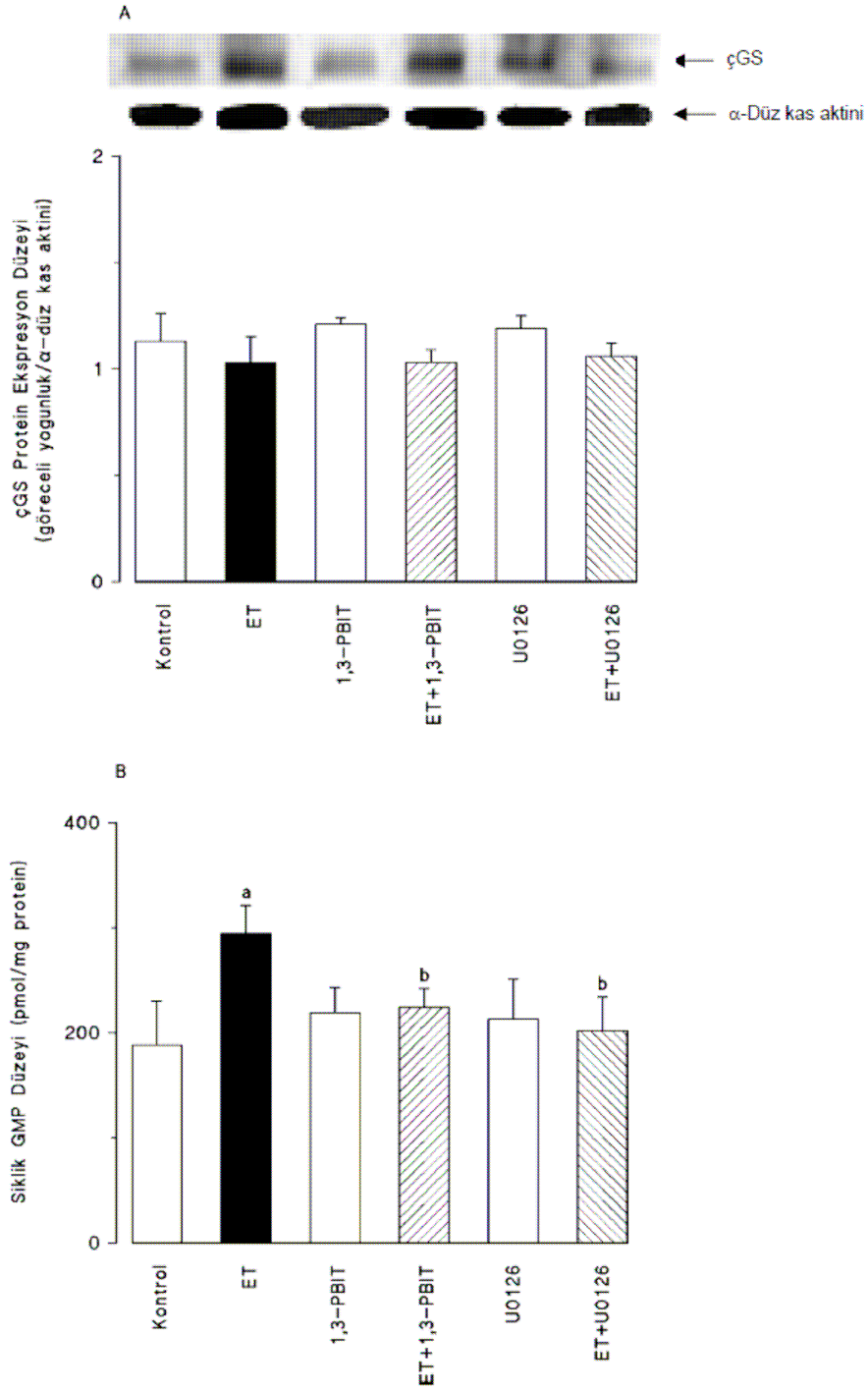
**Çizelge 4.13.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında çGS protein ekspresyonu ve siklik GMP düzeyi üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi.

<b>çGS protein ekspresyon düzeyi (göreceli yoğunluk/<math>\alpha</math>-düz kas aktini)</b>	
<b>Kontrol</b>	1.13±0.13 (n= 4)
<b>ET</b>	1.03±0.12 (n= 4)
<b>1,3-PBIT</b>	1.21±0.03 (n= 4)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	1.03±0.06 (n= 4)
<b>U0126</b>	1.19±0.06 (n= 4)
<b>ET+U0126</b>	1.06±0.06 (n= 4)
<b>Siklik GMP düzeyi (pmol/mg protein)</b>	
<b>Kontrol</b>	188±42 (n= 8)
<b>ET</b>	295±26 (n= 10) <sup>a</sup>
<b>1,3-PBIT</b>	219±24 (n= 12)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	224±18 (n= 8) <sup>b</sup>
<b>U0126</b>	213±38 (n= 10)
<b>ET+U0126</b>	202±32 (n= 9) <sup>b</sup>

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyüüre) dihidrobromür; çGS, çözünebilir guanilil siklaz; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol veya <sup>b</sup> ET grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).

1,3-PBIT tek başına uygulandığında siklik GMP düzeylerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ). ET'nin siklik GMP düzeylerinde neden olduğu artma 1,3-PBIT ile önlenmiştir ( $P = 0.0463$ ). ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda ölçülen siklik GMP düzeyleri, gerek kontrol ve gerekse 1,3-PBIT tek başına uygulandığında elde edilen değerlerden farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu çGS etkinliğindeki artmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun katkıda bulunduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.17.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında (A) çGS protein ekspresyonu ve (B) siklik GMP düzeyleri üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi. 1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyoyüre) dihidrobromür; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiy)ütadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 4-12. <sup>a</sup> Kontrol veya <sup>b</sup> ET grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

#### **4.3.5.2 Endotoksemik Sıçanlarda çGS Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında çGS protein ekspresyonu ve siklik GMP düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.13 ve Şekil 4.17'de verilmiştir.

U0126'nın gerek tek başına ve gerekse ET ile birlikte uygulanması durumunda çGS protein ekspresyon düzeylerinde oluşan değişiklikler kontrol ve/veya ET gruplarından farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

U0126 tek başına uygulandığında siklik GMP düzeylerinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ). ET'nin siklik GMP düzeylerinde neden olduğu artma U0126 ile önlenmiştir ( $P = 0.0358$ ). ET ile birlikte U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda ölçülen siklik GMP düzeyleri, gerek kontrol ve gerekse U0126 tek başına uygulandığında elde edilen değerlerden farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu çGS etkinliğindeki artmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki, dolayısı ile etkinliğindeki artışın katkıda bulunduğunu göstermektedir.

#### **4.3.6 ET'nin PKG Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi**

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında PKG protein ekspresyonu ve fosforile VASP protein düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.14 ve Şekil 4.18'de verilmiştir.



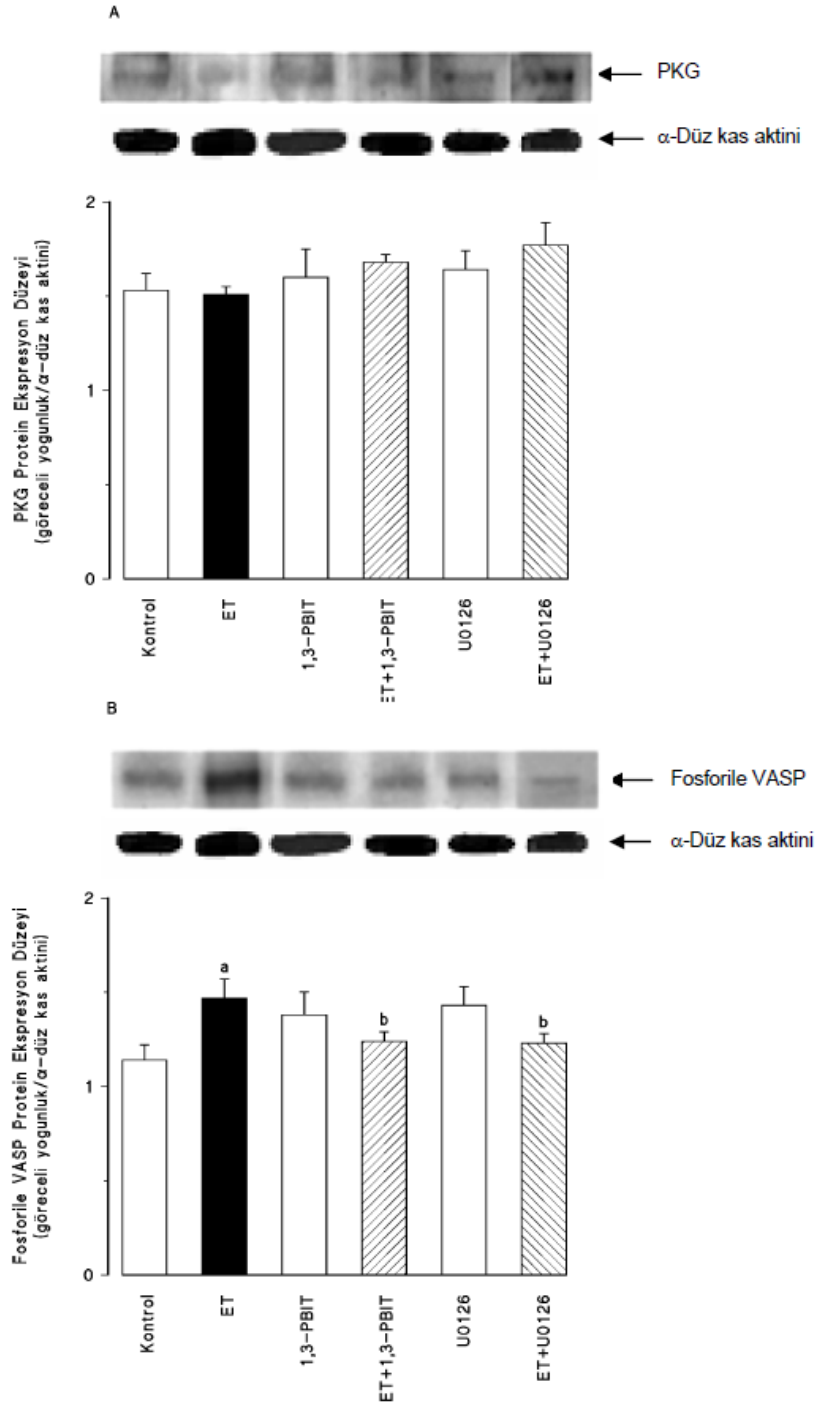
**Çizelge 4.14.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında PKG protein ekspresyonu ve etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi.

<b>PKG protein ekspresyon düzeyi (göreceli yoğunluk/<math>\alpha</math>-düz kas aktini)</b>	
<b>Kontrol</b>	1.53±0.09 (n= 3)
<b>ET</b>	1.51±0.04 (n= 3)
<b>1,3-PBIT</b>	1.60±0.15 (n= 3)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	1.68±0.04 (n= 3)
<b>U0126</b>	1.64±0.10 (n= 3)
<b>ET+U0126</b>	1.77±0.12 (n= 3)
<b>Fosforile VASP protein ekspresyon düzeyi (göreceli yoğunluk/<math>\alpha</math>-düz kas aktini)</b>	
<b>Kontrol</b>	1.14±0.08 (n= 5)
<b>ET</b>	1.47±0.10 (n= 6) <sup>a</sup>
<b>1,3-PBIT</b>	1.38±0.12 (n= 7)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	1.24±0.05 (n= 7) <sup>b</sup>
<b>U0126</b>	1.43±0.10 (n= 7)
<b>ET+U0126</b>	1.23±0.05 (n= 6) <sup>b</sup>

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöre) dihidrobromür; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyobütadien); VASP, vazodilatör ile uyarılan fosfoprotein. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. <sup>a</sup> Kontrol veya <sup>b</sup> ET grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi;  $P < 0.05$ ).

ET, PKG protein ekspresyon düzeyinde bir değişikliğe neden olmazken ( $P > 0.05$ ), siklik GMP'ye bağımlı PKG'in bir substratı olan ve PKG etkinliğinin bir göstergesi olarak ölçülen fosforile VASP protein düzeyinde artmaya neden olmuştur ( $P = 0.0292$ ).

Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin torasik aorta endotel ve/veya düz kas hücrelerinde PKG protein ekspresyon düzeyinde bir değişikliğe neden olmaksızın, etkinliğinde artmaya neden olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.18.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında PKG (A) protein ekspresyonu ve (B) etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi. 1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyö)bütadien; VASP, vazodilatör ile uyarılan fosfoprotein. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 7-11. <sup>a</sup> Kontrol veya <sup>b</sup> 1,3-PBIT grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

#### **4.3.6.1 Endotoksemik Sıçanlarda PKG Protein Ekspresyon Düzeyi ve Etkinliği Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında PKG protein ekspresyonu ve fosforile VASP protein düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.14 ve Şekil 4.18'de verilmiştir.

1,3-PBIT'nin gerek tek başına ve gerekse ET ile birlikte uygulanması durumunda PKG protein ekspresyon düzeyinde oluşan değişiklikler kontrol ve/veya ET gruplarından farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

1,3-PBIT tek başına uygulandığında fosforile VASP protein düzeyinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ). ET'nin fosforile VASP protein düzeyinde neden olduğu artma, seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile önlenmiştir ( $P = 0.0467$ ). ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda ölçülen fosforile VASP protein düzeyi, gerek kontrol ve gerekse 1,3-PBIT tek başına uygulandığında elde edilen değerlerden farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu PKG etkinliğindeki artmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun katkıda bulunduğunu göstermektedir.

#### **4.3.6.2 Endotoksemik sıçanlarda PKG protein ekspresyon düzeyi ve etkinliği üzerinde sistemik ERK1/2 inhibisyonunun etkisi**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında PKG protein ekspresyonu ve fosforile VASP protein düzeyleri ile ilgili bulgular Çizelge 4.14 ve Şekil 4.18'de verilmiştir.

U0126'nın gerek tek başına ve gerekse ET ile birlikte uygulanması durumunda PKG protein ekspresyon düzeyinde oluşan değişiklikler kontrol ve/veya ET gruplarından farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

ET'nin fosforile VASP protein düzeyinde neden olduğu artma, MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 ile önlenmiştir ( $P= 0.0473$ ). U0126 tek başına uygulandığında fosforile VASP protein düzeyinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ). ET ile birlikte U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda ölçülen fosforile VASP protein düzeyi, gerek kontrol ve gerekse U0126 tek başına uygulandığında elde edilen değerlerden farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu PKG etkinliğindeki artmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki, dolayısı ile etkinliğindeki artışın katkıda bulunduğunu göstermektedir.

#### **4.3.7 ET'nin Kaspaz-3 Etkinliği Üzerindeki Etkisi**

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya ET uygulanmasından dört saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında kaspaz-3 etkinliği ile ilgili bulgular Çizelge 4.15 ve Şekil 4.19'da verilmiştir.

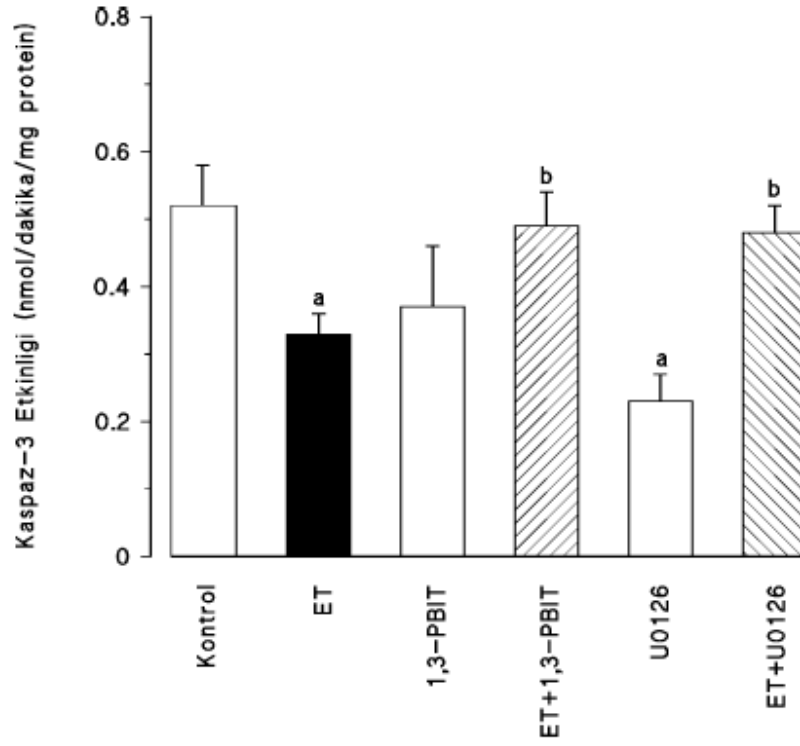
Kontrol grubunda ortama kaspaz-3 enzimi eklenmesi kaspaz-3 etkinliğinde artmaya neden olurken ( $P= 0.0308$ ), ortamda kaspaz-3 inhibitörü N-asetil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehit (Ac-DEVD-CHO) varken ölçülen kaspaz-3 etkinliği, yokken ölçülen değerden farklı değildir ( $P > 0.05$ ). ET, ortamda kaspaz-3 enzimi yokken ve varken ölçülen kaspaz-3 etkinliğinde azalmaya neden olmuştur ( $P$  değerleri sırası ile  $0.0314$  ve  $0.0031$ ). ET uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda ortamda Ac-DEVD-CHO varken ölçülen kaspaz-3 etkinliği kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

**Çizelge 4.15.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında kaspaz-3 etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi.

	<b>Kaspaz-3 etkinliği (nmol/dakika/mg protein)</b>
<b>Kontrol</b>	0.52±0.06 (n= 4)
<b>Kontrol+Ac-DEVD-CHO</b>	0.53±0.16 (n= 5)
<b>Kontrol+Kaspaz-3</b>	0.78±0.07 (n= 4) <sup>a</sup>
<b>ET</b>	0.33±0.03 (n= 4) <sup>a</sup>
<b>ET+Ac-DEVD-CHO</b>	0.38±0.04 (n= 4)
<b>ET+Kaspaz-3</b>	0.36±0.01 (n= 3) <sup>b</sup>
<b>1,3-PBIT</b>	0.37±0.09 (n= 4)
<b>1,3-PBIT+Ac-DEVD-CHO</b>	0.40±0.10 (n= 4)
<b>1,3-PBIT+Kaspaz-3</b>	0.54±0.17 (n= 3)
<b>ET+1,3-PBIT</b>	0.49±0.05 (n= 4) <sup>c</sup>
<b>ET+1,3-PBIT+Ac-DEVD-CHO</b>	0.38±0.08 (n= 5)
<b>ET+1,3-PBIT+Kaspaz-3</b>	0.48±0.04 (n= 3) <sup>d</sup>
<b>U0126</b>	0.23±0.04 (n= 5) <sup>a</sup>
<b>U0126+Ac-DEVD-CHO</b>	0.25±0.05 (n= 5)
<b>U0126+Kaspaz-3</b>	0.43±0.04 (n= 4) <sup>bc</sup>
<b>ET+U0126</b>	0.48±0.04 (n= 4) <sup>c</sup>
<b>ET+U0126+Ac-DEVD-CHO</b>	0.46±0.08 (n= 5)
<b>ET+U0126+Kaspaz-3</b>	0.66±0.03 (n= 3) <sup>dg</sup>

1,3-PBIT, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöre) dihidrobromür; Ac-DEVD-CHO, N-asetil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehit; ERK1/2, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; U0126, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiy)butadien. 1,3-PBIT (10 mg/kg, IP) veya U0126 (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya ET (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, *in vivo* deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 3-5. <sup>a</sup> Kontrol, <sup>b</sup> kontrol+kaspaz-3, <sup>c</sup> ET, <sup>d</sup> ET+kaspaz-3, <sup>e</sup> U0126, <sup>f</sup> U0126+Ac-DEVD-CHO ve <sup>g</sup> ET+U0126 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; *P* < 0.05).

Bu bulgular, sıçanlara uygulandıktan dört saat sonra ET'nin torasik aorta endotel ve/veya düz kas hücrelerinde kaspaz-3 etkinliğinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.19.** Kontrol ve endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında kaspaz-3 etkinliği üzerinde seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126'nın etkisi. *1,3-PBIT*, fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyöüre) dihidrobromür; *ERK1/2*, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz-1/2; *ET*, endotoksin; *iNOS*, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; *MEK1*, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz-1; *U0126*, 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis(2-aminofeniltiyo)bütadien. *1,3-PBIT* (10 mg/kg, IP) veya *U0126* (5 mg/kg, IP), serum fizyolojik (4 ml/kg, IP) (kontrol grubu) veya *ET* (10 mg/kg, IP) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan bir saat sonra uygulanmıştır. Sıçanlar, in vivo deneyler sonunda öldürülmüş ve torasik aortaları izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. n= 3-5. <sup>a</sup> Kontrol veya <sup>b</sup> ET grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

#### 4.3.7.1 Endotoksemik Sıçanlarda Kaspaz-3 Etkinliği Üzerinde Sistemik iNOS İnhibisyonunun Etkisi

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında kaspaz-3 etkinliği ile ilgili bulgular Çizelge 4.15 ve Şekil 4.19'da verilmiştir.

1,3-PBIT tek başına uygulandığında ortamda kaspaz-3 enzimi veya inhibitörü yokken ve varken kaspaz-3 etkinliğinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklı değildir ( $P > 0.05$ ). ET'nin ortamda kaspaz-3 enzimi yokken ve varken ölçülen kaspaz-3 etkinliğinde neden olduğu azalma 1,3-PBIT ile önlenmiştir ( $P$  değerleri sırası ile 0.0211 ve 0.0478). ET ile birlikte 1,3-PBIT uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda ortamda kaspaz-3 enzimi veya inhibitörü yokken ve varken ölçülen kaspaz-3 etkinliği, gerek kontrol ve gerekse 1,3-PBIT tek başına uygulandığında elde edilen değerlerden farklı değildir ( $P > 0.05$ ).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu kaspaz-3 etkinliğindeki azalmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun katkıda bulunduğunu göstermektedir.

#### **4.3.7.2 Endotoksemik Sıçanlarda Kaspaz-3 Etkinliği Üzerinde Sistemik ERK1/2 İnhibisyonunun Etkisi**

Kontrol ve endotoksemik sıçanlara MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanmasından üç saat sonra izole edilen endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında kaspaz-3 etkinliği ile ilgili bulgular Çizelge 4.14 ve Şekil 4.18'te verilmiştir.

U0126 tek başına uygulandığında ortamda kaspaz-3 enzimi yokken ve varken ölçülen kaspaz-3 etkinliğinde kontrol grubuna göre azalmaya neden olmuştur ( $P$  değerleri sırası ile 0.0054 ve 0.0046); ayrıca, ortama kaspaz-3 enzimi eklenmesi kaspaz-3 etkinliğini artırmıştır ( $P= 0.0109$ ). Öte yandan, U0126 tek başına uygulandığında ortamda kaspaz-3 inhibitörü yokken ve varken kaspaz-3 etkinliğinde oluşan değişiklikler kontrol grubundan farklı değilken ( $P > 0.05$ ), ortamda Ac-DEVD-CHO varken ortama kaspaz-3 enziminin de eklenmesi kaspaz-3 etkinliğinde artmaya neden olmuştur ( $P= 0.0319$ ).

ET'nin ortamda kaspaz-3 enzimi yokken ve varken ölçülen kaspaz-3 etkinliğinde neden olduğu azalma U0126 ile önlenmiştir (*P* değerleri sırası ile 0.0161 ve 0.0006); ayrıca ortama kaspaz-3 enziminin eklenmesi kaspaz-3 etkinliğinde artmaya neden olmuştur (*P*= 0.0142). ET ile birlikte U0126 uygulanan sıçanlardan izole edilen dokularda ortamda kaspaz-3 enzimi veya inhibitörü yokken ve varken ölçülen kaspaz-3 etkinliği, gerek kontrol ve gerekse U0126 tek başına uygulandığında elde edilen değerlerden farklı değildir (*P* > 0.05).

Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu kaspaz-3 etkinliğindeki azalmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki, dolayısı ile etkinliğindeki artışın katkıda bulunduğunu göstermektedir.



## 5. TARTIŞMA

Sistemik yoldan seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ve MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen torasik aortada yapılan bu çalışmanın bulguları, aortik endotel ve/veya düz kas hücrelerinde etkinliği artan MEK1'in ERK1/2'yi etkinleştirmesinin ardından iNOS protein ekspresyonu ve etkinliği ile çGS ve PKG enzimlerinin etkinliğindeki artmanın  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya katkıda bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca, bulgularımıza göre, MEK1/ERK1/2/iNOS/çGS/PKG yolundaki enzimlerin etkinliğindeki artma, torasik aorta endotel ve/veya düz kas hücrelerinde apoptotik olaylarda rol oynayan enzimlerden biri olan kaspaz-3 etkinliğini azaltmaktadır. Bulgularımız, ET'nin torasik aortada endotele bağımlı gevşeme yanıtlarını azaltıcı etkisine MEK1/ERK1/2 yolundaki enzimlerin etkinliğindeki artışın katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, ET'nin endotelden bağımsız olarak gelişen düz kas gevşeme yanıtlarını azaltıcı etkisine MEK1/ERK1/2/iNOS yolundaki enzimlerin etkinliğindeki artış katkıda bulunmaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalarda, sıçanlara ET uygulanmasından on beş dakika sonra OAB'nin azaldığı, bir saat sonra normal değerlere döndüğü, iki saat sonra ise yeniden azalmaya başlayarak bu olayın dördüncü saate kadar sürdüğü bildirilmiştir (317-319). ET'nin neden olduğu bu değişikliklere ise birinci saatte başlayan ve dördüncü saate kadar süren KH, plazma nitrat düzeyleri, aortik iNOS protein ve mRNA ekspresyonu ve aortik iNOS etkinliğinde artma ile noradrenalin veya fenilefrine karşı vasküler hiporeaktivite eşlik etmektedir (317-319). Öte yandan, sıçanlara ET uygulanmasından iki-üç saat sonra gözlenen OAB'deki azalmanın sürmediği, on iki-yirmi dört saat sonra bazal değerlere döndüğü bildirilmiştir (320-323). Ayrıca, sıçanlara ET uygulanmasından iki saat sonra gözlenen OAB'deki azalmaya aortada iNOS ve eNOS protein ekspresyonu ile NO<sub>x</sub> düzeylerindeki artışın eşlik ettiğini, öte yandan yirmi dört saat sonra plazma ve aortada NO<sub>x</sub> düzeylerindeki artışın aortik iNOS protein

ekspresyonunda artma ve eNOS protein ekspresyonunda azalma ile birlikte olduğunu göstermişlerdir (320). Sıçan izole torasik aortasında *in vitro* olarak yaptığımız ve  $\alpha$ -adrenajik reseptör aracılıklı kasılma yanıtları üzerinde ET'nin oluşturduğu etkilere iNOS ve ERK1/2 enzimlerinin katkısının araştırıldığı bir çalışmamızın bulguları (43), torasik aorta preparatlarının ET ile dört saat inkübasyonu sonucunda noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının azalmasından, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde ET'nin etkisi ile MEK1 ve ardından ERK1/2'nin etkinleşmesi sonucunda ekspresyon ve etkinliği artan iNOS ve ondan oluşan NO'nun sorumlu olabileceğini göstermiştir. Endotoksemik sıçanlarda *in vivo* olarak yaptığımız çalışmaların sonuçlarına göre ise (35-39), ET enjeksiyonundan sonra dört saat içinde OAB düşmekte ve KH artmaktadır. ET uygulanmasından dört saat sonra ise serum ve torasik aortada nitrit düzeyleri artmış, endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış torasik aorta preparatlarında noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları azalmıştır; ET'nin neden olduğu OAB, KH, serum ve doku nitrit düzeylerindeki değişiklikler seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile önlenmiştir. Bir başka çalışmamızda ise (44), sıçanlarda ET'nin neden olduğu OAB'deki azalma ve serum nitrit düzeylerindeki artmaya, torasik aortada ERK1/2 fosforilasyonu ile nitrit düzeylerinde artmanın eşlik ettiği gösterilmiştir; ET'nin neden olduğu bütün bu değişiklikler ise MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü U0126 ile önlenmiştir. Bu çalışmamızda ise, sıçanlara ET uygulanmasından bir saat sonra OAB'nin azaldığı ve KH'nin arttığı, ayrıca, bu değişikliklerin dördüncü saate kadar sürdüğü gözlenmiştir. ET uygulanmasından dört saat sonra ise sıçanların serum ve endotel tabakası sağlam torasik aortalarında NO<sub>x</sub> düzeyleri ile aortik iNOS protein ekspresyonunda artmanın birlikte olduğu bu hemodinamik değişikliklere, endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarında azalma eşlik etmiştir. ET'nin neden olduğu bütün bu değişiklikler 1,3-PBIT ile önlenmiştir; U0126 ise ET'nin neden olduğu değişikliklerden KH dışındakileri önlemiştir. Ayrıca, endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam aorta preparatlarının *in vitro* olarak seçici çGS inhibitörü ODQ (312) ile inkübasyonu, ET'nin neden olduğu kasılma yanıtlarındaki azalmayı önlemiştir; ODQ'nun bu etkisi 1,3-PBIT veya U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokularda değişmemiştir. Endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda ise, ODQ ET'nin neden olduğu E<sub>maks</sub> değerlerindeki azalmayı değiştirmezken, EC<sub>50</sub> değerlerindeki artmayı önlemiştir;

ODQ'nun bu etkisi de 1,3-PBIT veya U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokulardakine benzemektedir. Endotoksemik sıçanlardan izole edilen endotel tabakası sağlam aorta preparatlarının *in vitro* olarak seçici PKG inhibitörü KT5823 (313) ile inkübasyonu ise, ET'nin neden olduğu  $E_{maks}$  değerlerindeki azalmayı önlerken,  $EC_{50}$  değerlerinde ET'nin neden olduğu artmayı daha da artırmıştır. Öte yandan, U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokularda KT5823  $E_{maks}$  değerlerindeki azalmayı önlerken,  $EC_{50}$  değerlerindeki artmada bir değişikliğe neden olmamıştır. 1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokularda ise, KT5823 kasılma yanıtlarında bir değişikliğe neden olmazken, endotel tabakası uzaklaştırılmış dokularda, KT5823 ET'nin neden olduğu  $E_{maks}$  değerlerindeki azalma ve  $EC_{50}$  değerlerindeki artmayı önlememiştir. Öte yandan, U0126 uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokularda KT5823  $EC_{50}$  değerlerindeki artmayı önlerken,  $E_{maks}$  değerlerindeki azalmada bir değişikliğe neden olmamıştır. 1,3-PBIT uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen dokularda ise, KT5823 ET'nin neden olduğu  $E_{maks}$  değerlerindeki azalmayı daha da azaltırken,  $EC_{50}$  değerlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu bulgular, sıçanlarda ET'nin neden olduğu torasik aortada noradrenalin ile oluşan  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki azalmaya, endotel hücreleri olduğu kadar düz kas hücrelerinde de MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonundaki, dolayısı ile etkinliğindeki artış ile birlikte iNOS etkinliğindeki artışın ve/veya NO dışındaki mediyatörlerin,  $\text{cGS/PKG}$  yolunu etkinleştirilmesi sonucunda neden olduğu siklik GMP düzeylerindeki artmanın katkıda bulunabileceği düşüncesini desteklemektedir. Bu çalışmada, ayrıca, endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında MEK1 etkinliğinin bir göstergesi olarak ölçülen fosforile MEK1, ERK1/2 etkinliğinin bir göstergesi olarak ölçülen fosforile ERK1/2,  $\text{cGS}$  etkinliğinin bir göstergesi olarak ölçülen siklik GMP ve PKG etkinliğinin bir göstergesi olarak ölçülen fosforile VASP düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. ET'nin neden olduğu bütün bu değişikliklerden fosforile MEK1 protein düzeylerindeki artış dışındakiler U0126 ile önlenmiştir; 1,3-PBIT ise ET'nin neden olduğu bu değişikliklerden fosforile MEK1 ve fosforile ERK1/2 protein düzeylerindeki artış dışındakileri önlemiştir. Bütün bu bulgular, endotoksemik sıçanlarda gözlenen hipotansiyona, KH'deki artmaya ve noradrenaline karşı verilen kasılma yanıtlarındaki

azalmaya MEK1/ERK1/2/iNOS/çGS/PKG yolundaki enzimlerin etkinliğindeki artışın katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Endotoksemik sıçanlardan izole edilen damarlarda endotele bağımlı ve endotelden bağımsız gevşemeler üzerinde ET'nin etkisi ile ilgili bulguların çelişkili olmasına karşın (324, 325), daha önce yaptığımız çalışmalarda (37, 41), ET uygulanmasından dört saat sonra endotel tabakası sağlam torasik aorta preparatlarında asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtları ile eNOS protein ekspresyonu azalırken iNOS protein ekspresyonu artmış, ancak hsp90 protein ekspresyonu değişmemiştir; ayrıca, endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları azalmıştır. Ayrıca, ET uygulanmasından dört saat sonra serum ve böbrekte 20-HETE düzeyleri azalmıştır. ET'nin neden olduğu bu değişikliklerden yalnızca gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları ve 20-HETE düzeylerindeki azalma ile iNOS protein ekspresyonundaki artma bir 20-HETE analogu olan 5,14-HEDGE ile önlenmiştir. ET'nin neden olduğu OAB'de azalma ve KH'de artmanın eşlik ettiği vasküler hiporeaktiviteyi ve nitrit düzeylerindeki azalmayı da önleyen 5,14-HEDGE'nin iNOS protein ekspresyonu dışındaki bütün bu etkileri, 20-HETE'nin vazokonstriktör etkilerinin yarışmalı bir antagonisti olan 20-HEDE ile geri çevrilmiştir. 20-HETE düzeylerindeki artmanın çeşitli damar yataklarında NO oluşumunda azalmaya ve süperoksit oluşumunda artmaya ve bu olayların da endotelial işlevsizlik ve damar geriminde artmaya neden olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (326-330). Bu bulgulara göre, ET'nin neden olduğu endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarındaki azalmaya endotelial ve/veya damar düz kas hücrelerinde oluşumu artan süperoksidin neden olabileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışmamızda da, sıçanlara ET uygulanmasından dört saat sonra endotel tabakası sağlam dokularda asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtları olduğu kadar, endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış dokularda gliseril trinitrat ile elde edilen gevşeme yanıtları azalmıştır. ET'nin neden olduğu asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtları 1,3-PBIT ile önlenmezken; U0126 ET'nin neden olduğu asetilkolin ve gliseril nitrat ile elde edilen gevşeme yanıtlarındaki azalmayı önlemiştir. Bulgularımıza göre, endotel hücrelerinde muskarinik M<sub>3</sub>-reseptörlerin uyarılması sonucunda eNOS aracılığı ile NO oluşumunu artırarak gevşeme yaptığı bilinen asetilkolin (309) ile elde edilen gevşeme yanıtlarının

endotoksemik sıçanlarda azalması ve bu durumun yalnızca U0126 ile önlenmesi, ET'nin NO aracılıklı gevşeme yanıtlarını azaltıcı etkisine iNOS değil de MEK1/ERK1/2 yolundaki enzimlerin etkinliğinin artması sonucunda, büyük olasılıkla, endotel hücrelerinde eNOS etkinliğindeki azalmanın katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımız, ayrıca, damar düz kas hücrelerinde NO veya S-nitrozotiyol oluşumu ile guanilil siklazın etkinleşmesi sonucunda artan siklik GMP aracılığı ile endotelden bağımsız olarak gevşemeye neden olduğu bilinen gliseril trinitrat (310-311) ile elde edilen gevşeme yanıtlarının endotoksemik sıçanlarda azalması ve bu durumun 1,3-PBIT ve U0126 ile önlenmesi, ET'nin endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarını azaltıcı etkisine endotel hücreleri olduğu kadar, düz kas hücrelerinde de MEK1/ERK1/2/iNOS yolundaki enzimlerin etkinliğindeki artışın katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

ET'nin NF- $\kappa$ B aracılığı ile ekspresyonu ve etkinliğinde artmaya neden olduğu iNOS ile oluşan NO'nun apoptozun düzenlenmesine proapoptotik ve antiapoptotik olarak iki yönlü katkısı bulunduğu bildirilmiştir (45, 46, 48, 290, 331). NO'nun proapoptotik ya da antiapoptotik etkili olduğu derişimi ve hücre türü ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir. Örneğin, yüksek derişimdeki ( $> 10 \mu\text{M}$ ) NO endotel hücre apoptozunu artırırken, daha az düzeydeki ( $< 10 \mu\text{M}$ ) NO ise azaltmaktadır (290). Öte yandan, iNOS indüksiyonunu baskılayan ve etkinliğini önleyen maddelerin ET ile oluşan endotelial apoptozu önlediği gösterilmiştir (49, 50). NO aracılığı ile gelişen apoptozda hücreye özgü duyarlılığı etkileyen etkenlerin, hücre içindeki redoks durumu ve kaspazlar gibi apoptotik sinyal kaskadının etkinleşmesi, mitokondriyal sitokrom c saliverilmesi veya hücre canlılığı ve apoptotik gen regülasyonu ile birlikte olabileceği düşünülmektedir. NO ile oluşan apoptozu karşı hücrel duyarlılığı açıklayabilen yeterli bir mekanizma henüz bulunmamasına karşın, NO'nun proapoptotik etkilerinin bazılarının  $\text{cGS}$ 'nin etkinleşmesi sonucunda siklik guanozin monofosfat siklik GMP oluşumundaki artmaya bağlı olarak ortaya çıktığı ve bu olayda PKG'nin de önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (51). Siklik GMP aracılıklı apoptozun mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da, siklik GMP'nin PKG etkinliğini artırarak kaspaz-3'ün etkinleşmesine neden olan MEKK1/SEK1/JNK1 yolunu etkinleştirdiği ve böylece apoptozu neden olduğu ileri sürülmüştür (47, 304). Ayrıca, NO'nun doğrudan DNA

zedelenmesine neden olarak veya süperoksit anyonları ile etkileşmesi sonucunda oluşan peroksinitritin apoptoza neden olabileceği ileri sürülmüştür (292, 293, 296, 298, 299). DNA zedelenmesinin ise, p53 tümör baskılayıcı geninin indüklenmesine ve mitokondriden sitokrom c salıverilmesine ve ardından kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'u etkinleştirerek apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (47, 56). ET ile inkübe edilen damar düz kas hücrelerinde mitokondriyal solunumun azalmasında peroksinitritin PARS enziminin etkinleşmesi sonucunda hücrede NAD<sup>+</sup> ve ATP tükenmesine neden olarak apoptoz olayını tetiklediği bildirilmiştir (300). Öte yandan, NO TNF- $\alpha$  (52), oksidatif stres (53), serum deprivasyonu (54) ve anoksi (55) gibi çeşitli uyaranlar ile oluşan apoptozdan bazı hücreleri korumaktadır. Bu bulgular, NO'nun bazı hücre türleri ve deneysel koşullarda *in vitro* ve *in vivo* olarak apoptozu önlediğini göstermektedir. Ayrıca, hücre türüne ve apoptotik uyarıya göre değişen bir biçimde demir-sülfür kompleksleri, çGS, kaspazlar ve glutasyon gibi bazı moleküler hedeflerin NO'nun antiapoptotik etki mekanizmasında rol oynadığı düşünülmektedir. THP-1 hücrelerinde yapılan bir çalışmada ET uygulanmasından sonra bir saat içinde MAPK'ye bağımlı apoptotik yolun etkinleşmesine neden olan ASK1'in etkinliğini TLR4 aracılığı ile artırdığı, ancak daha sonra oluşumu artan NO'nun, dördüncü saate kadar kaspaz-3 etkinliğinde bir değişiklik olmaksızın, ASK1'in S-nitrozilasyonuna neden olarak bu enzimin etkinliğini azalttığı ve böylece hücreleri apoptozdan koruduğu bildirilmiştir (333). Ayrıca, koyun pulmoner arter hücrelerinde NO'nun kaspaz-3 etkinliğini artırarak hücreleri ET'nin neden olduğu apoptozdan koruduğu da gösterilmiştir (334). NO'nun doğrudan etkilerinin dışında çeşitli hücrelerde siklik GMP aracılıklı apoptotik etkileri olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (301, 302, 304, 305, 335). NO'nun siklik GMP oluşumunu artırarak hepatositler (57), nöronal PC12 hücreleri (58), embriyonik motor sinirler (59), B lenfositleri (60) ve over folikülleri (61) gibi bazı hücre türlerinde de apoptozu önlediği bildirilmiştir. Öte yandan, NO'nun antiapoptotik etkisinin başka hücrelerde çGS inhibitörü ODQ ile önlenemediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Siklik GMP analogu 8-bromo-sGMP de NO'nun etkisinden hücreleri koruyamamaktadır (62). Bu bulgular, NO'nun antiapoptotik etki mekanizmalarının hücreye özgü bir biçimde siklik GMP'ye bağımlı ve siklik GMP'den bağımsız olmak üzere iki değişik biçimde olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmamızda ise, sıçanlara ET uygulanmasından dört saat sonra endotel tabakası sağlam dokularda ölçülen kaspaz-

3 etkinliğinin azaldığı ve bu azalmanın 1,3-PBIT ve U0126 ile önlendiği gözlenmiştir. Torasik aorta preparatlarında fosforile MEK1, fosforile ERK1/2, NO<sub>x</sub>, siklik GMP ve fosforile VASP düzeylerindeki artış ile birlikte değerlendirildiğinde bu bulgular, NO'nun siklik GMP ve PKG aracılıklı bir biçimde kaspaz-3 etkinliğinde artmaya bağlı olarak apoptotik etki oluşturduğu yönündeki *in vitro* çalışmaların sonuçlarına ters olmasına karşın, endotoksemi sırasında kaspaz-3 etkinliğindeki azalmaya endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1/ERK1/2/iNOS/çGS/PKG yolundaki enzimlerin etkinliğindeki artışın katkıda bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca, NO tarafından hücreleri apoptozdan korumak amacı ile ASK1 etkinliğinin azaltılması sonucunda kaspaz-3 etkinliğinin de azalmış olabileceği ileri sürülebilir. Öte yandan, daha önce yaptığımız ön çalışmaların bulgularına göre (42), ET uygulanmasından dört saat sonra sıçanların serumlarında ölçülen toplam antioksidan etkinlik ile SOD, glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidaz enzimlerinin etkinliğinin azalmasına karşın, nitrotirozin düzeyleri artmıştır. ET'nin neden olduğu bütün bu değişiklikler ise 1,3-PBIT ve U0126 ile önlenebilmiştir. Bu bulgular, endotoksemik sıçanlarda MEK1/ERK1/2/iNOS yolundaki enzimlerin etkinliği ile birlikte peroksinitrit oluşumundaki artmanın, torasik aorta endotel ve/veya düz kas hücrelerinde kaspaz-3 etkinliğini azaltabileceğini, ayrıca antioksidan enzimlerin etkinliğindeki azalma ve nitrotirozin düzeylerindeki artma sonucunda gelişen oksidatif ve nitrozatif strese MEK1/ERK1/2/iNOS yolunun katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Seçici iNOS veya ERK1/2 inhibitörü uygulanan endotoksemik sıçanlardan izole edilen torasik aortada oluşabilecek  $\alpha$ -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarındaki değişikliklere çGS ve PKG'nin katkısının olup olmadığının ve torasik aorta endotel ve/veya düz kas hücrelerinde gelişebilecek kaspaz-3 ile ilişkili apoptotik/antiapoptotik olaylarda NO/siklik GMP yolunun katkısının olup olmadığının araştırıldığı bu çalışmada, endotoksemik sıçanların torasik aortasında gelişen hiporeaktiviteye endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1/ERK1/2/iNOS/çGS/PKG yolundaki enzimlerden iNOS dışındaki enzim proteinlerinin ekspresyon düzeyinde bir değişiklik olmaksızın, etkinliklerindeki artış katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu bulguların, MEK1/ERK1/2 yolu aracılığı ile aşırı miktarlarda NO oluşumunun aracılık ettiği, hipotansiyon ve vasküler hiporeaktivite ile belirgin septik şok gibi çeşitli yangı ile belirgin hastalıkların tedavisinde ERK1/2 inhibitörlerinin kullanılabilmesi konusunda yapılacak klinik öncesi ve klinik çalışmalara oldukça büyük bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Böylece, ET'nin konakçıda tetiklediği sinyal ileti mekanizmalarından biri olan iNOS protein ekspresyon ve etkinliğinin düzenlenmesine dayanan ve nedene yönelik olarak önerilen özgül ve daha az maliyeti olan terapötik yaklaşımlara katkıda bulunabilecektir. Ayrıca, MEK1/ERK1/2/iNOS/çGS/PKG yolundaki enzimlerin etkinliğindeki artmanın kaspaz-3 etkinliğinde azalmaya neden olabileceğine ilişkin bulgularımız, NO'nun proapoptotik veya antiapoptotik olup olmadığı konusundaki tartışmalara önemli bir katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Daha sonra yapılacak olan çalışmalarda, ET'nin endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarını azaltıcı etkisine endotel hücreleri olduğu kadar, düz kas hücrelerinde de MEK1/ERK1/2/iNOS yolundaki enzimlerin etkinliğindeki artışın katkıda bulunabileceğinin gösterilmesi gerekmektedir. Ayrıca, U0126 uygulanmayan ve uygulanan endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam aortik dokularında süperoksit oluşumu ve eNOS protein ekspresyonunun ölçülmesi ile ET'nin neden



olduğu endotele bağımlı ve endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarındaki azalmaya MEK1/ERK1/2 yolundaki enzimlerinin katkısı araştırılmalıdır. 1,3-PBIT ve U0126 uygulanmayan ve uygulanan endotoksemik sıçanların endotel tabakası sağlam ve uzaklaştırılmış aortik dokularında, apoptotik olaylarda rol oynayan enzimlerden kaspaz-3 olduğu kadar, öteki enzimlerin de etkinliği ölçülmelidir; böylece, MEK1/ERK1/2/iNOS yolundaki enzimlerin etkinliklerindeki artmanın apoptotik olaylardaki rolüne ilişkin mekanizmalara bir açıklık getirilebilir. Ayrıca, çGS/PKG yolundaki enzimlerin özgül inhibitörleri kullanılarak kaspaz-3 etkinliğindeki azalmaya siklik GMP ve/veya VASP'nin aracılık edip etmediği de araştırılmalıdır. Öte yandan, 1,3-PBIT ve U0126 uygulanmayan ve uygulanan endotoksemik sıçanların aortik dokularında ASK1 etkinliğinin ölçülmesi ile ET'nin neden olduğu kaspaz-3 etkinliğindeki azalmaya ASK1'in katkısının belirlenebilmesine yardımcı olabilecektir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J.** Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit*, **2005**; 11(3): 76-85.
2. **Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D.** Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*, **2001**; 53: 135-159.
3. **Roerig S, Wolf, R, Grisham MB.** Nitric oxide, chronic joint inflammation, and pain. In: Ignarro LJ. Eds. *Nitric oxide: biology and pathobiology*, California: Academic Press, **2000**: 873-894.
4. **Szabo, C.** Pathophysiological roles of nitric oxide in inflammation. In: Ignarro LJ. Eds. *Nitric oxide: biology and pathobiology*, California: Academic Press, **2000**: 841-872.
5. **Zamora, R, Vodovotz Y, Billiar TR.** Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med*, **2000**; 6: 347-373.
6. **Feihl F, Waeber B, Liaudet L.** Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacol Ther*, **2001**; 91: 179-213.
7. **Fretland DJ, Connor JR, Pitzele BS, Currie MG, Manning PT.** Inhibition of nitric oxide synthase and prospects for therapy in inflammatory diseases. *Curr Pharm Des*, **1997**; 3: 447-462.
8. **Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S.** Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1999**; 39: 191-220.
9. **Ruetten H, Thiemermann C.** Nitric oxide and septic shock. In: Ignarro LJ. Eds. *Nitric oxide: biology and pathobiology*, California: Academic Press, **2000**: 747-757.
10. **Wolfe TA, Dasta JF.** Use of nitric oxide synthase inhibitors as a novel treatment for septic shock. *Ann Pharmacother*, **1995**; 29: 36-46.
11. **Vallance P, Rees D, Moncada S.** Nitric Oxide. In: Born GVR, Cuatrecasas P, Ganten D, Herken H, Starke K, Taylor P. Eds. *Handbook of experimental pharmacology*, Berlin Heidelberg: SpringerVerlag, **2000**: 385-397.
12. **Preiser JC.** Role of nitric oxide in cardiovascular alterations. *Sepsis*, **2000**; 4: 99-109.

13. **Cadenas S, Cadenas AM.** Fighting the stranger-antioxidant protection against endotoxin toxicity. *Toxicology*, **2002**; 18: 45-63.
14. **English JM, Cobb MH.** Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci*, **2002**; 23(1): 40-45.
15. **Flora SJ.** Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol*, **2007**; 53: 1-2.
16. **Hughes MN.** Chemistry of nitric oxide and related species. *Methods Enzymol*, **2008**; 36: 3-19.
17. **Sakaguchi S, Furusawa S.** Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2006**; 47: 167-177.
18. **Salvemini D, Cuzzocrea S.** Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med*, **2002**; 33: 1173-1185.
19. **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.
20. **Ungvari Z, Gupte SA, Recchia FA, Batkai S, Pacher P.** Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr Vasc Pharmacol*, **2005**; 3: 221-229.
21. **Victor VM, Rocha M, De la Fuente M.** Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol*, **2004**; 4(3): 327-347.
22. **Victor VM, Rocha M, Esplugues JV, De la Fuente M.** Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. *Curr Pharm Des*, **2005**; 11(24): 3141-3158.
23. **Haeffner-Cavaillon N, Carreno MP, Aussel L, Caroff M.** Molecular aspects of endotoxins relevant to their biological functions. *Nephrol Dial Transplant*, **1999**; 14(4): 853-860.
24. **Ejima K, Perrella MA.** Alteration in heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase-2 gene expression during endotoxemia in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Antioxid Redox Signal*, **2004**; 6: 850-857.
25. **Kaminska B.** MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta*, **2005**; 1754(1-2): 253-262.
26. **Kolch W.** Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, **2000**; 35(2): 289-305.

27. **Lowes VL, Ip NY, Wong YH.** Integration of signals from receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors. *Neurosignals*, **2002**; 11: 5-19.
28. **Turini ME, DuBois RN.** Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med*, **2002**; 53: 35-57.
29. **Fernandes D, Assreuy J.** Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock*, **2008**; 30(1): 10-3.
30. **Cuzzocrea S, Salvemini D.** Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. *Kidney Int*, **2007**; 71: 290-297.
31. **Goodwin DC, Landino LM, Marnett LJ.** Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J*, **1999**; 13: 1121-1136.
32. **Laroux FS, Pavlick KP, Hines IN, Kawachi S, Harada H, Bharwani S, Hoffman JM, Grisham MB.** Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol Scand*, **2001**; 173(1): 113-118.
33. **Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D.** Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev*, **2005**; 57(2): 217-252.
34. **Roman RJ.** P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*, **2002**; 82: 131-185.
35. **Tunctan B, Korkmaz B, Yildirim H, Tamer L, Atik U, Buharalioglu C.** Reversal of endotoxin-induced hypotension by inhibition of inducible nitric oxide synthase activity is associated with improved oxidative status in rat heart, aorta and mesenteric artery. *Turkish J Med Sci*, **2006**; 36: 71-80.
36. **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.
37. **Tunctan B, Korkmaz B, Buharalioglu CK, Sahan Firat S, Anjaiah S, Falck J, Roman RJ, Malik KU.** A 20-HETE agonist, N-[20-hydroxyeicosa-5(Z),14(Z)-dienoyl]glycine, opposes the fall in blood pressure and vascular reactivity in endotoxin-treated rats. *Shock*, **2008**; 30: 329-335.
38. **Tunctan B, Korkmaz B, Cuez T, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Falck J, Malik KU.** Interactions between cytochrome P4504A, cyclooxygenase and nitric oxide synthase during endotoxemia: therapeutic implications for inflammatory diseases. EHRlich II - 2<sup>nd</sup> World Conference on Magic Bullets, Celebrating the 100<sup>th</sup> Anniversary of the Nobel Prize Award to Paul Ehrlich, Nurnberg, Germany, **2008**: October 3-5: p. A-330.

39. **Tunctan B, Korkmaz B, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Anjaiah S, Falck JR, Yildirim H, Tamer L, Roman RJ, Malik KU.** 20-HETE agonist, N-[20-hydroxyeicosa-5(Z),14(Z)-dienoyl]glycine, opposes the endotoxin-induced fall in blood pressure and the decrease in vascular reactivity and lipid peroxidation and increased catalase activity via inhibition of NO production in rats. *FASEB J*, **2008**; 22: 1128.1.
40. **Tunctan B, Korkmaz B, Cuez T, Sahan-Firat S, Yildirim H, Tamer L, Buharalioglu CK, Falck JR, Malik, KU.** Increased production of 20-HETE contributes to the effects of COX inhibitors to prevent the decrease in lipid peroxidation and increase in catalase activity during endotoxemia. *FASEB J*, **2009**; 23: 937.13.
41. **Cuez T, Korkmaz B, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Falck J, Malik KU, Tunctan B.** A synthetic analog of 20-HETE, 5,14-HEDGE, reverses endotoxin-induced hypotension via increased 20-HETE levels associated with decreased iNOS protein expression and vasodilator prostanoid production in rats. *Basic Clin Pharmacol*, **2009**; (Doi: 10.1111/J.1742-7843.2009.00501.x).
42. **Korkmaz B, Cüz T, Buharaloğlu CK, Demiryürek AT, Şahan Fırat S, Sarı AN, Tunçtan B.** Endotoksemik sıçanlarda gelişen kaspaz-3 aracılıklı apoptoza ve oksidatif strese MEK1/ERK1/2/iNOS yolunun katkısı. XX. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Kızılağaç, Manavgat, Antalya, 4-7 Kasım **2009**: Bildiri No: S-01, s. 141.
43. **Korkmaz B, Ozveren E, Buharalioglu CK, Tunçtan B.** Extracellular signal-regulated kinase (ERK12) contributes to endotoxin-induced hyporeactivity via nitric oxide and prostacyclin production in rat aorta. *Pharmacology*, **2006**; 78: 123-128.
44. **Tunctan B, Korkmaz B, Dogruer ZN, Tamer L, Atik U, Buharalioglu CK.** Inhibition of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) activity reverses endotoxin-induced hypotension via decreased nitric oxide production in rats. *Pharmacol Res*, **2007**; 56: 56-64.
45. **Bannerman DD, Goldblum SE.** Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol*, **2003**; 284(6): L899-L914.
46. **Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT.** Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol*, **2002**; 35(1): 116-126.
47. **Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM.** Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **2001**; 282(5): 1075-1079.
48. **Kolb JP.** Mechanisms involved in the pro- and anti-apoptotic role of NO in human leukemia. *Leukemia*, **2000**; 14(9): 1685-1694.
49. **Higaki A, Ninomiya H, Saji M, Maki H, Koike T, Ohno K.** Protective effect of neurotrophin against lipopolysaccharide-induced hypotension and lethality linked to suppression of inducible nitric oxide synthase induction. *Jpn J Pharmacol*, **2001**; 86(3): 329-335.

50. **Schindler H, Bogdan C.** NO as a signaling molecule: effects on kinases. *Int Immunopharmacol*, **2001**; 1: 1443-1455.
51. **So HS, Jung BH, Song HS, Myung, Kim S, Park JS, Chae KM, Lee JH, Chung SY, Chae HJ, Kim HR, Park R.** Nitric oxide prevents the IFN-gamma/LPS-induced hepatotoxicity in a protein kinase G-independent manner. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **2001**; 23(3): 321-334.
52. **Kim YM, Chung HT, Simmons RL, Billiar TR.** Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J Biol Chem*, **2000**; 275(15): 10954-10961.
53. **Kim YM, Bergonia H, Lancaster JR Jr.** Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett*, **1995**; 374(2): 228-232.
54. **Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM.** Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem*, **2001**; 276(14): 10627-10633.
55. **Madesh M, Ramachandran A, Balasubramanian KA.** Nitric oxide prevents anoxia-induced apoptosis in colonic HT29 cells. *Arch Biochem Biophys*, **1999**; 366 (2): 240-248.
56. **Li J, Yuan J.** Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, **2008**; 27: 6194-6206.
57. **Kim YM, Talanian RV, Billiar TR.** Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem*, **1997**; 272(49): 31138-31148.
58. **Kim YM, Chung HT, Kim SS, Han JA, Yoo YM, Kim KM, Lee GH, Yun HY, Green A, Li J, Simmons RL, Billiar TR.** Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling. *J Neurosci*, **1999**; 19(16): 6740-6747.
59. **Estevez AG, Spear N, Thompson JA, Cornwell TL, Radi R, Barbeito L, Beckman JS.** Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*, **1998**; 18(10): 3708-3714.
60. **Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martinez C, Bosca L.** Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest*, **1995**; 95(4): 1884-1890.
61. **Chun SY, Eisenhauer KM, Kubo M, Hsueh AJ.** Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology*, **1995**; 136(7): 3120-3127.
62. **Sata M, Kakoki M, Nagata D, Nishimatsu H, Suzuki E, Aoyagi T, Sugiura S, Kojima H, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Omata M, Nagai R, Hirata Y.** Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cyclic GMP-independent mechanism. *Hypertension*, **2000**; 36(1): 83-88.

63. **Schlossmann J, Feil R, Hofmann F.** Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med*, **2003**; 35(1): 21-27.
64. **Badger AM, Bradbeer JN, Votta B, Lee JC, Adams JL, Griswold DE.** Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock, and immune function. *J Pharmacol. Exp. Ther*, **1996**; 279: 1453-1461.
65. **Kan W, Zhao KS, Jiang Y, Yan W, Huang Q, Wang J, Qin Q, Huang X, Wang S.** Lung, spleen, and kidney are the major places for inducible nitric oxide synthase expression in endotoxic shock: role of p38 mitogen-activated protein kinase in signal transduction of inducible nitric oxide synthase expression. *Shock*, **2004**; 21(3): 281-287.
66. **Mendez C, Jaffray C, ong V, Salhab KF, Kramer AA, Carey LC, Norman JG.** Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the induction of tolerance to hemorrhagic and endotoxic shock. *J Surg Res*, **2000**; 91(2): 165-170.
67. **Wadsworth SA, Cavender DE, Beers SA, Lalan P, Schafer PH, Wu W, Fahmy B, Olini GC, Davis JE, Pellegrino-Gensey JL, Wachter MP, Siekierka JJ.** RWJ 67657, a potent, orally active inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, **1999**; 291: 680-687.
68. **Yoshinari D, Takeyoshi I, Koibuchi Y, Matsumoto K, Kawashima Y, Koyama T, Ohwada S, Morishita Y.** Effects of a dual inhibitor of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats: involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Crit Care Med*, **2001**; 29(3): 628-634.
69. **Branger J, den Blink B, Weijer S, Madwed J, Bos CL, Gupta A, Yong CL, Polmar SH, Olszyna DP, Hack CE, van Deventer SJH, Peppelenbosch MP, van der Poll T.** Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia. *J. Immunol*, **2002**; 168: 4070-4077.
70. **Faas MM, Moes H, Fijen JW, Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG.** Monocyte intracellular cytokine production during human endotoxaemia with or without a second in vitro LPS challenge: effect of RWJ-67657, a p38 MAP-kinase inhibitor, on LPS-hyporesponsiveness. *Clin Exp Immunol*, **2002**; 127(2): 337-343.
71. **Fijen JW, Zijlstra JG, De Boer P, Spanjersberg R, Tervaert JW, Van Der Werf TS, Ligtenberg JJ, Tulleken JE.** Suppression of the clinical and cytokine response to endotoxin by RWJ-67657, a p38 mitogen-activated protein-kinase inhibitor, in healthy human volunteers. *Clin Exp Immunol*, **2001**; 124(1): 16-20.
72. **Lub-de Hooge MN, de Jong S, Vermot-Desroches C, Tulleken JE, de Vries EG, Zijlstra JnG.** Endotoxin increases plasma soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand level mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Shock*, **2004**; 22(2): 186-188.

73. **Lazaron V, Barke RA.** Gram-negative bacterial sepsis and the sepsis syndrome. *Urol Clin North Am*, **1999**; 26(4): 687-699.
74. **Young LS.** Sepsis syndrome. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Eds. *Principles and practice of infectious diseases*, 5<sup>th</sup> Ed. New York: Churchill Livingstone, **2000**: 806-819.
75. **Astiz ME, Rackow EC.** Septic shock. *Lancet*, **1998**; 351: 1501-1505.
76. **Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR.** Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, **2001**; 29: 1303-1310.
77. **Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M.** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, **2003**; 348: 1546-1554.
78. **Rangel-Frausto MS, Pittet D, Hwang T, Woolson RF, Wenzel RP.** The dynamics of disease progression in sepsis: Markov modeling describing the natural history and the likely impact of effective antisepsis agents. *Clin Infect Dis*, **1998**; 27: 185-190.
79. **Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B.** Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med*, **2003**; 168(7): 165-172.
80. **Annane D, Bellissant E, Cavillon JM.** Septic shock. *Lancet*, **2005**; 365: 63-78.
81. **Perez J, Dellinger P.** Sepsis definitions. *Evolving Concepts In Sepsis And Septic Shock*. A.B. D.: Kluwer Academic Publishers, **2001**: 1-15.
82. **Scott AM, Saleh M.** The inflammatory caspases: guardians against infections and sepsis. *Cell Death and Differentiation*, **2007**; 14: 23-31.
83. **Appelmek BJ, Lynn WA.** The cause of sepsis: bacterial cell components that trigger the cytokine cascade. In: Dhainaut JF, Thijs LG, Park G. Eds. *Septic shock*, 1<sup>st</sup> Ed. Çin: W.B Saunders Co, **2000**: 21-26.
84. **Carlson RW, Geheb M.** Sepsis and septic shock. *Critical Care Clinics*, **2000**; 16(2): 198-200.
85. **Kang-Birken SL, Dipiro JT.** Sepsis and septic shock. In: Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. Eds. *Pharmacotherapy*, 5<sup>th</sup> Ed. A.B.D: McGraw-Hill Medical Publishing, **2002**: 2029-2034.
86. **Dinarello C.** Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr Topics Microbiol Immunol*, **1996**; 216: 135-165.



87. **Pugin J.** Toll like receptors. In: Eichacker PQ, Pugin J. Eds. *Evolving concepts in sepsis and septic shock*, 1<sup>st</sup> Ed. A.B.D: Kluwer Academic Publishers, **2001**: 28-33.
88. **Pugin J, Schürer-Maly C, Leturco D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS.** Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci*, **1993**; 90: 2744-2748.
89. **Aird WC.** The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*, **2003**; 101(10): 3765-3777.
90. **Osterud B, Flaegstad T.** Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavourable prognosis. *Thromb Haemost*, **1983**;49(1): 5-7.
91. **Collins PW, Noble KE, Reittie JR, Hoffbrand AV, Pasi KJ, Yong KL.** Induction of tissue factor expression in human monocyte/endothelium cocultures. *Br J Haematol*, **1995**; 91(4): 963-70.
92. **Pernerstorfer T, Hollenstein U, Hansen JB, Stohlawetz P, Eichler HG, Handler S, Speiser W, Jilma B.** Lepirudin blunts endotoxin-induced coagulation activation. *Blood*, **2000**; 95(5): 1729-1734.
93. **Todoroki H, Nakamura S, Higure A, Okamoto K, Takeda S, Nagata N, Itoh H, Ohsato K.** Neutrophils express tissue factor in a monkey model of sepsis. *Surgery*, **2000**; 127(2): 209-216.
94. **Drake TA, Cheng J, Chang A, Taylor FB.** Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis. *Am J Pathol*, **1993**; 142(5): 1458-1470.
95. **Carson SD, Johnson DR.** Consecutive enzyme cascades: complement activation at the cell surface triggers increased tissue factor activity. *Blood*, **1990**; 76(2): 361-367.
96. **Jansen PM, Eisele B, de Jong IW, Chang A, Delvos U, Taylor FB Jr, Hack CE.** Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock. *J Immunol*, **1998**; 160(1): 475-484.
97. **Liu SF, Malik AB.** NFκ-B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **2006**; 290: L622-L645.
98. **Carlstedt F, Lind L.** Hypocalcemic syndromes. *Crit Care Clin*, **2001**; 17(1): 139-153.
99. **Parillo JE.** Pathogenetic mechanisms of septic shock. *New Engl J Med* , **1993**; 328: 1471-1477.
100. **Bone RC.** The sepsis syndrome. Definition and general approach to management. *Clin Chest Med*, **1996**; 17: 175-181.

101. **Crouser ED, Dorinsky PM.** Metabolic consequences of sepsis. Correlation with altered intracellular calcium homeostasis. *Clin Chest Med*, **1996**; 17: 249-261.
102. **Elasser S, Schachinger H, Werner S.** Adjunctive drug treatment in severe hypoxic respiratory failure. *Drugs*, **1999**; 58: 429-446.
103. **Castillo L, Sanchez M.** Septic shock: pathogenesis and treatment. *Indian J Pediatr*, **1993**; 60: 367-379.
104. **Oh HML.** Emerging therapies for sepsis and septic shock. *Ann Acad Med*, **1998**; 27: 738-743.
105. **Kilbourn RG, Traber DL, Szabo C.** Nitric oxide and shock. *Dis Mon*, **1997**; 43: 277-348.
106. **Hotchkiss RS, Karl IE.** The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, **2003**; 348: 138-150.
107. **Klosterhalfen B, Bhardwaj RS.** Septic shock. *Gen Pharmacol*, **1998**; 31(1): 25-32.
108. **Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL.** Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev*, **1999**; 79: 143-180.
109. **Bogoyevitch MA, Court NW.** Counting on mitogen activated protein kinases - ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal*, **2004**; 16: 1345-1354.
110. **Garrington TP, Johnson GL.** Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Cell Biol*, **1999**; 11: 211-218.
111. **Roux PP, Blenis J.** ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, **2004**; 68(2): 320-344.
112. **Dong C, Davis RJ, Flavell RA.** MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*, **2002**; 20: 55-72.
113. **Kleinert H, Boissel J-P, Schwarz P M, Förstermann U.** Regulation of the expression of nitric oxide synthase isoforms. In: Ignarro LJ Eds. *Nitric oxide, biology and pathobiology*, A.B.D: Academic Press, **2000**: 105-128.
114. **Lu Z, Xu S.** ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life*, **2006**; 58(11): 621-631.
115. **Torii S, Nakayama K, Yamamoto T, Nishida E.** Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J Biochem*, **2004**; 136(5): 557-61.

116. **Cooper GM.** Ras, Raf, and the MAP Kinase Pathway. In: Cooper GM Eds. *The Cell A Molecular Approach*, *Sinauer Press*, **2000**.
117. **Pelaia G, Cuda G, Vatrella A, Fratto D, Tagliaferri P, Maselli R, Costanzo FS, Marsico SA.** Mitogen-activated protein kinases: New molecular targets for pharmacological treatment of inflammatory lung diseases. *Curr Med Chem-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*, **2003**; 2: 131-141.
118. **Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Brecher P, Cohen RA.** Temporal control of NF-kappaB activation by ERK differentially regulates interleukin-1beta-induced gene expression. *J Biol Chem*, **2004**; 279(2): 1323-1329.
119. **Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH.** MAP kinases. *Chem. Rev*, **2001**; 101: 2449-2476.
120. **Platanias LC.** Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*, **2003**; 101: 4667-4679.
121. **Kondoh K, Torii S, Nishida E.** Control of MAP kinase signaling to the nucleus. *Chromosoma*, **2005**; 114: 86-91.
122. **Sumbayev VV, Yasinska IM.** Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. *Arch Biochem Biophys*, **2005**; 436(2): 406-412.
123. **Hu ZW, Shi XY, Lin RZ, Chen J, Hoffman BB.** alpha1-Adrenergic receptor stimulation of mitogenesis in human vascular smooth muscle cells: role of tyrosine protein kinases and calcium in activation of mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther*, **1999**; 290(1): 28-37.
124. **Dessey C, Kim I, Sougnez CL, Laporte R, Morgan KG.** A role for MAP kinase differentiated smooth muscle contraction evoked by alpha-adrenoceptor stimulation. *Am J Physiol*, **1998**; 275: C1081-C1086.
125. **Cain AE, Tanner DM, Khalil RA.** Endothelin-1-induced enhancement of coronary smooth muscle contraction via MAPK dependent and MAPK independent  $[Ca^{2+}]_i$  sensitization pathways. *Hypertension*, **2002**; 39: 543-549.
126. **D'Angelo G, Adam LP.** Inhibition of ERK attenuates force development by lowering myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2002**; 282: H602-H610.
127. **Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA.** The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals*, **2002**; 11(5): 270-281.
128. **Van Den Blink B, Ten Hove T, Van Den Brink GR, Peppelenbosch MP, Van Deventer SJ.** From extracellular to intracellular targets, inhibiting MAP kinases in treatment of Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci*, **2002**; 973: 349-358.

129. **Herlaar E, Brown Z.** p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today*, **1999**; 5(10): 439-447.
130. **Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger A, Adams JL.** p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther*, **1999**; 82(2-3): 389-397.
131. **Ji RR, Suter MR.** p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain*, **2007**; 1(3): 33.
132. **Roberts PJ, Der CJ.** Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, **2007**; 26(22): 3291-310.
133. **Belvisi MG, Hele DJ, Birrell MA.** New advances and potential therapies for the treatment of asthma. *BioDrugs*, **2004**; 18(4): 211-223.
134. **Aggarwal BB.** Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, **2003**; 9: 745-756.
135. **Lee JC, Young PR.** Role of CSBP/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J Leukoc Biol*, **1996**; 59: 152-157.
136. **Kyriakis JM, Avruch J.** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation, *Physiol. Rev*, **2001**; 81: 807-869.
137. **Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW.** A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis, *Nature*, **1994**; 372: 739-742.
138. **Tak PP, Firestein GS.** NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, **2001**; 107: 7-11.
139. **Blantz RC, Munger K.** Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron*, **2002**; 90: 373-378.
140. **Chatterjee A, Catravas JD.** Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol*, **2008**; 49(4-6): 134-140.
141. **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.
142. **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.

143. **Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik TJ.** Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Physiol Pharmacol*, **2003**; 54: 469-487.
144. **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.
145. **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.
146. **Knott AB, Bossy-Wetzel E.** Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal*, **2008**; Aug 20.
147. **Martinez MC, Andriantsitohaina R.** Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal*, **2008**; Nov 17.
148. **Pacher P, Beckman JS, Liaudet L.** Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, **2007**; 87(1): 315-424.
149. **Raij L.** Nitric oxide and cardiovascular and renal effects. *Osteoarthritis Cartilage*. **2008**; 16(Suppl 2): S216.
150. **Rubbo H, Trostchansky A, O'Donnell VB.** Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences. *Arch Biochem Biophys*, **2008**; 484(2): 167-72.
151. **Schildknecht S, Ullrich V.** Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Arch Biochem Biophys*, **2009**; 484(2): 183-189.
152. **Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS.** Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, **2007**; 15(6): 252-259.
153. **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.
154. **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.
155. **Wimalawansa SJ.** Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indications. *Expert Opin Pharmacother*, **2008**; 9(11): 1935-1954.
156. **Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE.** Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr*, **2004**; 134(9): 2169-2172.
157. **Bryan NS, Bian K, Murad F.** Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci*, **2009**; 14: 1-18.

158. **Searles CD.** Transcriptional and postranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol*, **2006**; 291: C803-C816.
159. **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.
160. **Garthwaite J.** Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci*, **2008**; 27: 2783-802.
161. **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.
162. **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.
163. **Wu G, Meininger CJ.** Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu Rev Nutr*, **2002**; 22: 61-86.
164. **Dudzinski DM, Michel T.** Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res*, **2007**; 75: 247-260.
165. **Igarashi J, Michel T.** S1P and eNOS regulation. *Biochim Biophys Acta*, **2008**; 1781: 489-495.
166. **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.
167. **Cotter G, Kaluski E, Milo O, Blatt A, Salah A, Hendler A, Krakover R, Golick A, Vered Z.** LINCOS: L-NAME (a NO synthase inhibitor) in the treatment of refractory cardiogenic shock a prospective randomized study. *Eur Heart J*, **2003**; 24(14): 1287-1295.
168. **Wecht JM, Weir JP, Krothe AH, Spungen AM, Bauman WA.** Normalization of supine blood pressure after nitric oxide synthase inhibition in persons with tetraplegia. *J Spinal Cord Med*, **2007**; 30(1): 5-9.
169. **Avontuur JA, Tutein Nolthenius RP, Buijk SL, Kanhai KJ, Bruining HA.** Effect of L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on cardiopulmonary function in human septic shock. *Chest*, **1998**; 113(6): 1640-1646.
170. **Avontuur JA, Stam TC, Jongen-Lavrencic M, van Amsterdam JG, Eggermont AM, Bruining HA.** Effect of L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on plasma levels of IL-6, IL-8, TNF alpha and nitrite/nitrate in human septic shock. *Intensive Care Med*, **1998**; 24(7): 673-679.

171. **Spain DA, Wilson MA, Garrison RN.** Nitric oxide synthase inhibition exacerbates sepsis-induced renal hypoperfusion. *Surgery*, **1994**; 116(2): 322-330.
172. **Hallemeesch MM, Cobben DC, Soeters PB, Deutz NE.** Differential effects of selective and non-selective NOS inhibition on renal arginine and protein metabolism during endotoxemia in rats. *Clin Nutr*, **2002**; 21(2): 111-117.
173. **Avontuur JA, Biewenga M, Buijk SL, Kanhai KJ, Bruining HA.** Pulmonary hypertension and reduced cardiac output during inhibition of nitric oxide synthesis in human septic shock. *Shock*, **1998**; 9(6): 451-454.
174. **Robertson FM, Offner PJ, Ciceri DP, Becker WK, Pruitt BA Jr.** Detrimental hemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibition in septic shock. *Arch Surg*, **1994**; 129(2): 149-155.
175. **Aaron SD, Valenza F, Volgyesi G, Mullen JB, Slutsky AS, Stewart TE.** Inhibition of exhaled nitric oxide production during sepsis does not prevent lung inflammation. *Crit Care Med*, **1998**; 26(2): 309-314.
176. **Mehanna A, Vitorino DC, Panis C, Blanco EE, Pinge-Filho P, Martins-Pinge MC.** Cardiovascular and pulmonary effects of NOS inhibition in endotoxemic conscious rats subjected to swimming training. *Life Sci*, **2007**; 81(16): 1301-1308.
177. **Wolkow PP.** Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm Res*, **1998**; 47(4): 152-166.
178. **Heemskerk S, Pickkers P, Bouw MP, Draisma A, van der Hoeven JG, Peters WH, Smits P, Russel FG, Masereeuw R.** Upregulation of renal inducible nitric oxide synthase during human endotoxemia and sepsis is associated with proximal tubule injury. *Clin J Am Soc Nephrol*, **2006**; 1(4): 853-862.
179. **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.
180. **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.
181. **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-triphosphate receptor. *J Biol Chem*, **1994**; 269: 11640-11647.
182. **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.
183. **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.

184. **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.
185. **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.
186. **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.
187. **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.
188. **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.
189. **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.
190. **Giulivi C.** Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism, *Biochem J*, **1998**; 332: 673-679.
191. **Brown GC.** Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett*, **1995**; 369: 136-139.
192. **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.
193. **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.
194. **Pucovsky V, Gordienko DV, Bolton TB.** Effect of nitric oxide donors and noradrenaline on  $Ca^{2+}$  release sites and global intracellular  $Ca^{2+}$  in myocytes from guinea-pig small mesenteric arteries. *J Physiol*, **2002**; 539: 25-39.
195. **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.
196. **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.



197. **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.
198. **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.
199. **Adachi T, Matsui R, Weisbrod RM, Najibi S, Cohen RA.** Reduced sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake activity can account for the reduced response to NO, but not sodium nitroprusside, in hypercholesterolaemic rabbit aorta. *Circulation*, **2001**; 104: 1040-1045.
200. **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.
201. **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-Balpa. *J Biol Chem*, **1997**; 272: 30969-30974.
202. **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.
203. **Garthwaite J.** Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci*, **1991**; 14: 60-67.
204. **Stamler JS.** Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, **1994**; 78: 931-936.
205. **Bredt DS, Snyder SH.** Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*, **1994**; 63: 175-195.
206. **Nathan C.** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, **1992**; 6: 3051-3064.
207. **Hardman JG, Sutherland EW.** Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem*, **1969**; 244(23): 6363-6370.
208. **Schultz G, Bohme E and Munske K.** Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci*, **1969**; 8: 1323-1332.
209. **White AA, Aurbach GD.** Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*, **1969**; 191: 686-697.

210. **Garbers DL, Gray JP.** Guanylate cyclase from sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Methods Enzymol*, **1974**; 38: 196-199.
211. **Kimura H, Murad F.** Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J Biol Chem*, **1974**; 249: 6910-6916.
212. **Chrisman TD, Garbers DL, Parks MA, Hardman JG.** Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. *J Biol Chem*, **1975**; 250: 374-381.
213. **Gerzer R, Hofmann F, Schultz G.** Purification of a soluble, sodium nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur J Biochem*, **1981**; 116: 479-486.
214. **Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri JA, Kuno T, Chang BY, Waldman SA, Murad F.** Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem*, **1986**; 261: 7236-7241.
215. **Hobbs AJ.** Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *TIPS*, **1997**; 18(12): 484-491.
216. **Pyriochou A, Papapetropoulos A.** Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. *Cellular Signalling*, **2005**; 17: 407-413.
217. **Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F.** Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull*, **2004**; 62(6): 505-515.
218. **Braughler JM, Mittal CK, Murid F.** Purification of soluble guanylate cyclase from rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1979**; 76: 219-222.
219. **Garbers DL.** Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem*, **1979**; 254: 240-243.
220. **Lewicki JA, Brandwein HJ, Waldman SA, Murad F.** Purified guanylate cyclase: Characterization, iodination and preparation of monoclonal antibodies. *J Cyclic Nucleotide Res* **1980**; 6: 283-296.
221. **Koesling D, Herz J, Gausepohl H, Niroomand F, Hinsch KD, Mulsch A, Bohme E, Schultz G, Frank R.** The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett*, **1988**; 239: 29-34.
222. **Koesling D, Harteneck C, Humbert P, Bosserhoff A, Frank R, Schultz G, Bohme E.** The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett*, **1990**; 266: 128-132.
223. **Nakane M, Saheki S, Kuno T, Ishii K, Murad F.** Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem Biophys Res Commun*, **1988**; **157**: 1139-1147.

224. Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W, Murad F. Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem*, **1990**; 265: 16841-16845.
225. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*, **2000**; 52(3): 375-414.
226. Craven PA, DeRubertis FR. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem*, **1978**; 253: 8433-8443.
227. Craven PA, DeRubertis FR. Requirement for heme in the activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochim Biophys Acta*, **1983**; 745: 310-321.
228. Gerzer R, Radany EW, Garbers DL. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **1982**; 108: 678-686.
229. Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wolin MS. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of hemedeficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta*, **1982**; 718: 49-59.
230. Ohlstein EH, Wood KS, Ignarro LJ. Purification and properties of hemedeficient hepatic soluble guanylate cyclase: Effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch Biochem Biophys*, **1982**; 218: 187-198.
231. Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucleotide Res*, **1977**; 3: 23-35.
232. Miki N, Kawabe Y, Kuriyama K. Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **1977**; 75: 851-856.
233. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3P:5P-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl Acad Sci USA*, **1977**; 74: 3203-3207.
234. Schultz K, Schultz G. Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature*, **1977**; 265: 750-751.
235. Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: Activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, **1994**; 33: 5636-5640.

236. **Friebe A, Schultz G, Koesling D.** Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *Embo J*, **1996**; 15: 6863-6868.
237. **Mulsch A, Bauersachs J, Schafer A, Stasch JP, Kast R, Busse R.** Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol*, **1997**; 120: 681-689.
238. **Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schroder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M.** NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature*, **2001**; 410: 212-215.
239. **Russwurm M, Koesling D.** Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2002**; 230: 159-164.
240. **Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B.** Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol*, **1995**; 48: 184-188.
241. **Brunner F, Schmidt K, Nielsen EB, Mayer B.** Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther*, **1996**; 277: 48-53.
242. **Moro MA, Russel RJ, Celtek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S.** cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**; 93: 1480-1485.
243. **Abi-Gerges N, Hove-Madsen L, Fischmeister R, Mery PF.** A comparative study of the effects of three guanylyl cyclase inhibitors on the L-type Ca<sup>2+</sup> and muscarinic K<sup>+</sup> currents in frog cardiac myocytes. *Br J Pharmacol*, **1997**; 121: 1369-1377.
244. **Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B.** Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol*, **1996**; 50: 1-5.
245. **Mayer B, Brunner F, Schmidt K.** Novel actions of methylene blue. *Eur Heart J*, **1993**; 14: 22-26.
246. **Leinders-Zufall T, Zufall F.** Block of cyclic nucleotide-gated channels in salamander olfactory receptor neurons by the guanylyl cyclase inhibitor LY83583. *J Neurophysiol*, **1995**; 74: 2759-2762.
247. **Collier J, Vallance P.** Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends Pharmacol Sci*, **1989**; 10: 427-431.

248. **Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR.** Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases, *Trends Biochem Sci*, **1997**; 22(8): 307-312.
249. **Denninger JW, Marletta MA.** Guanylate cyclase and the cNO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, **1999**; 1411: 334-350.
250. **Field M, Graf LHJ, Laird WJ, Smith PL.** Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: In vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic Gmp concentration, and ion transport in small intestine. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1978**; 75: 2800-2804.
251. **Hughes JM, Murad F, Chang B, Guerrant RL.** Role of cyclic Gmp in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Nature*, **1978**; 271: 755-756.
252. **Mezoff AG, Giannella RA, Eade MN, Cohen MB.** *Escherichia coli* enterotoxin (STa) binds to receptors, stimulates guanyl cyclase, and impairs absorption in rat colon. *Gastroenterology*, **1992**; 102: 816-822.
253. **Ames JB, Dizhoor AM, Ikura M, Palczewski K, Stryer L.** Three dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases. *J Biol Chem*, **1999**; 274: 9329-9337.
254. **Thatcher GR, Bennett BM, Reynolds JN.** NO chimeras as therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, **2006**; 3(3): 237-245.
255. **Rodrigo R, Montoliu C, Chatauret N, Butterworth R, Behrends S, Del Olmo JA, Serra MA, Rodrigo JM, Erceg S, Felipo V.** Alterations in soluble guanylate cyclase content and modulation by nitric oxide in liver disease. *Neurochem Int*, **2004**; 45(6): 947-953.
256. **Cai C, Chen SY, Zheng Z, Omwancha J, Lin MF, Balk SP, Shemshedini L.** Androgen regulation of soluble guanylyl cyclase  $\alpha$ 1 mediates prostate cancer cell proliferation. *Oncogene*, **2007**; 26(11): 1606-1615.
257. **Force T, Kuida K, Namchuk M, Parang K, Kyriakis JM.** Inhibitors of protein kinase signaling pathways: emerging therapies for cardiovascular disease. *Circulation*, **2004**; 109(10): 1196-1205.
258. **Tamura N, Itoh H, Ogawa Y, Nakagawa O, Harada M, Chun TH, Suga S, Yoshimasa T, Nakao K.** cDNA cloning and gene expression of human type Ia cGMP-dependent protein kinase. *Hypertension*, **1996**; 27: 552-557.
259. **Orstavik S, Solberg R, Taske'n K, Nordahl M, Altherr MR, Hansson V, Jahnsen T, Sandberg M.** Molecular cloning, cDNA structure, and chromosomal localization of the human type II cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **1996**; 220: 759-765.
260. **Schlossmann J, Hofmann F.** cGMP-dependent protein kinases in drug discovery. *Drug Discov Today*, **2005**; 10(9): 627-634.

261. **Parang K, Cole PA.** Designing bisubstrate analog inhibitors for protein kinases. *Pharmacol Ther*, **2002**; 93(2-3): 145-157.
262. **Feil R, Lohmann SM, de Jonge H, Walter U, Hofmann F.** Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res*, **2003**; 93(10): 907-916.
263. **Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, Walter U, Skatchkov M, Meinertz T, Münzel T.** Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res*, **2000**; 87(11): 999-1005.
264. **Hidaka H, Kobayashi R.** Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1992**; 32: 377-397.
265. **Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H.** Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*, **1990**; 265(9): 5267-5272.
266. **Burkhardt M, Glazova M, Gambaryan S, Vollkommer T, Butt E, Bader B, Heermeier K, Lincoln TM, Walter U, Palmethofer A.** KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity in vitro but not in intact human platelets and rat mesangial cells. *J Biol Chem*, **2000**; 275: 33536-33541.
267. **Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F.** NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*, **2001**; 7(4): 801-819.
268. **Münzel T, Feil R, Mülsch A, Lohmann SM, Hofmann F, Walter U.** Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by cyclic guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation*, **2003**; 108: 2172-2183.
269. **Pfeifer, A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fassler R.** Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP dependent protein kinase II. *Science*, **1996**; 274: 2082-2086.
270. **Schricker K, Kurtz A.** Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol*, **1993**; 265: F180-F186.
271. **Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Shimoaka T, Kawano H, Kamekura S, Tsuchida A, Yokoi N, Nakamura K, Komeda K, Chung UI, Kawaguchi H.** Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes Dev*, **2004**; 18: 2418-2429.

272. **Bivalacqua TJ, Kendirci M, Champion HC, Hellstrom WJ, Andersson KE, Hedlund P.** Dysregulation of cGMP-dependent protein kinase 1 (PKG-1) impairs erectile function in diabetic rats: influence of in vivo gene therapy of PKG1alpha. *BJU Int*, **2007**; 99(6): 1488-1494.
273. **Tegeder I, Del Turco D, Schmidtko A, Sausbier M, Feil R, Hofmann F, Deller T, Ruth P, Geisslinger G.** Reduced inflammatory hyperalgesia with preservation of acute thermal nociception in mice lacking cGMP-dependent protein kinase I. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2004**; 101(9): 3253-3257.
274. **Wang XH, Tong M, Dou D, Usha JR, Gao YS.** Role of cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, **2005**; 36(4): 299-303.
275. **Thompson CB.** Apoptosis. In: Paul WE. 4<sup>th</sup>Eds. *Fundamental Immunology*, Philadelphia:Lippincott Raven Publisher, **1999**: 813-829.
276. **Bortner CD, Cidlowski JA.** Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2002**; 42: 259-281.
277. **Chung CS, Yang S, Song GY, Lomas J, Wang P, Simms HH, Chaudry IH, Ayala A.** Inhibition of Fas signaling prevents hepatic injury and improves organ blood flow during sepsis. *Surgery*, **2001**;130(2): 339-345.
278. **Hoglen NC, Hirakawa BP, Fisher CD, Weeks S, Srinivasan A, Wong AM, Valentino KL, Tomaselli KJ, Bai X, Karanewsky DS, Contreras PC.** Characterization of the caspase inhibitor IDN-1965 in a model of apoptosis-associated liver injury. *J Pharmacol Exp Ther*, **2001**; 297(2): 811-818.
279. **Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL.** Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J*, **2001**; 15(6): 879-892.
280. **Alam JJ.** Apoptosis: target for novel drugs. *TRENDS in Biotechnology*, **2003**; 21(11): 479-483.
281. **Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E, Aspiotis R, Han Y, Nicholson DW, Karl IE.** Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol*, **2000**; 1(6): 496-501.
282. **Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW.** Gene expression profiling of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem*, **2001**; 76(14): 11199-11203.
283. **Frey EA, Finlay BB.** Lipopolysaccharide induces apoptosis in a bovine endothelial cell line via a soluble CD14 dependent pathway. *Microb Pathog*, **1998**; 24: 101-109.
284. **Fujita M, Kuwano K, Kunitake R, Hagimoto N, Miyazaki H, Kaneko Y, Kawasaki M, Maeyama T, Hara N.** Endothelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Int Arch Allergy Immunol*, **1998**; 117: 202-208.

285. **Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Bayoumy S, Garzotto M, McLoughlin M, Gallily R, Edwards CK III, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R.** Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med*, **1997**; 186: 1831-1841.
286. **Kawasaki M, Kuwano K, Hagimoto N, Matsuba T, Kunitake R, Tanaka T, Maeyama T, Hara N.** Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor. *Am J Pathol*, **2000**; 157: 597-603.
287. **Koide N, Abe K, Narita K, Kato Y, Sugiyama T, Jiang GZ, Yokochi T.** Apoptotic cell death of vascular endothelial cells and renal tubular cells in the generalized Shwartzman reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **1996**;16: 205-211.
288. **Meyrick B.** Pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Clin*, **1986**; 2: 405-428.
289. **Mutunga M, Fulton B, Bullock R, Batchelor A, Gascoigne A, Gillespie JI, and Baudouin SV.** Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**; 163: 195-200.
290. **DeMeester SL, Qiu Y, Buchman TG, Hotchkiss RS, Dunnigan K, Karl IE, Cobb JP.** Nitric oxide inhibits stress induced endothelial cell apoptosis. *Crit Care Med*, **1998**; 26: 1500-1509.
291. **Smith JD, McLean SD, Nakayama DK.** Nitric oxide causes apoptosis in pulmonary vascular smooth muscle cells. *J Surg Res*, **1998**; 79(2): 121-127.
292. **Sheehan M, Wong HR, Hake PW, Malhotra V, O'Connor M, Zingarelli B.** Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Mol Pharmacol*, **2002**; 61: 953-963.
293. **O'Connor M, Salzman AL, Szabo C.** Role of peroxynitrite in the protein oxidation and apoptotic DNA fragmentation in vascular smooth muscle cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Shock*, **1997**; 8(6): 439-443.
294. **Zhao Z, Francis CE, Welch G, Loscalzo J, Ravid K.** Reduced glutathione prevents nitric oxide-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, **1997**; 1359(2): 143-152.
295. **Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR.** DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1992**; 89: 3030-3034.
296. **Salgo MG, Bermudez E, Squadrito GL, Pryor WA.** DNA damage and oxidation of thiols peroxynitrite causes in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys*, **1995**; 322: 500-505.



297. **Salgo MG, Squadrito GL, Pryor WA.** Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **1995**; 215: 1111-1118.
298. **Estevez AG, Radi R, Barbeito L, Shin JT, Thompson JA, Beckman JS.** Peroxynitrite-induced cytotoxicity in PC12 cells: Evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors. *J Neurochem*, **1995**; 65: 1543-1550.
299. **Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B, Wong PY.** Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem*, 270, **1995**; 16487-16490.
300. **Szabo C, Zingarelli B, Salzman AL.** Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. *Circ Res*, **1996**; 78(6): 1051-1063.
301. **Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM.** Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovasc Res*, **2000**; 45: 588-594.
302. **Loweth AC, Williams GT, Scarpello JH, Morgan NG.** Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B cell line, HIT-T15. *FEBS Lett*, **1997**; 400: 285-288.
303. **Shimojo T, Hiroe M, Ishiyama S, Ito H, Nishikawa T, Marumo F.** Nitric oxide induces apoptotic death of cardiomyocytes via a cyclic-GMP-dependent pathway. *Exp Cell Res*, **1999**; 247: 38-47.
304. **Soh JW, Mao Y, Kim MG, Pamukcu R, Li H, Piazza GA, Thompson WJ, Weinstein IB.** Cyclic GMP mediates apoptosis induced by sulindac derivatives via activation of c-Jun NH2-terminal kinase 1. *Clin Cancer Res*, **2000**; 6: 136-4141.
305. **Chiche JD, Schlutsmeyer SM, Bloch DB, de la Monte SM, Roberts JD, Filippov G, Janssens SP, Rosenzweig A, Bloch KD.** Adenovirus-mediated gene transfer of cGMP-dependent protein kinase increases the sensitivity of cultured vascular smooth muscle cells to the antiproliferative and pro-apoptotic effects of nitric oxide/cGMP. *J Biol Chem*, **1998**; 273: 34263-34271.
306. **Li Y, Maher P, Schubert D.** Requirement for cGMP in nerve cell death caused by glutathione depletion. *J Cell Biol*, **1997**; 139: 1317-1324.
307. **Tunctan B, Korkmaz B, Yildirim H, Tamer L, Atik U, Buharalioglu C.** Increased Production of nitric oxide contributes to renal oxidative stress in endotoxemic rat. *Am J Infect Dis*, **2005**; 1: 111-115.
308. **Tunctan B, Altug S, Uludag O, Abacioglu N.** Effects of econazole on receptor-operated and depolarization-induced contractions in rat isolated aorta. *Life Sci*, **2000**; 67: 2393-2401.

309. **Tsukahara T, Hongo K, Kassell NF, Ogawa H.** Characterization of muscarinic cholinergic receptors on the endothelium and the smooth muscle of the rabbit thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*, **1989**; 13: 870-878.
310. **Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA.** Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*, **1981**; 218: 739-749.
311. **Malta E.** Studies on the biphasic relaxant curve of glyceryl trinitrate in rat aorta: role of GTN metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **1989**; 16(11): 829-385.
312. **Chen SJ, Chen KH, Wu CC.** Nitric oxide-cyclic GMP contributes to abnormal activation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in the aorta from rats with endotoxic shock. *Shock*, **2005**; 23: 179-185.
313. **Palacios J, Marusic ET, Lopez NC, Gonzalez M, Michea L.** Estradiol-induced expression of N<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase catalytic isoforms in rat arteries: gender differences in activity mediated by nitric oxide donors. *Am J Physiol*, **2004**; 286(5): H1793-H1800.
314. **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.
315. **Wilson, CM.** Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. *Methods in Enzymol*, **1983**; 91: 236-247.
316. **Salinovich O, Montelano RC.** Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **1986**; 156: 341-347.
317. **Moreau R, Barriere E, Tazi KA, Lardeux B, Dargere D, Urbanowicz W, Poirel O, Chauvelot-Moachon L, Guimont MC, Bernuau D, Lebrec D.** Terlipressin inhibits in vivo aortic iNOS expression induced by lipopolysaccharide in rats with biliary cirrhosis. *Hepatology*, **2002**; 36(5): 1070-1078.
318. **Wu CC, Liao MH, Chen SJ, Yen MH.** Pentoxifylline improves circulatory failure and survival in murine models of endotoxaemia. *Eur J Pharmacol*, **1999**; 373(1): 41-49.
319. **Wu CC, Liao MH, Chen SJ, Yen MH.** Tetramethylpyradizine prevents inducible NO synthase expression and improves survival in rodent models of endotoxic shock. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, **1999**; 360(4): 435-444.
320. **Gupta A, Sharma AC.** Despite minimal hemodynamic alterations endotoxemia modulates NOS and p38-MAPK phosphorylation via metalloendopeptidases. *Mol Cell Biochem*, **2004**; 265(1-2): 47-56.

321. **Gupta A, Sharma AC.** Metalloendopeptidase inhibition regulates phosphorylation of p38-mitogen-activated protein kinase and nitric oxide synthase in heart after endotoxemia. *Shock*, **2003**; 20(4): 375-381.
322. **Sharma AC, Sam AD, Alden KJ, Moore SL, Law WR, Ferguson JL.** Central versus peripheral mediation of naloxone's perfusion effects in endotoxic rats. *Shock*, **2000**; 14(4): 441-446.
323. **Mazzocchi G, Albertin G, Nussdorfer GG.** Adrenomedullin (ADM), acting through ADM(22-52)-sensitive receptors, is involved in the endotoxin-induced hypotension in rats. *Life Sci*, **2000**; 66(15): 1445-1450.
324. **Karimi G, Fatehi Z, Gholamnejad Z.** The role of nitric oxide and protein kinase C in lipopolysaccharide-mediated vascular hyporeactivity. *J Pharm Pharm Sci*, **2006**; 9: 119-123.
325. **Virdis A, Colucci R, Fornai M, Blandizzi C, Duranti E, Pinto S, Bernardini N, Segnani C, Antonioli L, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M.** Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*, **2005**; 312: 945-953.
326. **Chen Y, Medhora M, Falck JR, Pritchard KA Jr, Jacobs ER.** Mechanisms of activation of eNOS by 20-HETE and VEGF in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol*, **2006**; 291: L378-L385.
327. **Guo AM, Arbab AS, Falck JR, Chen P, Edwards PA, Roman RJ, Scicli AG.** Activation of VEGF through ROS mediates 20-HETE-induced endothelial cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther*, **2007**; 321: 18-27.
328. **Roman RJ, Lombard JH.** Does 20-hydroxyeicosatetraenoic acid contribute to sex differences in cardiovascular risk by increasing oxidative stress. *Hypertension*, **2007**; 50: 37-38.
329. **Singh H, Cheng J, Deng H, Kemp R, Ishizuka T, Nasjletti A, Schwartzman ML.** Vascular cytochrome P450 4A expression and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis contribute to endothelial dysfunction in androgen-induced hypertension. *Hypertension*, **2007**; 50:123-129.
330. **Wang JS, Singh H, Zhang F, Ishizuka T, Deng H, Kemp R, Wolin MS, Hintze TH, Abraham NG, Nasjletti A, Laniado-Schwartzman M.** Endothelial dysfunction and hypertension in rats transduced with CYP4A2 adenovirus. *Circ Res*, **2006**; 98: 962-969.
331. **Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM.** Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med*, **1997**; 185(4): 601-607.
332. **Gambim MH, do Carmo Ade O, Marti L, Verissimo-Filho S, Lopes LR, Janiszewski M.** Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit Care*, **2007**; 11(5): R107.

- 333. Sumbayev VV.** PI3 kinase and direct S-nitrosation are involved in down-regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 during LPS-induced Toll-like receptor 4 signalling. *Immunol Lett*, **2008**; 29; 115(2): 126-130.
- 334. Tzeng E, Kim YM, Pitt BR, Lizonova A, Kovesdi I, Billiar TR.** Adenoviral transfer of the inducible nitric oxide synthase gene blocks endothelial cell apoptosis. *Surgery*, **1997**; 122(2): 255-263.
- 335. Li J, Billiar TR, Talanian RV, Kim YM.** Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**; 240(2): 419-424.

## ÖZGEÇMİŞ

Remile Belma KORKMAZ 24/07/1978 tarihinde Mersin'de doğmuştur. İlkokul öğrenimini Mersin 3 Ocak İlköğretim Okulu'nda, orta ve lise öğrenimini ise İçel Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. 2001 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden mezun olmuştur. Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda 2001-2002 Eğitim-Öğretim Yılı Bahar Dönemi'nde Yüksek Lisans Programı'na başlamış ve 2003-2004 Eğitim-Öğretim Yılı sonunda "Endotoksin ile oluşan vasküler hiporeaktivitede G proteini ile kenetli alfa-adrenerjik reseptör/mitojen ile aktive edilen kinazlar yolu ile sitozolik fosfolipaz A<sub>2</sub> ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz enzimleri arasındaki ilişkinin mekanizmalarının sıçan aortunda araştırılması" adlı Yüksek Lisans Tezi'ni tamamlamıştır. 01/11/2002 tarihinden itibaren Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir. İngilizce bilmektedir.