

T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

İNSAN ERİTROSİTLERİNDE RHO/RHO-KİNAZ
SİNYAL İLETİ MEKANİZMASININ FONKSİYONEL ÖNEMİ

Dr. Nalan TİFTİK

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAŞAR

MERSİN-2009

T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

İNSAN ERİTROSİTLERİNDE RHO/RHO-KİNAZ
SİNYAL İLETİ MEKANİZMASININ FONKSİYONEL ÖNEMİ

Dr. Nalan TİFTİK

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAŞAR

Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE-FB (RNT) 2007-2 DR nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....

MERSİN-2009

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

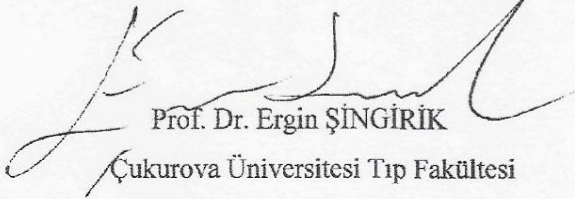
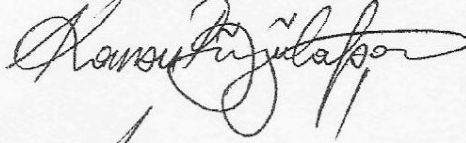
Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “İnsan Eritrositlerinde Rho/Rho-Kinaz Sinyal İleti Mekanizmasının Fonksiyonel Önemi ” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/ 12/2009

Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAŞAR

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Farmakoloji Anabilim Dalı



Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK

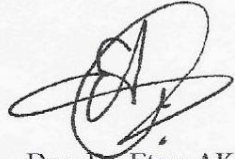
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi

Farmakoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Nurhan ÖĞÜLENER

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi

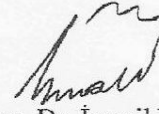
Farmakoloji Anabilim Dalı



Doç. Dr. Etem AKBAŞ

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Yrd. Doç. Dr. İsmail ÜN

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Farmakoloji Anabilim Dalı

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 23.12.2009 tarih ve 2009/448 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Farmakoloji eğitimine başladığım günden bu yana, sahip olduğu bilgi ve tecrübelerini büyük bir sabırla benimle paylaşan, başarı konusunda daima yüreklendiren danışman hocam Sn. Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR'a;

Her türlü destek ve katkısı için Anabilim Dalımız öğretim üyesi Sn. Yrd. Doç. Dr. İsmail ÜN'e;

Tezimin deneysel çalışmalarının büyük kısmında Akdeniz Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Hemoreoloji Laboratuvarı ve Merkez Laboratuvarının tüm olanaklarını kullanma imkanı veren Sn. Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT'a;

Kendi laboratuvarımda hissetmemi sağlayan ve beraber olmaktan büyük mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Sn. Arş. Gör. Mehmet Murat ÜYÜKLÜ, Sn. Arş. Gör. Pınar ÜLKER, Akdeniz Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Teknisyeni Sn. Akın BÜYÜKAKAR'a ve tüm laboratuvar personeline;

Tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki sonsuz özveri ve yardımlarından dolayı Sn. Yrd. Doç. Dr. Seval KUL'a;

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım, yardım ve desteklerini her zaman hissettiğim asistan arkadaşlarım Sn. Arş. Gör. A. Hakan KURT, Sn. Arş. Gör. Mehtap PEKTAŞ, Sn. Arş. Gör. Sencer YURTSEVER, Sn. Arş. Gör. Özge GÜLDALI ve diğer asistan arkadaşlarıma;

Antalyada bana evlerini açıp konukseverlikleri ile ailemi aratmamaya çalışan tüm aile dostlarımıza;

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi lisansüstü eğitimim boyunca da her zaman yanımda ve bana destek olan Anneme, Babama, sonsuz sabır ve destekleri için eşim Sn. Doç. Dr. Naci TİFTİK ve oğlum Barış TİFTİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
ÖZET.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Eritrositler.....	5
2.1.1.Eritrosit Yapımı (Eritropoezis).....	6
2.1.2.Eritrositin Yapısal Özellikleri.....	8
2.1.2.1.Eritrositin Şekli.....	8
2.1.2.2.Eritrosit Hücre İskeleti ve Membran Yapısı.....	9
2.1.2.2.1.Membran Yapısı.....	9
2.1.2.2.2.Membran Lipidleri.....	10
2.1.2.2.3.Eritrosit Membran Proteinleri.....	13
2.1.2.2.3.1.Transmembran Proteinleri.....	14
2.1.2.2.3.2.Hücre İskeleti Proteinleri.....	15
2.1.2.2.3.3.Bağlayıcı Proteinler.....	18
2.1.2.2.4.Eritrosit Membranı ile İlişkili Enzimler.....	19
2.1.2.2.5.Çeşitli Membran Komponentlerinin Eritrosit Fonksiyonlarına Katkısı.....	23
2.1.2.2.5.1.Hücre Geometrisi.....	23
2.1.2.2.5.2.Stoplazmik Vizkozite ve Hücre Volüm Düzenlenmesi.....	25
2.1.2.2.5.3.Membran Deformabilitesi.....	26
2.1.2.3.Eritrosit Deformabilitesini Etkileyen Fizyopatolojik Durumlar.....	27
2.1.2.4.Hücre İskeleti Proteinlerine Bağlı Kalıtsal Eritrosit Membran Hastalıkları ve Eritrosit Deformabilitesi.....	29
2.1.2.4.1.Kalıtsal Sferositoz.....	30

2.1.2.4.2. Kalıtsal Eliptositoz.....	31
2.1.2.4.3. Kalıtsal Piropoikilositoz.....	32
2.1.2.4.4. Kalıtsal Stomatositoz.....	32
2.1.2.5. Orak Hücre Sendromu ve Eritrosit Deformabilitesi.....	33
2.1.2.6. Eritrosit Metabolizması.....	34
2.1.2.7. Eritrositlerde Hücre İçi Sinyal İleti Mekanizmaları.....	35
2.1.2.7.1. Nitrik Oksid ve Eritrositler.....	39
2.1.2.7.2. Shear Stresle İndüklenen ve Kalsiyum Bağımlı Mekanizmalar.....	40
2.1.2.8. Eritrosit Deformabilitesi Ölçüm Yöntemleri.....	44
2.1.2.8.1. LORCA ile Eritrosit Deformabilitesi Ölçümü.....	44
2.2. G Proteinleri.....	46
2.2.1. Heterotrimerik G Proteinleri.....	46
2.3.2. Düşük Molekül Ağırlıklı G Proteinleri.....	47
2.3.3. Rho Proteinleri.....	48
2.3.4. Rho Aktivitesinin Düzenlenmesi.....	48
2.3.5. Rho Proteininin Alt Eftörleri.....	50
2.3.5.1. Rho-kinaz.....	50
2.3.5.2. Myozin Fosfatazın Myozin Bağlayıcı Alt ünitesi.....	51
2.3.5.3. Protein Kinaz N.....	52
2.3.5.4. Rho filin ve Rhotekin.....	52
2.3.5.5. Sitron ve Sitron-kinaz.....	52
2.3.5.6. p140 mDia.....	53
2.3.5.7. Fosfolipaz D.....	53
2.3.5.8. Fosfatidilinozitol 5'kinaz (PI5K).....	53
2.3.6. Rho Proteini ve Alt Eftörlerinin Biyolojik Fonksiyonları.....	54
2.3.6.1. Düz Kas Kasılması.....	54
2.3.6.2. Stres Fiber Oluşumu ve Fokal Adhezyonlar.....	55
2.3.6.3. Hücre Motilitesi ve Migrasyonu.....	56
2.3.6.4. Nörit Retraksiyonu ve Ekstansiyonu.....	58
2.3.6.5. Sitokinez.....	59
2.3.6.6. Mikrovillus Oluşumu.....	60
2.3.6.7. Hücre Şekil Değişiklikleri.....	61

2.3.7. Rho ve Alt Efektörü Rho-kinaz'ın Diğer Etkileri.....	62
2.3.7.1. Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkiler.....	62
2.3.7.2. Gastrointestinal Sistem Üzerindeki Etkiler.....	63
2.3.7.3. Solunum Sistemi Üzerindeki Etkiler.....	63
2.3.7.4. Santral Sinir Sistemi Üzerindeki Etkiler.....	64
2.3.7.5. Ürogenital Sistem Üzerindeki Etkiler.....	65
2.3.7.6. Göz Üzerindeki Etkiler.....	66
2.3.7.7. Tümör Hücreleri ve Metastaz Üzerindeki Etkiler.....	67
2.3.7.8. İnflamasyon Üzerindeki Etkiler.....	67
2.3.7.9. Endotelial ve Epitelial Hücreleri Üzerindeki Etkiler.....	68
2.3.7.10. Kan hücreleri Üzerindeki Etkiler.....	69
2.3.7.10.1. Trombositler.....	69
2.3.7.10.2. Lökositler.....	69
2.3.7.10.3. Eritrositler.....	70
3. GEREÇ VE YÖNTEM	71
3.1.Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar.....	71
3.2.Kullanılan Deneysel Yöntemler.....	72
3.2.1.Western Blot Yöntemi İçin Kan Örneklerinin Hazırlanması.....	72
3.2.2.Bradford Yöntemi ile Protein Tayini.....	72
3.2.3.Western-Blot Yöntemi ile RhoA ve ROCK-2 Protein Ekspresyonlarının Gösterilmesi.....	73
3.2.4.Eritrosit Deformabilitesinin Değerlendirilmesi	75
3.2.4.1.Lizofosfatidik Asid Uygulanan Seriler.....	76
3.2.4.2.Sfingozin 1 P Uygulanan Seriler.....	76
3.2.5.Eritrositlere Mekanik Stres Uygulanması.....	77
3.2.6.Orak Hücre Anemili Hastalarda Eritrosit Deformabilitesine Rho-kinaz Enzim İnhibisyonunun Etkisinin Değerlendirilmesi	78
3.2.7.RhoA Protein Aktivasyonunun Değerlendirilmesi	78
3.2.8.Eritrosit Oraklaşmasına Rho-kinaz Enziminin Katkısının Değerlendirilmesi.....	79
3.3.Bulguların Değerlendirilmesi	80
4. BULGULAR	81
4.1. Eritrositlerde Membranal ve Sitozolik RhoA Protein Ekspresyonları.....	81

4.2. Eritrositlerde Rho-kinaz (ROCK-2) Enzim Ekspresyonunun Gösterilmesi.....	82
4.3. Lizofosfatidik Asidin Farklı Konsantrasyonlarda Eritrositlerde Zaman Bağımlı Deformabilite Değişikliklerine Etkisinin İncelenmesi.....	83
4.3.1. Lizofosfatidik Asidin Farklı Konsantrasyonlarda Eritrositlerde Zaman Bağımlı Olarak Maksimum Elongasyon İndeksinin Yarıısı Kadar Şekil Değiştirmeye Neden Olan Kayma Kuvvetine (SS 1/2 Kuvvetine) Etkisi.....	83
4.3.2. Lizofosfatidik Asidin Farklı Konsantrasyonlarda Eritrositlerde Zaman Bağımlı Olarak Maksimum Elongasyon İndeks (EI maks) Değerlerine Etkisi.....	85
4.3.3. Lizofosfatidik Asidin Farklı Konsantrasyonlarda Eritrositlerde Zaman Bağımlı Olarak 1.69 Pa Kayma Kuvvetindeki Elongasyon İndeksi (EI 1.69 Pa) Değerlerine Etkisi.....	87
4.4. Eritrositlerde Lizofosfatidik Asit ile Oluşan Deformabilite Değişimlerine Rho-kinaz İnhibitörlerinin Etkisi.....	89
4.4.1. Maksimum Elongasyon İndeksinin Yarıısı Kadar Şekil Değiştirmeye Neden Olan Kayma Kuvveti (SS 1/2 Kuvvetine) Değerlerine Rho-kinaz İnhibitörleri Y-27632 ve Fasudilin Etkileri.....	89
4.4.2. Maksimum Elongasyon İndeksine Rho-kinaz İnhibitörleri Y-27632 ve Fasudilin Etkileri.....	90
4.4.3. 1.69 Pa Kayma Kuvvetindeki Elongasyon İndeksi (EI 1.69 Pa) Değerlerine Rho-kinaz İnhibitörleri Y-27632 ve Fasudilin Etkileri.....	91
4.5. Sfingozin-1 Fosfatın Eritrositlerde Deformabilite Değişikliklerine Etkisi ve Rho-kinaz İnhibitörü Y-27632'nin Olası Katkısı.....	92
4.5.1. Eritrositlerde Maksimum Elongasyon İndeksinin Yarıısı Kadar Şekil Değiştirmeye Neden Olan Kayma Kuvvetine (SS 1/2 Kuvvetine) Sfingozin-1 Fosfatın Etkisi ve Rho-kinaz İnhibitörü Y-27632'nin Olası Katkısı.....	92
4.5.2. Maksimum Elongasyon İndeksi (EI maks) Değerlerine Sfingozin-1 Fosfatın Etkisi ve Rho-kinaz İnhibitörü Y-27632'nin Olası Katkısı	93
4.5.3. 1.69 Pa Kayma Kuvvetindeki Elongasyon İndeksi (EI 1.69 Pa) Değerlerine Sfingozin-1 Fosfatın Etkisi ve Rho-kinaz İnhibitörü Y-27632'nin Olası Katkısının.....	94
4.6. Eritrositlerde Mekanik Strese Bağlı Olarak Azalan Deformabilite Özelliklerine Rho-Kinaz Enzim İnhibitörü Y-27632'nin Etkisi.....	95

4.6.1. 15 Saniye Süre ile 120 Pa Mekanik Strese Maruz Bırakılan Eritrositlerde Rho-Kinaz Enzim İnhibitörü Y-27632'nin Deformabilite Bozukluğuna Etkisi.....	95
4.6.2. 30 Saniye Süre ile 120 Pa Mekanik Strese Maruz Bırakılan Eritrositlerde Rho-Kinaz Enzim İnhibitörü Y-27632'nin Deformabilite Bozukluğuna Etkisi.....	98
4.7. Orak Hücre Anemili Hastalarda Eritrosit Deformabilitesine Rho-kinaz Enzim İnhibitörü Y-27632'nin Etkisi.....	103
4.8. Eritrositlerde Lizofosfatidik Asit (10^{-5} M) İle Farklı Sürelerde İnkübasyonların RhoA Aktivasyonları Üzerine Etkisi.....	107
4.9. 30 Saniye Süre ile 120 Pa Mekanik Strese Maruz Bırakılan Eritrositlerde RhoA Protein Aktivasyonu.....	107
4.10. Orak Hücre Anemili Hastalarda Eritrosit Oraklaşmasına Rho-kinazın Katkısı...	108
5. TARTIŞMA.....	111
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	123
7. KAYNAKLAR.....	125
ÖZGEÇMİŞ.....	152

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Eritropoezis	7
Şekil 2.2. İzotonik ortamdaki bir eritrositin şematik kesiti.....	8
Şekil 2.3. Eritrositlerin periferik kanda mikroskopik görüntüsü.....	9
Şekil 2.4. Eritrosit membranının şematik yapısı.....	10
Şekil 2.5. Eritrosit membran proteinlerinin poliakrilamid jel elektroforezi.....	13
Şekil 2.6. Spektrin bazlı membran iskeletinde spektrin-spektrin dimerleri ve bağlantısal kompleksdeki spektrin aktin ve protein 4.1'in şematik ilişkisi.....	24
Şekil 2.7. Eritrositlerde shear stres ile indüklenen Ca^{2+} -bağımlı mekanizmaların şematik gösterimi.....	41
Şekil 2.8. LORCA Ektasitometre cihazı (I).....	44
Şekil 2.9. LORCA Ektasitometre cihazı (II).....	45
Şekil 2.10. LORCA Ektasitometre cihazı (III).....	45
Şekil 2.11. Rho ailesi küçük GTPazlar.....	48
Şekil 2.12. Rho ailesi GTPazların aktivasyonu.....	50
Şekil 2.13. Düz kas kasılma mekanizmasının Rho/Rho-kinaz tarafından düzenlenmesi.....	55
Şekil 2.14. Rho'nun hücre motilitesindeki rolü.....	58
Şekil 4.1. Eritrosit hücre homojenatlarında RhoA protein ekspresyonlarının Western Blot yöntemiyle gösterilmesi.....	81
Şekil 4.2 Eritrosit hücre homojenatlarında Rho-kinaz (ROCK-2) enzim ekspresyonlarının Western Blot yöntemiyle gösterilmesi.....	82
Şekil 4.3. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvvetine etkisinin gösterilmesi.....	83
Şekil 4.4. 2×10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvvetine etkisinin gösterilmesi.....	84

Şekil 4.5. 5×10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvvetine etkisinin gösterilmesi.....	84
Şekil 4.6. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde maksimum elongasyon indekslerine etkisinin gösterilmesi.....	85
Şekil 4.7. 2×10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde maksimum elongasyon indekslerine etkisinin gösterilmesi.....	86
Şekil 4.8. 5×10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde maksimum elongasyon indekslerine etkisinin gösterilmesi.....	86
Şekil 4.9. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerine etkisinin gösterilmesi.....	87
Şekil 4.10. 2×10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerine etkisinin gösterilmesi.....	88
Şekil 4.11. 5×10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerine etkisinin gösterilmesi.....	88
Şekil 4.12. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin (LPA) 10. dakikada oluşturduğu SS 1/2 indeks değişikliklerine Rho-kinaz inhibitörlerinin olası katkısının gösterilmesi.....	90
Şekil 4.13. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin (LPA) 10. dakikada oluşturduğu EI maks değerlerine Rho-kinaz inhibitörlerinin olası katkısının gösterilmesi.....	91
Şekil 4.14. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin (LPA) 10. dakikada oluşturduğu EI (1.69 Pa) değerlerine Rho-kinaz inhibitörlerinin olası katkısının gösterilmesi.....	92
Şekil 4.15. 10^{-6} M konsantrasyonda 5 dakika sfingozin-1 fosfat (S1P) inkübasyonlarının eritrosit SS1/2 değerlerine etkisi ve buna Rho-kinaz inhibitörlerinin olası katkısının gösterilmesi.....	93

- Şekil 4.16.** 10^{-6} M konsantrasyonda 5 dakika sfingozin-1 fosfat inkübasyonlarının eritrosit EI maks değerlerine etkisi ve buna Rho-kinaz inhibitörlerinin olası katkısının gösterilmesi.....94
- Şekil 4.17.** 10^{-6} M konsantrasyonda 5 dakika sfingozin-1 fosfat inkübasyonlarının eritrosit EI (1.69 Pa) değerlerine etkisi ve buna Rho-kinaz inhibitörlerinin olası katkısının gösterilmesi.....95
- Şekil 4.18.** 15 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki SS1/2 değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin etkisinin gösterilmesi.....96
- Şekil 4.19.** 15 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI maks değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin etkisinin gösterilmesi.....97
- Şekil 4.20.** 15 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (1.69 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin etkisinin gösterilmesi.....97
- Şekil 4.21.** 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki SS1/2 değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi.....99
- Şekil 4.22.** 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI maks değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi.....99
- Şekil 4.23.** 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (1.69 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi.....100
- Şekil 4.24.** 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (3,00 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi.....100
- Şekil 4.25.** 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (5,33 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi.....101

Şekil 4.26. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (9,5 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi.....	101
Şekil 4.27. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (16,88 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi.....	102
Şekil 4.28. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (29,92 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi.....	102
Şekil 4.29. Sağlıklı donör (Kontrol) ve hasta kanlarında eritrosit deformabilitelerinin SS1/2 kuvvetleri ile karşılaştırılması.....	103
Şekil 4.30. Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin Orak Hücreli Hastalarda SS1/2 kuvvetlerine etkisinin gösterilmesi.....	104
Şekil 4.31. Sağlıklı donör (Kontrol) ve hasta kanlarında eritrosit deformabilitelerinin maks değerleri ile karşılaştırılması.....	105
Şekil 4.32. Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin Orak Hücreli Hastalarda EI maks değerlerine etkisinin gösterilmesi.....	105
Şekil 4.33. Sağlıklı donör (Kontrol) ve hasta kanlarında eritrosit deformabilitelerinin EI 1,69 Pa değerleri ile karşılaştırılması.....	106
Şekil 4.34. Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin Orak Hücreli Hastalarda EI 1,69 Pa değerlerine etkisinin gösterilmesi.....	106
Şekil 4.35. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde RhoA protein aktivasyonuna etkisinin gösterilmesi.....	107
Şekil 4.36. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerde RhoA protein aktivasyonunun gösterilmesi.....	108
Şekil 4. 37. Orak Hücre Anemili hasta eritrositlerinde Na- Metabisülfid ile oraklaşmanın 15. dakikasında Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin oraklaşmaya etkisinin gösterilmesi.....	109
Şekil 4. 38. Orak Hücre Anemili hasta eritrositlerinde Na- Metabisülfid ile oraklaşmanın 30. dakikasında Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin oraklaşmaya etkisinin gösterilmesi.....	109

- Şekil 4. 39.** Orak Hücre Anemili hasta eritrositlerinde Na- Metabisülfid ile oraklaşmanın 60. dakikasında Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin oraklaşmaya etkisinin gösterilmesi.....110
- Şekil 4. 40.** Orak Hücre Anemili hasta eritrositlerinde Na- Metabisülfid ile oraklaşmanın 90. dakikasında Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin oraklaşmaya etkisinin gösterilmesi.....110

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADP: Adenozin Difosfat

ATP: Adenozin Trifosfat

BFU-E: Bursa Forming Unit Erythroid

Ca²⁺-Mg²⁺ ATP az: Kalsiyum Magnezyum Adenozin Trifosfataz

CFU-GEMM: Colony Forming Unit; Koloni Oluşturan Ünit-Granulosit Eritroid

Monosit Megakaryosit

CFU-E: Colony Forming Unit-Erythroid

Cl⁻: Klor

DAG: Diaçilgliserol

2,3-DPG: 2,3-difogliserat

EPO: Eritropoeitin

EDTA: Etilen Daimin Tetra Asetikasıit

ERM: Erzin-Radiksin-Moezin

fL: Femtolitre

FLD: Fosfolipaz D

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein

GTP az: Guanozin Trifosfataz

GDP: Guanin Difosfat

GTP: Guanozin Trifosfat

GSH: İndirgenmiş Glutatyon

GSSG: Okside Glutatyon

GAP: GTP'az Aktive Edici Protein

GDI: GTP'az Ayrıştırıcı İnhibitör

GEF: Guanin Nükleotid Değişirici Faktör

HMG-KoA-redüktaz: Hidroksi Metil Glutaril Koenzim A

Hb: Hemoglobin

Hct: Hematokrit

HS: Kaltsal Sferositoz

HE: Herditer Eliptositoz

HO: Kalıtsal Ovalositoz
HPP: Kalıtsal Piropoikilositoz
HSt: Kalıtsal stomatositoz
HCO₃⁻: Bikarbonat
H₂O₂: Hidrojen Peroksid
HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü
IP₃: İnozitol-3-Fosfat
ICAM-4: İntrasellüler Adhezyon Molekül-4
İGF-1: İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü
LPA: Lizofosfatidik Asid
LCAT: Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz
LORCA: Laser Optical Rotational Cell Analyzer
MLCK: Myozin Hafif Zincir Kinaz Enzimini
m-RNA: Mesajcı RNA
MHZ: Miyozin Hafif Zinciri
MBS: Miyozin Bağlayıcı Alt Ünit
NADP: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Hidrojen
Na-K ATPaz: Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz
NO: Nitrik Oksit
O₂⁻: Süperoksit
OEHK: Ortalama Eritrosit İçi Hemoglobin Konsantrasyonu
OD: Otozomal Dominant
OD: Otozomal Resesif
PS: Fosfatidilserin
PIP2: Fosfatidilinozitol 4,5-Difosfat
PAS: Periyodik Asit-Schiff
PH: Plekstrin Homoloji
PKN: Protein kinaz N
PRK: Protein kinaz
PI5K: Fosfatidil İnozitol 5'kinaz
PIP₂: Fosfatidil İnozitol 4,5 Bifosfat

PDE: Fosfodiesterazlar
PKG: Protein Kinaz G
PVP: Polivinilprolidon
PMNL: Polimorfonükleer Lökositler
PAI-1: Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
RNA: Ribonükleik Asit
ROCK: Rho-kinaz
ROK: Rho-kinaz
sAMP: Siklik Adenozin Trifosfat
sGMP: Siklik Guanozin Trifosfat
sGMP: Siklik Guanozin Monofosfat
S1P: Sfingozin 1 fosfat
Rho-GEF: Rho Guanin Nükleotid Değiştirici Faktör

ÖZET

İnsan Eritrositlerinde Rho/Rho-Kinaz Sinyal İleti Mekanizmasının Fonksiyonel Önemi

Eritrositlerin mikrokapillerlerden geçerek oksijeni taşıyabilmeleri onların deformabilite yetenekleri sayesinde olmaktadır. L-arginin/NO yolağı, sAMP ve sGMP, çeşitli protein kinazlar gibi birtakım sinyal yollarının ve ikinci mesajcıların eritrosit deformabilitesinde rol aldıkları bilinmektedir. Eritrosit deformabilitesinin, kaıtsal eritrosit membran hastalıklarında, orak hücre anemisi ve talasemiler gibi hemoglobinoopatilerde de azaldığı bildirilmektedir. Ancak düz kas ve kas olmayan hücrelerde hücre şekil değişiklikleri, aktin hücre iskeleti reorganizasyonu gibi olaylara katkısı olan Rho/Rho-kinaz yolağının eritrositlerdeki fonksiyonel önemi tam olarak ortaya konmamakla birlikte eritrositlerin deformabilite bozukluğuna katkısı da bilinmemektedir. Bu çalışmada, eritrositlerde Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizmasının fonksiyonel önemini ve orak hücre anemisinde deformabilite bozukluğuna katkısını inceledik.

Bu amaçla sağlıklı donör eritrositlerinde, RhoA ve Rho-kinaz (ROCK-2) enzim ekspresyonları Western-blot yöntemi ile araştırıldı. Rho aktivatörü olduğu bilinen lizofosfatidik asit (LPA, 10^{-5} M) ve sfingozin 1 fosfat (S1P, 10^{-6} M) varlığında ve yokluğunda, bazal ve mekanik stres ile indüklenmiş şartlarda ROCK enzim inhibitörleri Y-27632 ve fasudil'in (10^{-7} - 10^{-4} M) eritrositlerin deformabilitelerine etkisi LORCA ektasitometre ile değerlendirildi. İlaveten, LPA ve mekanik stres deneylerinde RhoA aktivasyonları, kolorimetrik G-LISA aktivasyon kiti ile ölçüldü. Ayrıca orak hücre anemili hastaların eritrositlerinin, Y-27632 (10^{-7} - 10^{-4} M) varlığında ve yokluğunda deformabiliteleri ölçüldü ve sodyum-metabisülfid ile indüklenen eritrosit oraklaşması üzerine Y-27632'nin etkisi, mikroskopik fotoğraflama yöntemi ile hücre sayımı yapılarak değerlendirildi.

Western-blot analizi ile eritrositlerin RhoA ve ROCK-2 proteinlerini eksprese ettiğini gösterildi. LPA (10^{-5} M) eritrosit deformabilitesini bozarken, GTP-RhoA düzeylerini azalttı. ROCK inhibitörleri, Y-27632 ve fasudil (10^{-7} - 10^{-4} M), ise tek başlarına deformabiliteyi bozarken, LPA'nın deformabilite bozucu etkisine ilave bir katkı yapmadı. Bir başka membran lipidi S1P (10^{-6} M) eritrosit deformabilitesini değiştirmedi. Subhemolitik mekanik stres, eritrosit deformabilitesini ve RhoA protein aktivasyonlarını azalttı. Ancak mekanik stres ve ROCK inhibitörleri kombinasyonu ilave bir bozukluk oluşturmadı. Orak hücre anemili donörlerde ise eritrosit deformabiliteleri, sağlıklı donörler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak azaldı ancak, Y-27632, orak hücreli eritrositlerin deformabilite değerlerinde herhangi bir değişiklik oluşturmadı. Öte yandan, hasta eritrositlerinin sodyum metabisülfid ile indüklenen oraklaşma oranlarını 10^{-7} M konsantrasyonda Y-27632, 30. dakikada arttırırken daha yüksek konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde (15, 60, 90. dakikalarda) oraklaşma yüzdelerini değiştirmedi.

Bulgularımız, indirekt olmakla beraber, Rho/ROCK yolağının insan eritrositlerinde deformabiliteye katkı sağlayabileceğine işaret etmektedir. Diğer taraftan ROCK enzim inhibisyonunun, orak hücre anemisi olan hastalardan elde edilen eritrositlerin deformabilitesine ve oraklaşma oranlarına etkisinin olmadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Eritrosit, Rho/Rho-kinaz sinyal ileti yolağı, Y-27632, Fasudil, Deformabilite, Orak Hücre Anemisi

ABSTRACT

The Functional Significance of Rho/Rho-Kinase Signal Transduction Mechanism in Human Erythrocyte

Erythrocyte deformability allows the passage of erythrocytes through microcapillaries to carry the oxygen. It has been known that several pathways and second messengers, namely L-arginin-NO pathway, cAMP, cGMP and various protein kinases take roles in erythrocyte deformability. Erythrocytes deformability is known to be decreased in hereditary erythrocyte membrane disorders and hemoglobinopathies such as sickle cell anemia and thalassemia. However, functional significance of Rho/Rho-kinase pathway, which contributes cell shape changes and the reorganization of actin cytoskeleton in both smooth muscle and non-muscle cells, has yet to be explored in erythrocytes. In addition, there is no information about the contribution of this pathway to erythrocyte deformability. In this study, we aimed to investigate the functional significance of Rho/Rho-kinase signal transduction mechanism in human erythrocyte and the contribution of deformability in sickle cell anemia.

For this purpose, the expressions of RhoA and Rho-kinase (ROCK-2) proteins in erythrocytes from healthy donors were detected by Western-blotting. Influences of Rho-kinase inhibitors, fasudil and Y-27632 (10^{-7} - 10^{-4} M) on erythrocyte deformability was determined by LORCA ektacytometry in the presence or absence of known Rho activators lysophosphatidic acid (LPA, 10^{-5} M, 1-15 min) and sphingosine 1-phosphate (S1P, 10^{-6} M, 5 min) also in basal and mechanical stress induced conditions. The activation of RhoA in LPA and mechanical stress series were evaluated by colorimetric G-LISA activation assay kit. On the other hand, the deformability of sickle cells was tested both in the presence and absence of Y-27632 (10^{-7} - 10^{-4} M). The effect of Y-27632 on erythrocyte sickling rate induced with sodium-metabisulfide was tested by counting the cells by microscopic photography.

RhoA and Rho-kinase (ROCK-2) protein expressions were demonstrated by Western-blotting. LPA (10^{-5} M) reduced the deformability with the concomitant RhoA-GTP reduction. Rho-kinase inhibitors Y-27632 and fasudil also decreased deformability, but had no effects on LPA-induced reduction of deformability. S1P, another member of membrane lipids, did not alter the deformability. Moreover, reduction in erythrocyte deformability and RhoA inactivation were induced by subhemolytic mechanical stress but preincubation with ROCK inhibitors did not change the effect of mechanical stress.

Moreover, reduction in erythrocyte deformability and RhoA inactivation were induced by subhemolytic mechanical stress but preincubation with ROCK inhibitors did not change the effect of mechanical stress.

Erythrocyte deformability was significantly decreased in sickle cell anemias when compared with healthy donors. However, Y-27632 had no effect on the deformability of sickle cells. On the other hand, Y-27632 (10^{-7} M) increased the sickling rate induced by sodium-metabisulfide at 30 minute but had no effect with higher concentrations at various time periods (15, 60, 90 min).

Our findings, although indirectly, imply that Rho/Rho-kinase pathway could contribute deformability in human erythrocytes. On the other side, there is no effect of Rho-kinase enzyme inhibition on the deformability and sickling rate of sickle cells.

Key Words: Erythrocyte, Rho/Rho-kinase Signal Transduction Pathway, Y-27632, Fasudil, Deformability, Sickle Cell Anemia

1. GİRİŞ

İnsanlarda ve diğer canlılarda yaşamsal fonksiyonların devamlılığı için en önemli ihtiyaçlardan biri oksijendir. Oksijen solunum havası ile alınarak kapillerler yolu ile kana geçer ve hemoglobine bağlanarak eritrositler tarafından dokulara ulaştırılır. Eritrositler bu anlamda oksijen taşımak için özelleşmiş hücrelerdir. Yaklaşık 7-8 μ çapında, yuvarlak, ortalarında santral bir solukluk bulunan ve bikonkav diskoid görüntüde olan bu kan hücreleri, çekirdek, mitokondri ve ribozom gibi organelleri içermezler. Söz konusu sitoplazmik organellere sahip olmayan eritrositler protein sentezi yapamaz, mitokondri ile ilişkili oksidatif reaksiyonları gerçekleştiremez ve mitoza uğrayamazlar. Böylece eritrositler, protein ve elektrolitleri çevreleyen basit bir membrandan ibaret olarak tanımlanabilirler. Sitoplazmik proteinlerin % 95'inden fazlasını hemoglobin (Hb) oluşturur. Eritrositlerin sahip oldukları bikonkav disk şekli, fonksiyonlarını sürdürebilmelerini sağlar. Bu özel şekil sayesinde, hücre yüzey alanının hacmine oranı mümkün olan en yüksek değere ulaşmakta ve böylece gaz transferi kolaylaşmaktadır. Ayrıca bikonkav disk yapısının, küreye göre şekil değiştirme yeteneğinin (deformabilitesinin) daha fazla oluşu eritrositlerin mikrodolaşımda optimal hareketlerinin sağlanmasına katkıda bulunmaktadır (1,2).

Eritrositlerin normal fizyolojik durumlarda söz konusu deformabilite özelliği mikrosirkülasyonda membran yapısının bozulmasını önler. Eritrositler, yaşamları boyunca dokulara oksijen taşıma sırasında yapısal bozukluğa uğramadan, maruz kaldıkları mekanik zorlamaların üstesinden gelmek zorundadırlar. Yapılan çalışmalar, eritrositlerin ciddi deformasyonlardan korunmalarında, hücre yüzey alanı/volüm oranının, intrasellüler hemoglobin konsantrasyonunca oluşturulan stoplazmik viskozitenin ve membrana ait deformabilite yeteneğinin en önemli faktörler olduğunu göstermişlerdir (2).

Bu özellikleri sayesinde eritrositler kendi çaplarından çok daha küçük çaplı kapiller dolaşımda rahatlıkla dolaşarak dokuların oksijen ihtiyacını karşılayabilmektedir. Eritrosit membran yapısında bulunan membran lipidleri ve

proteinleri bikonkav disk formunda hücre şeklinin korunmasına ve hücrenin şekil değiştirme yeteneğine önemli bir katkı sağlamaktadır (1). Eritrositlerin deformabilite özellikleri birçok faktörün etkisiyle değişikliğe uğrayabilir. Söz konusu değişim deneysel olarak sağlanabildiği gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda da gerçekleşebilmektedir.

Kalıtsal sferositoz, kalıtsal eliptositoz ve kalıtsal stomatositoz gibi kalıtsal eritrosit membran hastalıklarında, orak hücre anemisi ve talasemiler gibi hemoglobinopatiler ile diyabet ve hipertansiyon gibi sistemik hastalıklarda eritrosit deformabilitesinin azaldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (2, 3, 4, 5, 6).

Eritrosit membranı ile ilişkili enzimlerin de eritrosit şekil ve deformabilitesinin düzenlenmesinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Eritrosit deformabilitesine katkı sağlayan hücre içi sinyal yollarıyla ilgili henüz çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda L-arginin: NO yolağı, aktin, α ve β spektrin, addusin ve demantin gibi membran proteinleri, Na-K ATPaz Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPaz gibi iyon pompaları, sAMP ve sGMP gibi ikincil ulaklar, eritrosit deformabilitesine dolaylı ya da dolaysız katkı sağlamaktadırlar (1, 7, 8, 9, 10). Diğer taraftan bazı protein kinazların, fosfoferin, fosfotreonin ve fosfotirozin bağlarını oluşturmak suretiyle membran proteinlerini fosforilleyerek membran deformabilitesinin azalmasına neden olabileceği tahmin edilmektedir (10). Ancak yeni bir sinyal ileti mekanizması olan Rho/Rho-kinaz yolağının eritrosit hücre fonksiyonlarına olan katkısı henüz araştırılmamıştır.

Diğer taraftan hücre içi sinyal ileti mekanizmalarında rol oynayan G proteinleri (GTPazlar) heterotrimerik G proteinleri ve küçük G proteinleri olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Heterotrimerik G proteinleri hücre membranında bulunan ve hücre içine sinyal iletiminde rol alan moleküler yapılardır. Küçük G proteinleri ise düşük molekül ağırlığına sahip (20-40 kDa) tüm ökaryotik hücrelerde mevcut olan bir grup proteindir. Ras süperfamilyasına ait bu proteinler Ras, Rho/Rac/Cdc 42, Rab, Sar1/Arf ve Ran protein alt sınıflarını içermektedir (11, 12, 13).

Küçük G proteinleri birçok hücrel fonksiyonu regüle ederler. Örneğin Ras ailesine ait proteinlerin, gen ekspresyonunu, Rho proteinlerinin (Rho/Rac/Cdc42) hücre iskeleti reorganizasyonunu ve gen ekspresyonunu, Rab ve Sar1/Arf proteinlerinin intrasellüler vezikül trafiğini ve Ran proteinlerinin ise G₁, S ve G₂ fazlarında nükleostoplazmik transport ile M fazındaki mikrotübül organizasyonunu düzenlediği bildirilmiştir (14).

Rho ailesi proteinleri farklı gruplarda katagorize edilen yaklaşık 22 tane üyeye sahiptir. Bunlar, Rac (Rac1-3, RhoG), Cdc42 (Cdc42, TC10, TCL, Chp, Wrch-1), Rho (RhoA, RhoB, RhoC), RhoD (RhoD ve Rif), RhoH/TTF, RhoBTB (RhoBTB1 ve RhoBTB2), Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE) ve Miro (Miro-1 ve Miro-2)'dur (15).

RhoA, vücutta en fazla eksprese edilen ve en çok çalışılan Rho proteini alt tipidir. Rho A, alt efektörü Rho-kinaz ile etkileşerek gerek düz kaslı yapılarda gerekse kas olmayan hücrelerde birçok hücrel fonksiyona aracılık etmektedir (16).

Rho/Rho-kinaz yolağının stres fibrillerinin oluşumu, sitokinez ve hücre migrasyonu, aktin hücre iskeleti reorganizasyonu, proliferasyon, hipertrofi, hücre şekil değişikliği, trombosit agregasyonu, lenfosit ve fibroblast adezyonu, düz kas kasılması, gibi değişik hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (17, 18, 19). Öte yandan vas deferens, gastrik fundus, üreter ve safra kesesinin fizyolojik fonksiyonlarında ve bunlara ilaveten ağrı iletiminde ve oluşumunda, ayrıca epileptogeneziste Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizmasının rolünün olduğu gösterilmiştir (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26). Bunun yanısıra Rho/Rho-kinaz yolağının vazokonstrüksiyon, hipertansiyon, koroner arter spazmı, kanser invazyonu, kalp ve karaciğer gibi organlarda iskemi-reperfüzyon hasarlanması, akciğerde doku hasarlanması gibi patolojik süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir (27, 28, 29, 30, 31, 32, 33).

Birçok dokuda aracılık ettiği hücrel fonksiyonlar ve neden olduğu patolojik durumların ortaya konduğu bu sinyal ileti mekanizmasının, ek olarak kanın şekilli elemanlarından trombosit, nötrofil ve lenfositlerin kemotaksisinde ve hücre membranı

şekil değişikliklerinde buna ilaveten mast hücrelerin salgılama fonksiyonlarında da kritik rolleri olduğu bildirilmiştir (34, 35, 36, 37).

Öte yandan Rho proteinlerinin eritrositlerde de sitozolik ve membranal fraksiyonlarda eksprese edildiği ve sitozolik fraksiyondaki Rho A'nın guanozin trifosfat (GTP) ile bağlanarak membrana transloke olabildiği gösterilmiştir (38). Ancak, RhoA proteininin alt efektörü olan Rho-kinaz enziminin eritrositlerde ekspresyonu ve Rho/Rho-kinaz yolağının eritrositlerdeki fizyolojik ve patolojik olaylardaki katkısı henüz net olarak ortaya konmamıştır.

Bundan dolayı, bu çalışmada, insan eritrositlerinde Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizmasının fonksiyonel önemini incelemeyi amaçladık. Bu amaçla öncelikle sağlıklı donör kanlarından izole edilen eritrositlerde RhoA ve Rho-kinaz (ROCK-2) enzim ekspresyonlarını Western-blot yöntemi ile inceledik. Ayrıca, Rho/Rho-kinaz yolağının eritrosit fonksiyonlarına katkısını lizofosfatidik asit ve sfingozin 1 fosfat varlığında ve yokluğunda, mekanik stres ile indüklenmiş şartlarda ve kalıtsal bir eritrosit hastalığı olan orak hücre anemisinde incelemeyi amaçladık. Bunun için gerek sağlıklı donörlerden gerekse orak hücre anemili hastalardan kan alarak eritrositler izole edildi. Daha sonra Rho-kinaz enzim inhibitörleri Y-27632 ve fasudil'in söz konusu koşullarda eritrositlerin şekil değiştirebilme yetenekleri (deformabiliteleri) üzerine etkisi bir ektasitometre kullanarak çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Bunların dışında, lizofosfatidik asit ve mekanik stres uygulanan deneylerde Rho-GTP aktivasyon deneyleri yapılarak RhoA protein aktivasyonları ölçüldü. Öte yandan bir diğer deney grubunda ise orak hücre anemili hastalardan elde edilen eritrositlerde oraklaşma yüzdeleri sodyum-metabisülfid ile oraklaşma testinde bazal şartlarda ve Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632 varlığında değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Eritrositler

Ortalama bir kişinin kilogram başına yaklaşık 70 ml (70ml/kg) veya 70 kg.lık birinin yaklaşık 5 lt. kanı vardır. Aşağı yukarı kan volümünün % 50-60'ı sıvı geri kalanı ise hücrelerden oluşmaktadır. Plazma adı verilen sıvı komponentin yaklaşık % 90'ı sudur. Geri kalan % 10'u iyonlar, glikoz, aminoasitler ve diğer metabolitler, hormonlar ve çeşitli proteinlerden oluşur. Serum, plazma koagülasyon faktörleri ve fibrinojenin uzaklaştırılmasından sonra geriye kalan kısımdır. Kan hücreleri eritrositler (kırmızı kan hücreleri), lökositler (beyaz kan hücreleri), ve trombositler (kan pulcukları) olarak ayrılabilir (39).

Eritrositler ilk kez 17. yüzyılda Leeuwenhoek tarafından tanımlanmışlardır. Aynı yüzyılda Lemery kanda demirin varlığını gösterdi. 1851 yılında ise Funke hemoglobini kristal formunda kandan izole etti. 20. yüzyılın sonlarına doğru ise eritrosit hemoglobininin oksijen taşımada görevli olduğu bildirildi. Eritrositler diğer adı ile alyuvarlar temel görevi solunum gazlarının değişimi olan basit yapıları derecede özelleşmiş hücrelerdir. Ortalama hacimleri yaklaşık 80-100 femtolitre (fL) ($1\text{fL}=10^{-15}$ litre) arasında, ortalama yüzey alanı $140\ \mu\text{m}^2$ olan eritrositler kemik iliğinde üretilirler ve periferik dolaşıma katılmadan önce çekirdeklerini kaybederler (1). Diğer organelleri de dolaşımda birkaç gün içinde kaybolur. Çekirdek, mitokondri, ribozomlar gibi sitoplazmik organellere sahip olmayan eritrositler protein sentezi yapamaz, mitokondri ile ilişkili oksidatif reaksiyonları gerçekleştirmez ve mitozu uğrayamazlar. Böylece eritrositler, protein ve elektrolitleri çevreleyen basit bir membrandan ibaret olarak tanımlanabilirler. Sitoplazmik proteinlerin % 95'inden fazlasını hemoglobin (Hb) oluşturur. Eritrositlerin sahip olduğu bikonkav disk şekli, fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için çok uygundur. Bu özel şekil sayesinde, hücre yüzeyinin hacmine oranı mümkün olan en yüksek değere ulaşmakta ve böylece gaz transferi kolaylaşmaktadır. Ayrıca bikonkav disk yapısının küreye göre şekil değiştirme

yeteneğinin daha fazla oluşu eritrositlerin mikrodolaşımında optimal hareketlerinin sağlanmasına katkıda bulunmaktadır (2).

Eritrositler, oksijeni akciğerlerden dokulara taşır ve dokulardan da karbondioksiti dışarı atılacağı akciğere geri getirirler. Toksik bir madde olan oksijeni (O₂) taşıyabilmelerine karşın diğer hücrelerden farklı olarak bu maddeyi enerji üretiminde kullanamazlar. Hücre içi potasyum konsantrasyonunu yüksek sodyum konsantrasyonunu ise düşük tutmak zorundadırlar (bu durum enerji kullanımını gerektirir).

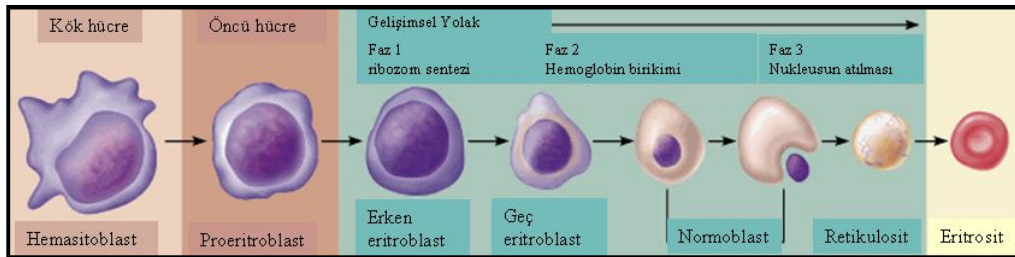
Eritrositler kanda en çok görünen hücrelerdir. Normal eritrosit sayısı yaklaşık mikrolitrede 4,5-6 milyondur. Eritrosit ölçümünde kullanılan parametreler: hemoglobin (gr/dl), hematokrit (Hct) veya eritrosit volümü (vücuttaki total kan hacmi içindeki eritrosit hacminin yüzdesi) ve eritrosit sayısı (milyon/ml) cinsindedir.

Ortalama 120 gün ömrü olan eritrositlerin hergün yaklaşık % 1'i yenilenir. Genç eritrositler ribonükleik asit (RNA) içermeleri nedeniyle fark edilirler. Metilen mavisi gibi özel boyalarla retikülin adı verilen RNA agregatları görülebilir. Bu agregatları içeren genç eritrositlere retikülosit adı verilir ve çevresel kan yaymalarında retikülositler net olarak ayırt edilmeyebilir ancak bu hücreler yaşlı eritrositlere göre biraz daha koyu mavi boyanırlar. Bu görünüm polikromazi olarak adlandırılır (39).

2.1.1. Eritrosit Yapımı (Eritropoezis)

Dolaşımdaki eritrositler ve kemik iliğindeki eritroid öncüller dahil olmak üzere eritroid hücrelerin toplamına eritron adı verilir (39). Erişkin ve sağlıklı bir insanda eritropoezis kemik iliğinde olur. Eritroid öncüller CFU-GEMM (Colony Forming Unit) [Koloni oluşturan ünit-Granulosit Eritroid Monosit Megakaryosit]'den köken alırlar. Eritroid diziye yönelmiş en erken progenitör hücre “bursa forming unit erythroid” dir (BFU-E). Bunu “colony forming unit-erythroid” CFU-E takip eder. Eritrosit öncü hücrelerinin kemik iliğinde ilk tanınanı proeritroblasttır. Proeritroblastın stoplazması

bazofilik olup, çekirdek ince bir kromatin ağı sahiptir. Çekirdekte bir veya daha fazla sayıda çekirdekçik bulunur. Elektron mikroskopunda sitoplazmada bol miktarda poliribozom, mitokondri, endoplazmik retikulum ve ferritin molekülleri olduğu gösterilmiştir. Her bir proeritroblasttan iki adet bazofilik eritroblast oluşur. Bunların sitoplazmaları bazofilik olup, çekirdek kromatin ağı kabalaşmış ve çekirdekçikler kaybolmuştur. Her bir bazofilik eritroblasttan bölünme yolu ile 4 adet polikromatofilik eritroblast oluşur. Bu hücrelerde kromatin kümeler halinde toplanmış, sitoplazma bazofilisini kaybetmeye başlamıştır. Sitoplazma çoğu kez polikromatofilik olarak boyanır. Hemoglobın sentezi bu aşamada başlar. Polikromatofilik eritroblastlar oluşur. Daha sonra sitoplazma asidofilik olup çekirdek piknotik hale gelir ve ortokromatofilik normoblast oluşur. Olgunlaşmaya devam eden hücrelerden çekirdek dışarı atılır ve hücrede az miktarda RNA artıkları kalır. Bu dönemdeki hücelere de retikülosit denir. Retikülositler yaklaşık 3 gün kemik iliğinde ve 1 gün periferik kanda kaldıktan sonra 4. gün olgun eritrosite dönerler. Retikülositler normal boyama yöntemleri ile görülmezler. Ancak birilliant krezil mavisi gibi supravital boya yöntemleri ile tanınabilirler. Normal retikülosit değeri % 0.02-2 arasında değişir. Sonuç olarak her bir proeritroblasttan ortalama 16 adet eritrosit oluşur. Eritropoeze etki eden maddelere bakacak olursak normal bir eritropoez için 4 önemli maddeye gereksinim vardır. Bunlar eritropoetin, demir, vitamin B12 ve folik asittir. Bunlara ilaveten vitamin B6, pantotenik asit, nikotinik asit, E vitamini, bakır, kobalt, çinko gibi maddelerde eritropoeze katkıda bulunur (40).



Şekil 2.1. Eritropoezis (41)

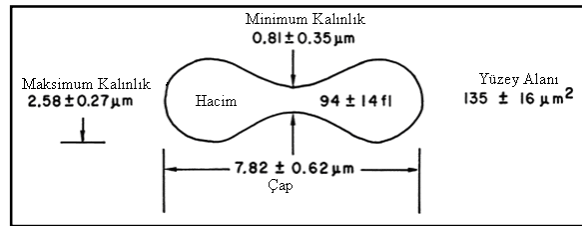
Eritropoezis, Eritropoetin (EPO) tarafından kontrol edilen bir süreçtir. 1950’de Erslev tarafından “kırmızı hücre stimüle edici faktör” olarak ilk kez tanımlanmıştır.

Yapısı % 60 aminoasid, % 40 karbonhidrattan oluşmaktadır. EPO geni kromozom 7 üzerinde yer alır. EPO, böbrek peritübüler hücreleri ve karaciğer hepatositlerinden sentezlenir. Böbrekte sentezi daha fazladır. EPO mRNA'sı böbrek, karaciğer, intestinal hücreler, nöronlar, kardiyomiyositler ve endotel hücrelerinde gösterilmiştir. EPO etkisini eritropoetik hücreler üzerinde gerçekleştirir. Bu eritroid seri progenitör hücreleri BFU-E, CFU-E ve eritrosit prekürsor hücreleri olan proeritroblastlar ve eritroblastlardır.

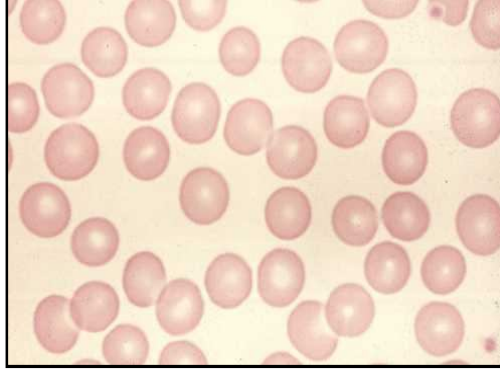
2.1.2. Eritrositin yapısal özellikleri

2.1.2.1. Eritrositin şekli

Eritrositler yaklaşık 7-8 μm çapında, bikonkav disk şeklindedir. Bikonkav disk şekli eritrositlerin kapiller ve küçük kan damarlarından geçişini kolaylaştırır. Bikonkav şekil eritrositlerin yüzey hacim oranının yüksek olmasını sağlar; bu şekilde gaz alışverişi kolaylaşır. Kapillerlerden geçebilecek esneklikte olmaları ve yüksek kan basınçlarında kan akımının yol açacağı yüksek akım streslerine (shear stres) karşı dayanıklı olmaları gereklidir. Mikroskop altında incelendiğinde eritrositler daire şeklinde görülür; merkezlerinde hücre çapının yaklaşık 1/3'ü genişliğinde soluk bir alan (merkezi solukluk) bulunur.



Şekil 2.2. İzotonik ortamdaki bir eritrositin şematik kesiti (Kaynak 1'den dan modifiye edilerek alınmıştır).

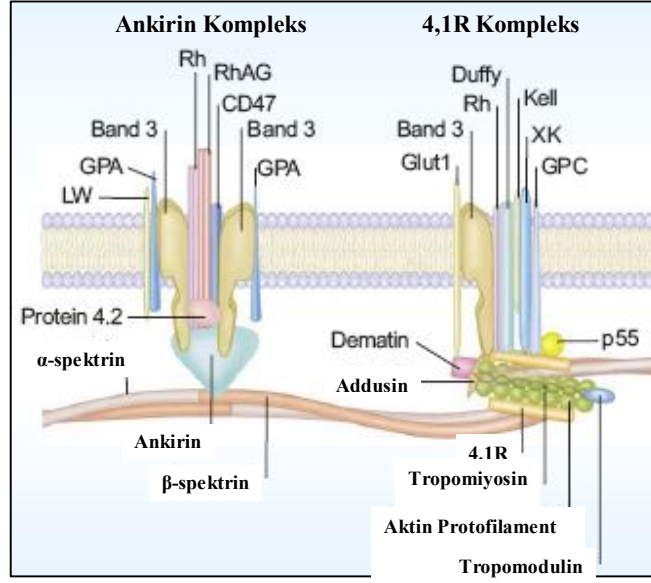


Şekil 2.3. Eritrositlerin periferik kanda mikroskopik görüntüsü (42).

2.1.2.2. Eritrosit hücre iskeleti ve membran yapısı

2.1.2.2.1. Membran Yapısı

Eritrositler dolaşımında kaldıkları süre içerisinde yapısal bütünlüklerini devam ettirirken birçok kez reversibl deformasyonlara maruz kalırlar. Eritrosit membranı oldukça elastik bir yapıya sahiptir. Maruz kaldığı sıvı streslerine hızlı cevap verir ve yapısal direnç anlamında çelikten daha güçlüdür. Bir eritrosit kendi boyunun % 250'si kadar uzayabiliyorken (lineer ekstansiyon) yüzey hacmindeki % 3-4'lük bir artış hücre lizisine yol açar. Bu nedenle artmış eritrosit deformasyonunun en önemli özelliği membran yüzey alanı artışlarını içermemesidir. Membranın bu özelliği kolesterol ve fosfolipidlerden oluşan membran lipidlerinin iskelet proteinleri ile kompozisyonu ile sağlanmaktadır. Birçok hücre iskeleti proteininin anyonik fosfolipidlerle direkt etkileşmesi hücre iskelet ağının lipid tabakaya bağlanması ile olur.



Şekil 2.4. Eritrosit membranının şematik yapısı (2).

2.1.2.2.2. Membran lipidleri

Lipid tabaka ağırlık olarak eşit miktarlarda kolesterol ve fosfolipidden oluşmaktadır. Kolesterol membranda iki lipid tabaka arasında eşit olarak dağılırken, membran yapısındaki dört farklı major fosfolipid asimetrik olarak yerleşmiştir. Eritrosit membran lipidlerini esterleşmemiş kolesterol (% 47.1), fosfolipidler (% 49.5) ve glikolipidler oluşturur. Membran fosfolipid içeriğinin büyük kısmını fosfatidilkolin (% 30), sfingomyelin (% 25), fosfatidiletanolamin (% 28) ve fosfatidilserin (PS) (% 14) oluştururken, kalan % 2-3'lük kısmı fosfatidik asit, fosfatidilinozitol 4-fosfat ve fosfatidilinozitol 4,5-difosfattan ibarettir. Bu fosfolipidler membranın iki lipid tabakasında asimetrik olarak yerleşmiş olup, kolin içeren nötral fosfolipidler olan fosfatidilkolin ve sfingomyelinin % 75'inden fazlası lipid tabakasının dış katmanında bulunur. Negatif yüklü fosfolipidler olan fosfatidiletanolaminin % 80'i ve fosfatidilserinin tümü ise iç tabakada yerleşmiştir. Yağ asitlerinin uzunluğu ve doymuşluk derecesi zar akışkanlığını belirleyen iki önemli faktördür. Membran lipidlerinin ikinci önemli kısmını oluşturan kolesterol, fosfolipidlerle etkileşerek ortak yapının ara jel haline dönüşmesini sağlar. Kolesterol, membran akışkanlığını olumsuz yönde etkileyen lipid komponentidir (1).

Birçok farklı tipte enerji-bağımlı ve enerji-bağımsız fosfolipid transport proteini fosfolipid asimetrisinin oluşması ve devamlılığı ile ilişkilendirilmiştir. Bunlardan bazıları olan “Flippase” lar fosfolipidleri lipid katmanın dış tabakasından iç tabakasına doğru hareket ettirirken, “Floppase” lar bunun tam tersi yönde konsantrasyon gradiyentine karşı enerji bağımlı bir şekilde fosfolipid hareketi sağlarlar. “Scramblase”ler ise fosfolipidleri konsantrasyon gradiyenti yönünde enerji gerektirmeden çift yönlü hareket ettirirler. Son yapılan çalışmalar kolesterol ve sifingolipilerle zenginleştirilmiş lipid tabakasının flotillin, stomatin, G proteini içeren membran proteinleri ve kırmızı hücre membranındaki β adrenerjik reseptörlerle ilişkili olduğunu göstermiştir (43, 44, 45, 46).

Membran fosfolipidlerinin asimetric dağılımı, fosfatidil serin ve fosfoinositidlerin membran iç yaprağına özel lokalizasyonları birçok fonksiyonla ilişkilidir. Makrofajlar dış yüzlerinde PS bulunan eritrositleri tanıdığı ve fagosite ettiğinden, bu lipidin membran iç yaprağında hapsedilmesi başta dalak olmak üzere retikuloendotelial sistem makrofajları ile karşılaştığı zaman eritrositlerin hayatta kalmaları için gereklidir. Lipid asimetrisinin kaybolması sonucu PS’in dış yaprağına geçmesinin talasemik ve oraklaşmış kırmızı hücrelerin erken yıkımına neden olduğu ileri sürülmektedir (47, 48, 49).

Ayrıca PS’in lokalizasyonunun iç tabakayla sınırlanması normal eritrositlerin vasküler endotele adezyonunu inhibe eder ve böylece mikrovasküler dolaşımında sorunsuz bir şekilde dolaşmasını sağlar (50). Gerek fosfatidilserin gerek de fosfatidilinozitol 4,5-difosfat (PIP₂) her ikisi de, hücre iskeleti proteinleri, spektrin ve protein 4.1R ile etkileşmelerinden dolayı membran mekanik fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayabilir (51, 52). Son yapılan çalışmalar göstermiştir ki spektrin PS’e bağlanması membranın mekanik stabilitesini arttırmaktadır (51). PIP₂, protein 4.1R’nin glukoforine bağlanmasını artırır; fakat band 3 ile etkileşimini azaltır ve bu şekilde hücre membranı lipid tabakasının membran iskeletine bağlanmasını düzenler (53).

Non-eritroid hücre sinyalizasyon olaylarında rol alan lipid tabakalarının eritroid hücrelerde de β_2 adrenerjik reseptör sinyalizasyonuna aracılık ettiği ve siklik adenozin

monofosfat (sAMP) düzeylerini arttırarak normal eritrositler içine malarya parazitinin girişini düzenlediği gösterilmiştir (54).

Eritrosit membran glikolipidlerinden en sık bulunanı globoziddir. Globozid, intrasellüler organellerin membranlarında bulunmayıp, sadece eritrosit membranının bir komponentidir. Eritrosit glikolipidlerinin yüzey yapıları antijenik aktivite gösterir ve kan grupları ile ilişkilidir (1).

Öte yandan kolesterol, eritrosit membranının en önemli nötral lipididir. Ökaryotik hücrelerin plazma membranları kolesterolden zengin iken, organellerinin membranları bu nötral lipidi daha az oranlarda içermektedir. Serbest kolesterol daha çok eritrosit membranının dış tabakasında bulunur. Serbest kolesterol hücre membranı ve plazma fosfolipidleri arasında iki yol ile değişmektedir. Birinci yolda basit denge difüzyonu gerçekleşmektedir. Bir molekül membran kolesterolü plazmaya geçerken, bir molekül plazma kolesterolü membrana geçer. Kolesterolün ikinci değiş-tokuş mekanizması, membranlar ve plazma lipoproteinleri arasındaki kolesterol dağılımına bağlıdır. Kolesterol hem lipoproteinlerde hem de membranlarda fosfolipidler gibi polar lipidlerin yardımı ile çözünebilir. Kolesterolün, membran ve plazma fosfolipidleri arasındaki dağılımı, kolesterol/fosfolipid oranı ile tanımlanır. Kolesterol/fosfolipid oranındaki değişiklikler membran stabilizasyonunu önemli ölçüde etkilemektedir (55).

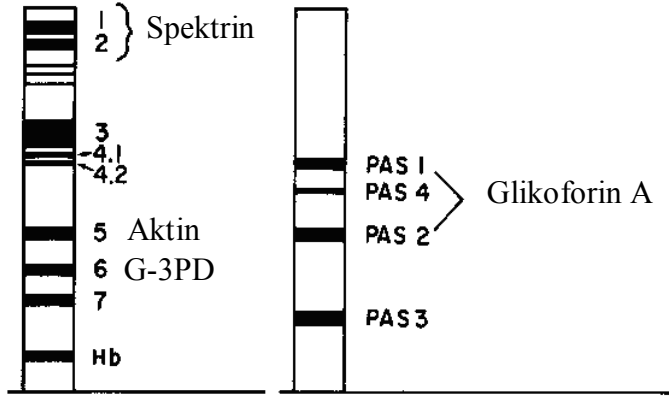
Eritrositler endojen olarak lipid sentezi yapamadıkları için membran lipid kompozisyonları, plazma lipid konsantrasyonundan direkt olarak etkilenir. Eritrosit membranı ile plazma arasında kolesterol ve dış tabakada yer alan fosfolipidlerin değiştirilmesi söz konusudur. Bu değişim bir plazma enzimi, lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) tarafından etkilenir. LCAT, lesitinden kolesterole bir yağ asidi transfer ederek kolesterol esteri ve lysolesitin oluşturur. Reaksiyonun iki ürünüde eritrosit membranı tarafından alınamaz. LCAT aktivitesinin çeşitli nedenlerle azalması halinde eritrosit membranı tarafından alınabilecek serbest kolesterol ve lesitin miktarı artar. Bunun sonucunda ortaya çıkacak membran kolesterol/ fosfolipid oranı değişimi membranın akışkanlığını etkiler. Diğer taraftan membranın sürekli kolesterol ve lesitin kazanması sonucu membran yüzeyi genişler. Tersine LCAT aktivitesi yüksek olursa

eritrosit membranından kolesterol kaybedilir ve membran yüzeyi küçüldüğünden hücrelerin normal bikonkav diskoid yapıları bozulur, küresel şekil alırlar (55).

2.1.2.2.3. Eritrosit membran proteinleri

Eritrosit membran proteinleri lipid tabaka içerisine yerleşmiş integral (transmembran) proteinler, membranın iç yüzeyinde bulunan ve bir ağ yapısı oluşturan iskelet proteinleri ve bu iskelet proteinlerini integral proteinlere bağlayarak üç boyutlu protein yapısını oluşturan ve böylece eritrositlerin oldukça karmaşık biyoreolojik davranışlarını etkileyen bağlayıcı proteinlerden oluşur (56).

Membran proteinleri; transport proteini görevi yapmak, eritrositlerin diğer kan hücreleri ve endotel hücreleri ile etkileşimlerinde adezyon proteini fonksiyonu görmek, sinyal reseptörü olarak çalışmak ve diğer henüz tanımlanmamış aktiviteleri nedeni ile farklı fonksiyonel heterojenite gösterirler (2). Membran proteinleri molekül ağırlıklarına göre poliakrilamid jel üzerinde sıralanırlar ve sıralamaya göre de adlandırılırlar.



Şekil 2.5. Eritrosit membran proteinlerinin poliakrilamid jel elektroforezi (1).

2.1.2.2.3.1. Transmembran Proteinleri

İntegral proteinler adı da verilen transmembran proteinler membran lipidleri ile yaptıkları güçlü bağlar aracılığıyla membrana tutunurlar. Bu proteinler eritrosit membranını boydan boya kat ederler. Lipid tabakasının içinde ve membranın her iki tarafında birbirinden farklı yapısal ve fonksiyonel kısımlara sahiptirler. Band 3 ve glikoforinler bu gruba girerler. Band 3 100 kD molekül ağırlığında bir transmembran glikoproteinidir. İki önemli fonksiyonu vardır:

- Bikarbonat (HCO_3^-) ve klor (Cl^-) iyon değişimi yaparak anyon kanalı veya anyon değiştirici protein olarak görev yapar.
- Ankyrin, protein 4.1 veya protein 4.2 ile bağlanarak lipid tabakası ile membran iskeleti arasında ilişki kurmada rol oynar.

Band 3 proteininin sitoplazmik parçasının N-terminali ankyrin, protein 4.1, protein 4.2, Hb ve bazı glikolitik enzimlerle bağlanırken, C terminali $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ değişimi için anyon transport kanalı olarak fonksiyon görür (57). Glikoforinler ise hücre dışı, intramembranal ve sitoplazmik olmak üzere üç parçadan oluşan sialoglikoprotein yapıda membran proteinleridir. Hücre dışı parçası reseptör fonksiyonu görürken, sitoplazmik parçası hücre proteinleri ile etkileşir. Eritrosit membran proteinlerinin yaklaşık % 2'sini oluştururlar. Yapılarında bulunan sialik asit nedeniyle eritrosit yüzeyini negatif yükü yükleyerek eritrositlerin birbirleriyle ve damar endotelini de içeren diğer hücrelerle etkileşiminin düzenlenmesinde rol oynarlar (57).

Periyodik asit-Schiff (PAS) boyamalarıyla glikoforin A, B, C, D olmak üzere 4 glikoforin bandı tespit edilmiştir. Glikoforin A, PAS-2 veya glikoforin α olarak da bilinen 36 kD molekül ağırlığındaki bandtır. Glikoforinlerin % 85'ini oluşturur. Protein 4.1 ile glikoforin A arasında fosfatidilinozitol aracılı bir bağlantı vardır ve bu bağlantı iskelet ağının membran lipid tabakasıyla ilişkisinde rol oynar (55, 56, 57).

Glikoforin B ise PAS-3 veya glikoforin δ olarak da bilinir; 20 kD molekül ağırlığındadır ve glikoforinlerin % 15'ini oluşturur. Glikoforin C, PAS-2 veya

glikoforin β olarak bilinir. 32 kD molekül ağırlığında olup glikoforinlerin % 4'ünü oluşturur. Protein 4.1 glikoforin C'ye bağlanarak hücre iskeleti ağı ile membran lipid tabakası arasındaki etkileşimde rol oynar. Glikoforin D, glikoforin γ olarak da bilinir. 23 kD molekül ağırlığında olup glikoforinlerin %1'ini oluşturur.

Ayrıca her bir eritrositte, birkaç yüz taneden birer milyon kopyaya kadar bulunabildiği iyi şekilde tanımlanmış olan elliden fazla transmembran proteinin bir kısmı da transport olayında rol alır.

Transport fonksiyonu gösteren membran proteinlerine örnek verecek olursak;

- Band-3: Anyon transporter,
- Aquaporin-1: Su transporter,
- Glut-1: Glukoz ve L-dihidroaskorbik asit transporter,
- Kidd antijen protein: Üre transporter,
- RhAG: Gaz transporter (olasılıkla karbondioksit),
- Na^+ - K^+ -ATPaz,
- Ca^{2+} -ATPaz,
- Na^+ - K^+ -2Cl ko-transporter,
- Na^+ -Cl ko-transporter,
- Na^+ - K^+ -ko-transporter,
- K^+ -Cl ko-transporter ve Gardos kanallarından söz edebiliriz.

Öte yandan bir kısım membran proteini de adeziv fonksiyon gösterir ki bunlar laminin bağlayıcı protein Lu ve integrinler ile etkileşime giren ICAM-4 (intracellüler adhesion molecule-4) adlı proteini içermektedir (2).

2.1.2.2.3.2. Hücre iskeleti proteinleri

Membranın stoplazmik yüzüne yerleşmiş olan bu proteinlere periferel proteinler de denilmektedir. İskelet proteinleri membrandan kolayca ayrıştırılabilirler. Bunlar

aktin, ankrin, α ve β spektrin, band 4.1 proteini, addusin, dematin (band 4.9), tropomodulin ve tropomiyozindir (1, 8, 58, 59, 60, 61).

Eritrosit membranının spektrin ve diğerk membran iskelet proteinlerinin mekanik özellikleri ile iskelet ağ yapısına katılan diğerk proteinlerle etkileşimi, eritrositlerin reolojik davranışlarını belirleyen önemli faktörlerdir (56). Uzun filamentöz yapıdaki spektrin benzersiz yapısal özelliğı 106 adet aminoasidin çok sayıda üçlü helikal tekrarlar yapmasıdır ki bu tekrar sayısı α spektrin için 20, β spektrin için 16 tanedir. İlk kez eritrositlerde farkına varılan bu üçlü helikal yapılar, distrofin, aktinin ve utrofin adı verilen proteinleri içeren spektrin süperfamilyasına ait proteinleri tanımlamaktadır (62, 58, 63, 64).

Spektrin eritrosit membranının major iskelet proteinidir. Spektrin fosforile olup olmaması ve fosforilasyon derecesinin eritrosit membranının mekanik özelliklerinin belirlenmesinde anahtar rol oynadığı ileri sürülmektedir.

Membrandaki şekil değışikliğı sırasında spektrin moleköl kıvrımları açılırken, diğerk protein ve bağlantılar sıkışarak katlanır ve bunun sonucu membran protein ağında yeniden yapılanma meydana gelmektedir. Meydana gelen bu şekilsel değışim geri dönüşümlüdür. Bu sırada eritrositin geometrik yapısı değışir ancak, yüzey alanı sabit kalmaktadır (55, 65). Şekil değışikliğı artığında, bu artışla orantılı olarak bazı spektrin molekülleri maksimum doğrusal uzama sınırlarına erişirler. Bu nokta geri dönüşümlü şekil değışikliğinin sonudur (65).

Eritrositte şekil değışikliğine sebep olan kuvvet daha da arttırılırsa hücre yüzey alanında bir artış meydana gelir ve protein-protein birleşimlerinde kırılmalar ortaya çıkarak membran parçalanır (55, 58, 66).

Spektrin dimer etkileşimlerinin uzun süredir statik olduğu düşünülüyorken, son yapılan çalışmalar göstermiştir ki spektrin tetramerlerinin birbirlerinden ayrılması membran deformasyonu ile indüklenebilir (67). Öte yandan spektrin molekülleri bir aktin oligomeri aracılığıyla birbirlerine bağlanır. Zayıf karakterde olan spektrin-aktin

bağlantıları protein 4.1 aracılığıyla güçlendirir. Addusin, spektrin ve aktin arasındaki bu bağlantıyı stabilize eden bir diğer proteindir (66).

Spektrin dimer-dimer etkileşmesi ve spektrin-aktin-protein 4.1R kompleksi membran mekanik stabilitesinin anahtar düzenleyicileridir. Aynı zamanda eritrositlerin dolaşımında maruz kaldıkları yüksek shear stres sonrası oluşan deformasyonun indüklediği membran parçalanmasına karşı koruyucu etkide kritik rol oynarlar (74).

Bir diğer hücre iskelet proteini Band 5 olarak da tanımlanan aktindir. Aktin uzun filamentler oluşturacak şekilde polimerize olur. Eritrosit aktininin esas görevi üçlü bir kompleks oluşturmak üzere protein 4.1 ve spektrinle etkileşerek spektrin moleküllerinin birbirleriyle ve iskelet ağıyla bağlantısını kurmak ve bu sayede eritrositlerin şekil değiştirmesine katkıda bulunmaktır (55, 56).

Aktin β -spektrinin N-terminal ucu ile zayıf bir biçimde etkileşirken bu etkileşim protein 4.1R tarafından önemli ölçüde arttırılır (68). Eritrosit membranında bulunan aktin filamentleri 14 ila 16 adet aktin monomerinden oluşmakla birlikte uzunlukları olasılıkla tropomiyozin tarafından düzenlenmektedir. Addusin ve tropomodulin aktin filamentinin zıt uçlarına bağlanır. Bağlantı kompleksinde aktini sarmalayan protein dematinin fonksiyonu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Dematin eritrosit membran iskeletinin aktin bağlayıcı ve sarmalayıcı bir fosfoproteindir. 48 ve 52 kD'luk iki subüniti mevcuttur (69, 70, 71, 72). Periferal iskelet proteinlerinden tropomiyozin ise kıvrımlı dimerler oluşturarak aktin polimerizasyonunu indükler. Eritrosit tropomiyozininin görevi aktin filamentlerini mekanik olarak stabilize etmek ve spektrinle aktin arasındaki ilişkiyi düzenlemektir.

Miyozin ise eritrositte az miktarda bulunmakla birlikte, aktomiyozin kasıcı elemanın da tropomiyozinle beraber fonksiyon gördüğü ve eritrosit şeklindeki adenosin trifosfat (ATP) bağımlı diskosit-ekinosit değişimlerden sorumlu olduğu düşünülmektedir (73, 74).

2.1.2.2.3.3. Bağlayıcı Proteinler

Eritrosit membranının iç yüzeyine paralel uzanan iskelet proteinleri ile lipid tabaka içinde dik olarak yerleşmiş transmembran integral proteinlerini birbirine bağlayan proteinlere bağlayıcı proteinler adı verilir. Ankirin, protein 4.1 ve pallidini (protein 4.2) içeren bu proteinler, iskelet proteinleri ve integral proteinlerle etkileşerek üç boyutlu membran protein ağının oluşmasında önemli rol oynarlar (55).

Eritrositlerde hücre membran iskeletinin lipid tabakasına bağlantısı iki önemli protein bağı aracılığıyla gerçekleştirilir. İlk olarak ankirin proteini aracılığıyla spektrin ve band 3 arasında bir bağ kurulur. Buna ilaveten ikinci bağ ise integral proteinlerden glikoforin C ve bağlayıcı proteinlerden, protein 4.1 arasında kurulan bağıdır. Bu bağlar aracılığı ile lipid tabaka, membran iskeleti ile mekanik olarak bağ yapmış olur.

Protein 4.1, spektrine bağlanarak onun aktine bağlanma afinitesini artırır. Diğer taraftan protein 4.1R spektrin dışında, ek olarak glikoforin A, glikoforin C ve protein 4.3 gibi transmembran proteinlere de bağlanır ve membran iç yüzeyine paralel olarak uzanan iskelet ağıyla, lipid tabakası içinde dik konumda bulunan integral proteinler arasında ilişki kurar (1, 56, 57).

Öte yandan protein 2.1 olarak da adlandırılan eritrosit ankirini spektrinle band 3 arasındaki bağlantıyı sağlayan globüler bir proteindir. Band 3 ve spektrine bağlanır. Protein 4.2, diğer adı ile pallidin ise insan eritrosit membran protein kitlesinin yaklaşık % 5'ini oluşturur ve band 3'ün stoplazmik parçası ile etkileşerek ankirin ve protein 4.1'i bağlar. Protein 4.2'nin membran proteinlerine bağlanmak suretiyle onları proteazlarca parçalanmaktan ve başka proteinlerle çapraz köprüler oluşturmaktan koruduğu, böylece membran iskeletinin stabilizasyonuna katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (1, 56, 69).

Ankirin ve protein 4.1R proteinleri ile kompleks yapmış yapılar membranın yapısal bütünlüğü ile direkt ilgili makromolekül kompleksleridir. Band 3 ve RhAG stoplazmik parçaları aracılığı ile ankirin ve glukoforin C ile etkileşerek; XK, Rh ve Duffy ise protein 4.1R ile etkileşerek lipid tabakayı membran iskeletine bağlayan kompleksler oluşturur (76, 77, 78, 79).

Son yapılan çalışmalar göstermiştir ki spektrin-aktin-protein 4.1R bağlantısal kompleksinin diğer iki üyesi olan adducin ve dematin de aynı zamanda sırasıyla band 3 ve Glut-1 ile etkileşerek bağlayıcı proteinler olarak fonksiyon görürler (80).

Bu hücre iskeleti ile membran proteinleri arasındaki bağlantılar, lipid tabaka ile membran iskeleti arasındaki yapışlıkları düzenlemede rol oynayabilir ve bu şekilde membran vezikülasyonlarını önleyerek eritrositlerin en uygun membran yüzey alanını korumalarına yardımcı olur. Bağlayıcı fonksiyonuna ilaveten band 3 aynı zamanda olası karbondioksit taşıyıcısı ve karbonik anhidraz gibi çeşitli glikolitik enzimleri “metabolon” adı verilen makromoleküler bir yapıda bir araya getirirerek hücre metabolizmasının ve iyon-gaz transport fonksiyonunun düzenlenmesinde anahtar bir rol oynayabilir (81).

2.1.2.2.4. Eritrosit Membranı ile İlişkili Enzimler

En az 50 enzim eritrosit membran proteinidir veya membrana herhangi bir biçimde bağlanır. Eritrosit için önemli çeşitli moleküllerin transpotuyla birlikte glukoz metabolizması için gerekli olan enerjinin üretimi ve kullanımına kadar çok çeşitli fonksiyonları vardır (1).

Öte yandan eritrosit membranı ile ilişkili enzimlerin eritrosit şekil ve deformabilitesinin düzenlenmesinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir (10, 64).

Bazı eritrosit enzimleri membran dış tabakasına yerleşmiş olup hücre dışı substratlarla etkileşirler. Glikozidazlar ve asit fosfatazları içeren birtakım glikolitik enzimler eritrosit membranının dış tabakasında yerleşmişlerdir. Asetilkolinesteraz da membranın dış tabakasında yerleşmiş, glikoprotein yapıda bir enzimdir. Membrana fosfatidilinozitol-glikan bağı ile bağlı olup molekülünün polipeptid kısmı tamamen hücre dışındadır. Bu enzimin eritrositteki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, eksikliğinde hemoliz ve paroksizmal noktürnal hemoglobinüri olduğu bildirilmiştir (1).

ATP üretiminde ve kullanımında rol alan enzimler ise aldolaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz ve fosfogliserat kinazdır. Bu üç enzim fruktoz difosfatı 3-fosfogliserata çevirirken ATP üretirler. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz membran preparatlarında en fazla miktarda bulunan enzimdir ve poliakrilamid jellerde band 6 olarak görülmektedir. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz aynı zamanda eritrosit sitoplazmasında da bulunmuştur ve band 3 proteininin sitoplazmik segmentine bağlanabildiği gösterilmiştir. Bu enzimin membrana bağlanmasının fizyolojik önemi henüz tam olarak anlaşılmasa da, hücre hasarına ve strese karşı gelişen hücresel metabolik cevabı düzenlemedeki rolü merak uyandırıcıdır (83).

ATP sadece membran-bağlı enzimler tarafından üretilmez; fakat aynı zamanda membrana bağlı bir takım moleküller tarafından da kullanılır. Bunlar; ATP'nin siklik adenozin monofosfata (sAMP) dönüşümünü katalizleyen adenilsiklaz, protein kinazlar ve ATPazlardır.

Protein kinazlar ATP varlığında fosfoserin, fosfotreonin ve fosfotirozin bağları oluşturarak diğer membran proteinlerini fosforillerler. Eritrositler sitozolik ve membranal sAMP bağımlı kinazlar, yine sitozolik ve membranal ancak sAMP bağımsız kinazlar, protein kinaz C ve kalsiyum ile düzenlenen protein kinazlardan oluşan çok sayıda protein kinazı içermektedir. Hem membranal hem de sitozolik kinazlar membran proteinlerini fosforile edebilirler.

Genellikle, fosforile olan yapısal proteinler fosforile olmayanlara göre hedef proteinlerine daha düşük oranda bağlanırlar. Örneğin, protein 4.1'in fosforilasyonu spektrine bağlanmasını ve spektrin-aktin ilişkisini düzenleme yeteneğini azaltır. Spektrin fosforilasyonu ise spektrin kendi arasındaki ve ankirin ile aktin gibi moleküllerle olan bağını azaltır. Ancak bu gibi olayların hücre şekli ve membran bütünlüğünü tam olarak nasıl düzenlediği iyi bir biçimde henüz tam olarak çalışılmamıştır. Stres ile ilişkili ATP azlığında protein 4.1 defosforilasyonunun spektrin-aktin ağının kırılabilirliğinin artmasına ve membran deformabilitesinin azalmasına neden olabileceği tahmin edilmektedir (1).

Aynı zamanda ATP'yi kullanan ve yıkan enzimler de membranda çok az miktarda da olsa bulunmaktadır. Protein kinazlar gibi ATPazlar da membran proteinlerini fosforile eder ancak fosfoserin ve fosfotreonin bağları yerine bunlar açıl bağları oluştururlar. Na^+ - K^+ ATPaz, Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPaz ve Mg^{2+} ATPazlar eritrosit membranında bulunan önemli ve iyi çalışılmış proteinlerdir. Na^+ - K^+ ATPaz aynı zamanda sodyum pompası veya sodyum-potasyum pompası olarak bilinir. İntegral bir membran proteini olan Na^+ - K^+ ATPaz, ATP hidrolizi ile beraber sodyum iyonlarını hücre dışına ve potasyum iyonlarını hücre içine pompalayan bir sistemdir (85).

Na^+ - K^+ pompa aktivitesi ile membran kolesterol konsantrasyonu arasında negatif bir ilişki bulunmaktadır. İn vitro olarak eritrosit membranında kolesterol artışı, Na^+ - K^+ pompa aktivitesinde azalmaya neden olur. Eritrosit membranında kolesterol birikimi eritrosit hücre yüzey alanında değişime ve şekil bzukluğuna neden olur. Birtakım çalışmalar eritrosit membranı kolesterol/fosfolipid oranındaki değişimlerin membran akışkanlığında değişikliklere neden olduğunu ve membran permeabilitesinin ve maddelerin difüzyonunun etkilendiğini bildirmişlerdir. Eritrosit membranı kolesterol içeriğinin artması membran akışkanlığını, eritrosit rijiditesi ve mikrovizkositesini artırırken beraberinde Na^+ - K^+ aktivitesini azaltır. Bunun tam tersine membran kolesterol içeriği azaldığında, fosfolipid içeriği arttığında yani kolesterol/fosfolipid oranı azaldığında membran akışkanlığı ve Na^+ - K^+ aktivitesi artar (9, 86, 87, 88, 89, 90).

Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPaz ise oldukça etkin bir enzim sistemi olup Ca^{2+} iyonunu hücre dışına taşır. Ca^{2+} -ATPaz transport sisteminin çalışması için Mg^{2+} iyonları şarttır. Pompa mikromolar düzeydeki hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonları ile aktive olur. Normal hücre içi Ca^{2+} içeriği yaklaşık $4.8 \mu\text{mol/l}$ 'dir. Bu miktar $1-1.5 \text{ mmol/l}$ olan hücre dışı Ca^{2+} konsantrasyonundan çok azdır (1, 10).

Eritrosit içinde Ca^{2+} konsantrasyonunun çok dar sınırlar içinde sabit tutulması fizyolojik açıdan çok önemlidir. Mikromolar konsantrasyonlarda ($5-10 \mu\text{mol/l}$) hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu artışı eritrosit dışına K^+ sızmasına neden olur. Buna Gardos etkisi adı verilir. Hücre içinden K^+ ve onunla ilişkili su kaybı, ortalama eritrosit içi hemoglobin konsantrasyonunun (OEHK) ve internal viskozitenin artışı yoluyla eritrosit

deformabilitesinde belirgin azalmaya sebep olur. Artmış hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu $Na^+-K^+-ATPazı$ da inhibe ederek iyonik dengeyi iyice bozabilir. Daha yüksek hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlarında ise (25-300 $\mu\text{mol/l}$) diskositik eritrositler ekinosit veya sferoekinositlere dönüşürler. Bu şekil değişikliği deformabilitede daha fazla azalma ile sonuçlanır. Milimolar düzeydeki eritrosit içi Ca^{2+} konsantrasyonlarında, membran iskelet proteinlerinde, özellikle spektrin ve band 4.1'de geri dönüşümsüz çapraz köprüler oluşturan sitoplazmik transglutaminaz enzimi aktive olur ve bu çapraz köprüler eritrosit deformabilitesinin daha fazla azalmasına sebep olur (10, 91, 82, 55).

Öte yandan lipid metabolizmasında rol oynayan bazı enzimler de eritrositlerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynarlar. Lipid metabolizması enzimlerinin, litik lizofosfatidlerin ve diaçilgliserolün artmasını engelleyerek eritrositin diskositik şeklinin korunmasına katkıda buldukları bildirilmiştir. Olgun eritrosit yağ asitleri ve fosfolipidleri de novo sentezleme yeteneğine sahip değildir. Eritrositte fosfolipidlerin tamiri ve yenilenmesi iki yolla yapılır. Bunlardan ilki lipidlerin karşılıklı değişimi, diğeri ise yağ asidi açılasyonudur. Yağ asidi açılasyonu aktif bir metabolik yolak olup, ATP'ye gereksinim gösterir. Bu sistem fosfolipidleri yenilemek için, yağ asitleri ve lizofosfatidleri kombine eder.

sAMP ve siklik guanozin 3'-5' monofosfat (sGMP) gibi ikinci habercilerin yıkımında görevli enzimler olan fosfodiesterazlar (PDE) lipid metabolizmasında da rol oynayarak eritrosit membranının stabilitesine etki ederler. Membrana bağlı enzim olan PDE'lerin aktivitesi normalde az olup, eritrosit içine kalsiyum (Ca^{2+}) girişi ile aktive olurlar. Bu enzimler difosfoinozid ve trifosfoinozid ile etkileşerek 1,2-diaçilgliserol ve inozitol fosfatların artışına sebep olurlar. Eğer ortamda yeterince ATP varsa, 1,2-diaçilgliserolün bir kısmı endojen 1,2-diaçilgliserol kinazla fosfatidlere dönüştürülür. Membranın iç tabasında 1,2-diaçilgliserol toplanması ekinosit oluşumunu ve membranda veziküllerin ortaya çıkmasını indükler. Membran kaybı sonucu meydana gelen sferoekinositlerin deformabilitesi bozuktur (19, 10, 82).

2.1.2.2.5. Çeşitli Membran Komponentlerinin Eritrosit Fonksiyonlarına Katkısı

Eritrositler, yaşamları boyunca primer fonksiyonları olan dokulara oksijen taşıma görevini gerçekleştirirken yapısal bozukluğa uğramadan, maruz kaldıkları mekanik zorlamaların üstesinden gelmek zorundadırlar. Kapsamlı biyofiziksel çalışmalar, hücrelerin ciddi deformasyonların üstesinden gelebilme yeteneklerini primer olarak düzenleyen üç farklı yapısal özelliği ortaya koymuştur. Bunlar;

1. Hücre geometrisi, özellikle hücre yüzey alanı/volüm oranı,
2. İntrasellüler hemoglobin konsantrasyonu tarafından belirlenen stoplazmik vizkosite,
3. Membran deformabilitesidir.

2.1.2.2.5.1. Hücre Geometrisi

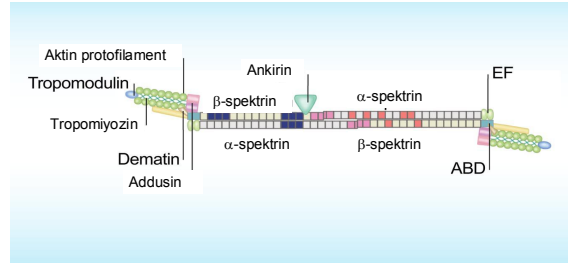
90 fL hacime ve $140 \mu\text{m}^3$ yüzey alanına sahip bikonkav yapıdaki normal eritrositler, aynı hacime sahip küresel bir yapıdan % 40 oranında daha fazla yüzey alanına sahiptirler. Yüzey alanı/volüm oranı artmaksızın hücre deforme olamaz. Sabit volümde hücrenin uzaması yüzey alanının artmasına neden olur ki bu lipid tabakanın özellikleri nedeniyle sınırlanır (2).

Membran yüzey alanının devamlılığı, hücre iskeleti ve lipid tabaka arasındaki sıkı yapışıklıklarla sağlanır ki bu membran vezikülasyonunu önler. Mekanik olarak stabil olan spektrin temelli membran iskeleti, membranın parçalanmasını önler. Öte yandan, hücre volümünün korunması ve devamlılığı ise membran ile ilişkili çeşitli iyon taşıyıcıları tarafından sağlanmaktadır. Azalmış hücre iskeleti ve lipid tabaka yapışıklıklarına bağlı olarak gelişen membran vezikülasyonunun sonucunda yüzey alanı kaybı, membran mekanik stabilitesinin azalması sonucu hücre parçalanması veya defektif iyon transportu gibi faktörler eritrositlerin deforme olabileme yeteneklerini azaltarak dolaşımdan erken uzaklaşmalarına neden olur. Spektrin bazlı hücre iskelet ağı ile çeşitli membran proteinlerinin stoplazmik parçaları arasındaki etkileşimler sonucu oluşan vertikal bağlantılar normal membran uyumunun ana belirleyicisidir. Band 3 ve

RhAG, sonrasında β -spektrin ile birleşecek olan ankirin ile etkileşerek bu şekilde bir bağlantı oluşturur. Protein 4.2 ise hem band 3 ve hem de ankirine bağlanarak her ikisi arasındaki etkileşimi düzenler. Glikoforin C, band 3, XK, Rh ve Duffy hep birlikte β -spektrin ve aktinle birlikte üçlü kompleksin üçüncü üyesi olan protein 4.1'e bağlanır (75, 76, 78, 79).

Son yapılan çalışmalar göstermiştir ki band 3 ve Glut-1 aynı zamanda, iskelet proteinlerinden sırasıyla addusin ve dematin ile etkileşerek lipid tabakayı hücre iskeletine bağlar. Kanıtlanmış birçok bağlantı arasından band 3 ile olan bağ membran yapısındaki en önemli bağlantı olup bunu RhAG aracılı bağlantı takip eder.

Eritrositlerin dolaşımdaki değişikliklere karşı yapısal bütünlüğünü koruyabilmesini sağlayan membran mekanik stabilitesinin esas düzenleyicisi hücre iskelet ağının stabilitesidir. İskelet ağ stabilitesi ciddi bir şekilde hem spektrin dimerleri arasındaki etkileşimin gücüne hem de spektrin tetramerlerinin distal uçlarındaki bağlantısal kompleksi tanımlayan etkileşimlere bağlıdır (2).



Şekil 2.6. Spektrin bazlı membran iskeletinde spektrin-spektrin dimerleri ve bağlantısal kompleksteki spektrin aktin ve protein 4.1'in şematik ilişkisi.

Dimer-dimer bağları statik değildir, deformasyon için zorlayan gerilme kuvveti altında dinamik olarak geri dönüşümlü bir biçimde açılırlar (67). Bu ilişki ankirinin β zincirine bağlanması ile kuvvetlenir. Bağlantısal kompleksin ana bileşenleri spektrin tetramerinin sonundaki spektrin, F aktin, ve protein 4.1'dir ve bunların birbirlerine bağlanma yetenekleri membran stabilitesinin diğer bir major belirleyicisidir. En az dört ayrı protein tropomyozin, addusin, tropomodulin ve dematin her bir komplekste bir ya da iki kopya olarak bulunur. Bu proteinler kompleks içindeki kısa aktin filamentlerini

stabilize ediyor görünmektedir. Fakat bu proteinlerin membran stabilitesi üzerine olan etkileri spektrin, aktin ve protein 4.1 gibi primer öğelerle karşılaştırıldığı zaman daha az kalmaktadır.

Mekanik stabilitenin düzenlenmesinde protein-protein etkileşimlerinin major bir rolü olduğu bildirilmesine rağmen, protein-lipid etkileşimleri daha az ilgi çekmiştir. Son yapılan çalışmalar göstermiştir ki α ve β spektrinin üçlü helikal tekrarları fosfatidilserin bağlar ve bu bağlanma insitu olarak membran mekanik stabilitesini artırır (93, 51). Aksine fosfatidilinozitol-4,5 bifosfat β spektrinin N-terminal ucuna bağlanır ve spektrinin aktin ve protein 4.1R ile üçlü kompleks yapma eğilimini azaltır ve böylelikle membran stabilitesinin azalmasına neden olur (52).

2.1.2.2.5.2. Sitoplazmik Viskozite ve Hücre Volüm Düzenlenmesi

Normal eritrositlerin sıvı shear streslerine cevaben gelişen hızlı şekil değiştirme yetenekleri intrasellüler hemoglobin konsantrasyonu tarafından belirlenen sitoplazmik vizkosite tarafından kontrol edilmektedir. Çekirdeksiz memeli kırmızı hücrelerinin ortalama hücre volümleri çok geniş bir aralıkta olabiliyorken (20-200 fL) ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonlarını çok dar bir aralıkta tutarlar (30-35 g/dL). Normal insan kırmızı hücre ortalama hemoglobin konsantrasyonu 33g/dL iken, total kan içinde 27 ile 37 g/dL arasında değişir. Bu değerlerin üzerinde hemoglobin solusyonunun vizkositesi hızlı bir şekilde artar (66).

Hemoglobin konsantrasyonunu dar bir aralıkta tutmaya çalışan eritrositler hücre deformasyonu sırasında sitoplazmik vizkös yayılımı en aza indirir. Hemoglobin konsantrasyonundaki 37 g/dL'nin üzerindeki artışlar, bükülme ve uzama şeklindeki deformasyonlardan sonra, hücrenin başlangıç şeklini sağlayan şekilsel oranlarını azaltır (2). Bu şekilde kapiller mikrosirkülasyonda dar kapillerlere uyum sağlama yeteneği ve bununla birlikte dokulara oksijen dağıtma etkililiği, artmış sitoplazmik vizkosite nedeniyle riske atılmış olur. Fakat önemli olan, hücre dehidratasyonu ve bunun sonucu artmış sitoplazmik vizkosite kırmızı hücre ömrünü çok az etkiler.

Eritrositlerin kendi hemoglobin konsantrasyonlarını dar bir aralıkta tutma yetenekleri önemli bir şekilde kendi volümlerini kontrol altında tutma yeteneklerine bağlıdır. Eritrosit volümü birincil olarak total katyon içeriği ile belirlenirken, membrandan sodyum ve potasyum taşınmasında rol oynayan çok sayıda transport proteini sitoplazmik vizkositenin düzenlenmesinde rol oynar (2, 94).

2.1.2.2.5.3. Membran Deformabilitesi

Eritrositlerin dolaşımında maruz kaldıkları sıvı kayma kuvvetlerine hızla cevap verebilmelerini sağlayan en önemli özellik membranlarındaki yüksek elastisite özellikleridir. Her ne kadar teorik ve deneysel kanıtlar genel olarak spektirin bazlı hücre iskelet ağının özellikle de spektrinin membran elastisitesini belirlemede kritik bir rolü olduğunu gösterse de bu etkinin ana yapısal kaynağı henüz tam tarif edilmemiştir. Uzun filamentöz spektrin dimerlerinin önemli bir yapısal özelliği ardı ardına 36 spektrin tekrarının olmasıdır. Bunlardan 20 tanesi α -spektrinde kalan 16 tanesi β -spektrinde olmaktadır ve kısmen bağımsız katlantılar gibi davranmaktadırlar. Son yapılan bir çalışma göstermiştir ki, bu 36 ayrı tekrarın termal stabilitesi, 21 °C ile 72 °C arasında değişim göstermektedir. Çok az miktarda spektrinin açılması bile membran elastisitesini etkileyebilir (95).

İntakt membranlardaki spektrinin yapısındaki sistein aminoasidinin floroforlar ile işaretlenerek kütle spektrometre ile ölçümüne dayalı yapılan bir çalışma göstermiştir ki bu sisteinlerin hücre mekanik strese maruz kaldığında bu kimyasallara bağlanması artar ve bunlar düşük stabilitede tekrarlar halinde mevcuttur (96). Bu bulgular göstermiştir ki farklı spektrin tekrarlarının katlanıp açılması normal eritrosit membranının elastisitesine katkıda bulunmaktadır.

Yaşlanma süresince normal eritrositler az miktarda hemoglobin kaybı ile birlikte hücre yüzey alanını ve hacmini de kaybederler ve sonuç olarak eritrositlerin 120 günlük yaşamları boyunca hücre dansiteleri giderek artmaktadır. Son çalışmalar belgelemiştir ki normal eritrositler aynen orak kırmızı hücrelerde olduğu gibi aşırı dehidratasyon sonrasında hücre yoğunluk artışını ve katyon homeostazını sürdürme yeteneklerini

kaybederler (97). Bu hücre popülasyonunun “end-stage” eritrositler olduğu ve kaderlerinin hücre dolaşımından temizlenmek olduğu ileri sürülmüştür. Yaşlanan normal eritrositlerin dolaşımında uzaklaştırılmaları ile ilgili bir diğer alternatif ise yaşlı hücrelerin makrofajlar tarafından membran dış tabakalarındaki band3 ve PS kümelerinin tanınmasının ardından fagositozlarını içermektedir (2). Bu olaylardan hangisinin nispeten daha fazla rol oynadığını saptamak zor da olsa yaşlı eritrositlerin dolaşımından uzaklaştırılmasında hepsi de bir miktar etki yapmaktadır.

2.1.2.3. Eritrosit Deformabilitesini Etkileyen Fizyopatolojik Durumlar

Eritrositlerin deformabilite özellikleri birçok faktörün etkisiyle değişikliğe uğrayabilir. Söz konusu değişim deneysel olarak sağlanabildiği gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda da gerçekleşebilmektedir.

Eritrositlerin içinde buldukları ortamın osmotik basıncındaki artış hem hücre yüzey alanı sabit olmak koşulu ile eritrosit hacminde azalmaya, hem de OEHK’nda artışa sebep olur. Diğer taraftan yüksek osmolaritede membran komponentleri arasında bir etkileşim meydana gelerek eritrosit deformabilitesini azaltabilir. Osmolaritenin azalması ise, eritrosit hacminde artışa neden olarak deformabiliteyi zıt yönde etkiler (66). Fakat bu tarz etkiler sadece belli bir aralıktaki osmolarite değişimleri için geçerlidir. Genel olarak, osmolaritede meydana gelen değişiklikler gerek artma gerek de azalma yönündeki olsun belli bir düzeyin üstünde ise eritrosit deformabilitesini azaltıcı yönde etki eder. Osmolaritedeki bir artış hücrenin hacminde bir azalmaya neden olurken Hb konsantrasyonunda artışa neden olur. Böyle bir eritrosit, normal bir eritrositin çapından dar bir kanaldan daha kolay geçtiği halde kitle halindeki akımda deformabilite yeteneği azalmış bulunur. Tersine hipoosmolar bir ortamda hemoglobin konsantrasyonunda, dolayısıyla sitoplazmik vizkositede bir düşme olacağından kitle halindeki akım kolaylaşırken, belli bir yüzey alanında hacim artmış olacağından dar bir kanaldaki akım güçleşir (55).

Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonundaki artışların eritrosit deformabilitesinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir. Ca^{2+} iyonoforu A23187 kullanılarak hücre içi

Ca^{2+} konsantrasyonu arttırıldığında eritrositte Ca^{2+} bağlayıcı kalmodulin aracılığıyla Ca^{2+} -ATPaz'ın aktivasyonu membran lipidlerinin kompozisyon ve metabolizmalarındaki değişiklikler ve K^+ iyonu ve suyun hücre dışına çıkışını (Gardos etkisi) içeren bir seri kompleks biyokimyasal reaksiyon meydana gelir. Eritrositlerin yüksek K^+ iyonu içeren bir ortama konmalarıyla K^+ dışarı çıkışının ve buna bağlı dehidratasyonun engellendiği deneylerde, eritrosit deformabilitesinde bir azalma saptanmamıştır. Bu sebeple, eritrositte hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu artışı ile oluşturulan deformabilite azalmasının sebebinin Gardos etkisine bağlı dehidratasyon olduğu ileri sürülmektedir. Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu artışı, K^+ iyonlarının hücre dışına çıkışına sebep olmakta, su molekülleri de K^+ iyonlarını izlemekte, hücre içi viskozite ve Hb konsantrasyonu artmaktadır. Bu durum eritrosit deformabilitesinin azalmasıyla sonuçlanır (98, 64).

Eritrosit membranında ATP eksikliği pompa aktiviteleri açısından çok önemlidir. Membrandaki ATPaz enzimleri eritrositin katyon ve su kapsamını regüle ederek hücrenin boyutlarının, şeklinin ve deformabilite yeteneklerinin korunmasına büyük ölçüde katılırlar. Eritrositlerin ATP'den yoksun kaldıklarında ekinosit haline dönüştükleri, ayrıca membranlarında kırılmalar meydana gelerek bir kısım membran materyalinin kaybı ile sonuçlanan şekil bozukluklarının ortaya çıktığı bilinmektedir. Böylece ATP eksikliği eritrosit deformabilitesinin azalması ile sonuçlanır (1).

Kayar ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada deneysel sepsis ve iskemi-reperfüzyon hasarı modellerinde eritrosit şekil değiştirme yeteneğinin bozulduğu bildirilmektedir (99).

Eritrosit membranındaki yapısal değişikliklerin sonucu olarak membranda kolesterol birikiminde artış olur (patolojik kolesterol/fosfolipid oranı), membran akışkanlığı ve fonksiyonları bozulur; bunun sonucunda da eritrosit deformabilitesi olumsuz olarak etkilenir. Bu değişiklikler kapiller damarlarda lümeninin daralmasına, kan akışının engellenmesine ve eritrosit agregasyonunun ve vizkositenin artmasına neden olur. Bu sonuçlar mikrosirkülasyonda bozulmaya ve patolojik süreçlerin

başlamasına katkıda bulunur. Özellikle koroner kalp hastalığı, anjina pektoris, retinopati, serebral ve periferel sirkülasyonun bozulmasına neden olur.

Eritrosit deformabilitesinin klinik önemi ise birçok çalışmada vurgulanmaktadır (101). Dolaşım sistemini ilgilendiren patolojiler başta olmak üzere, çeşitli klinik tablolarda eritrosit deformabilitesinde değişiklikler saptanmıştır. Akut miyokard infarktüsü geçirmiş hastaların eritrositlerinin şekil değiştirme yeteneğinin azaldığı ve kan viskozitelerinin arttığı bildirilmiştir (102, 103).

Öte yandan diabetes mellitusta ve hipertansif durumlarda da eritrosit şekil değiştirme yeteneğinin azaldığı, kan viskozitesinin arttığı ve eritrosit şekil değiştirme yeteneğinin azaldığı bildirilmiştir (5, 6). Bununla birlikte üremide, orak hücre anemisinde ve kalıtsal sferositozda da eritrosit deformabilitesinin bozulduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (104, 105). Ayrıca kontrast maddelerin, anestezi maddelerin ve siklosporin kullanımının da eritrosit deformabilitesini olumsuz yönde etkilediğini bildiren çalışmalar vardır (107, 108).

2.1.2.4. Hücre İskeleti Proteinlerine Bağlı Kalıtsal Eritrosit Membran Hastalıkları ve Eritrosit Deformabilitesi

Değişmiş membran yapısı ve hücre fonksiyonu ile birlikte olan kalıtsal eritrosit hastalıkları iki grupta incelenir.

- 1- Çeşitli membran ve hücre iskeleti proteinlerindeki mutasyonlara bağlı değişen fonksiyonlar. Bunlara örnek olarak Kalıtsal Sferositoz (KS), Kalıtsal Eliptositoz (KE), Kalıtsal Ovalositoz (KO) ve Kalıtsal Stomatositozu örnek verebiliriz.
- 2- Globin gen mutasyonları sonucu oluşan membran üzerindeki sekonder etkilere bağlı meydana gelen değişimler. Bunlar Orak Hücre Hastalığı (Sickle Cell Disease), Unstable Hemoglobin ve Talasemileri içermektedir (2).

Bütün bu hastalıklardaki ortak yön eritrosit deformabilitesindeki azalmalardır.

Hücre iskeleti kabaca asimetrik olarak uzanan iki zincirden oluşan spektrin ile bunu hücre membranına bağlayan aktin ve ankrin gibi diğer proteinlerden meydana gelir. Ankrin, spektrini integral proteinlerden olan Band-3'e bağlar ve hücre zarının vertikal olarak stabilitesini sağlar. Benzer şekilde aktin de hücre membranının eksternal proteinlerden protein-4.1'e bağlanmasını sağlayarak horizontal olarak güçlendirilmesini sağlar. Spektrinin ağsı yapısı hücreye esneklik ve güç verir. Kendilerine özgü bikonkav yapısıyla eritrositler çok ince kapillerlerden bile bu esneklikleri sayesinde kolayca geçerler ve hemen bikonkav şekillerine geri dönerler.

Deneysel çalışmalarda spektrinin denatüre edilmesiyle eritrositlerin esnekliklerini kaybederek küre halini aldıkları görülmüştür. Hücre iskeletini oluşturan veya membranın iskelete bağlanarak stabilitesini sağlayan proteinlerin eksikliğine veya fonksiyon bozukluğuna yol açan mutasyonlar, kalıtsal hemolitik anemilere yol açabilmektedir. Kalıtsal eritrosit membran anomalilerine bağlı kronik hemolitik anemiler içinde en sık görülenleri kalıtsal sferositoz (KS), kalıtsal eliptositoz (KE), kalıtsal piropoikiloz (KPP) ve kalıtsal stomatositoz (KSt) (109).

2.1.2.4.1. Kalıtsal Sferositoz

Hastalarda eritrosit membranının vertikal stabilitesinde bozukluk sonucu eritrositler küre şeklini alır ve sferosit olarak adlandırılır. Esnekliklerini kaybeden sferositler sağlam dalakta hemolize (ekstravasküler hemoliz) uğrarlar. Spektrin eksikliği bu hastalarda tanımlanan ilk hücre iskelet anomalisidir. Bazı olgularda spektrinin sentezinde kusur saptanırken diğerlerinde α ve β spektrin ve ankrinin birlikte eksikliği, band-3 veya protein 4.2 eksiklikleri sorumlu bulunmuştur (110).

Kuşaklar arasında genellikle otozomal dominant (OD) olarak iletilmekle birlikte (% 75) otozomal resesif (OR) kalıtım da seyrek değildir. Hücre iskeletinin hücre membranını yeterince destekleyememesi sonucu membran, altındaki hücre iskeletinden ayrılmaya başlayarak vezikülasyon olarak adlandırılan mekanizmayla fosfolipidlerinin bir kısmını kaybeder. Bu durum kalıtsal sferositozun bütün formlarında membran yüzey

alanı kaybı ve sonuç olarak hücre şeklinde diskosit formdan stomatosit ve sferosit şekline bir dönüşüme neden olur.

Sferosit olarak adlandırılan eritrositlerdeki bu şekil değişikliği hastalığa ismini verdiği gibi hastalığın patagnomonik bulgusunu da oluşturur. Esnekliklerini kaybeden bu sferositler özellikle dalak sinüzoidlerinden geçemezler ve kordonlarda hapsedilerek yıkılır ve hastalığın klinik ve laboratuvar bulgularının gelişmesine sebep olurlar. Eritrositlerin dalakta yıkımına bağlı meydana gelen aneminin ciddiyeti membran yüzey alanındaki azalmanın boyutu ile orantılıdır. Çift tabakalı lipid membrandaki eksiklik sonucu hücre geçirgenliği artar, sodyum-potasyum pompası normalden fazla çalışmak zorunda kalır ve eritrositler dehidrate olur. Glikoz tüketiminde artışa yol açan bu durum sferositler için ek bir metabolik yük oluşturur. Dalak aynı zamanda eritrositlerin hücre zarlarını kaybetmelerinde de önemli bir rol oynar (111).

2.1.2.4.2. Kalıtsal Eliptositoz

Otozomal dominant olarak iletilen kalıtsal eliptositoz (KE) hücre iskeletinin horizontal dayanıklılığında bozulmaya bağlı gelişir. En sık rastlanılan kusurlar spektrinle ilgili olanlardır (112).

Çoğu olguda α -spektrin genindeki mutasyonlara bağlı olarak α/β spektrin tetramerlerinin oluşumunda kusurlar oluşurken, nadiren spektrin ve diğer proteinlerin eksiklikleri sorumludur. Spektrin tetramerlerinin oluşumundaki bozukluk hücre iskeletinin daha yumuşak bir hal almasına ve kolayca deforme olmasına yol açar. Eritrositler kılcal damarlardan geçerken ezilip elips şeklini alırlar ve sonunda eski hallerine dönemeyip bu şekilde kalırlar. Spektrin dışında, protein 4.1 ve glikoforindeki eksiklikler ve fonksiyon kaybı da KE olgularında sık karşılaşılan diğer kusurlardır (113, 114).

KE'un tüm formlarının ortak özelliği, dolaşımda zaman içinde diskosit formdan eliptosit forma ilerleyici bir değişime, azalmış membran yüzey alanına ve şiddetli durumlarda membran fragmentasyonuna neden olan mekanik olarak unstabl membran

yapısıdır. Önemli olarak, hastalığın ciddiyeti membran mekanik stabilitesindeki azalmanın miktarı ve bunun sonucunda meydana gelen membran yüzey alanının kaybı ile ilişkilidir (115).

2.1.2.4.3. Kalıtsal Piropoikilositoz

Kalıtsal piropoikilositoz (KPP)'un patogenezinde iki önemli kusur vardır: spektrin tetramerlerinin birbirleriyle birleşmelerindeki kusur ve spektrinde miktar olarak yetersizlik. Bu kusurlara bağlı olarak spektrin proteininin ısıya karşı dayanıklılığı azalır ve hastalığın ismindeki “piro” yani eski Yunancadaki ateş anlamına gelen ek sözcük bu özelliğinden kaynaklanır. Normalde spektrin 49 °C de denatüre olurken, KPP lu hastalardaki anormal spektrin 45 °C de denatüre olduğu görülür. Ağır poikilositoz, mikrositoz ve parçalanmış eritrositler en önemli özellikleridir (116).

2.1.2.4.4. Kalıtsal Stomatositoz

Periferik kan yaymalarında ortalarında kumbara ağzı şeklinde, yarık şeklinde solukluk görülen eritrositler stomatosit olarak adlandırılır. Kusur, hücre iskeletinden çok membranın kendisindedir. Eritrosit membranının hücre içine bakan taraftaki lipid tabakasının dış taraftaki tabakaya göre daha fazla genişlemesi sonucu oluşur. Stomatositlerde ana sorun katyon geçirgenliğinin bozulması ve buna bağlı olarak hücrenin su içeriğinin artışıdır. Sodyum geçirgenliğinin artışı dengeleyebilmek için Na^+-K^+ pompası var gücüyle çalışır ancak dengeyi sağlamaya yeterli olamaz. Hastaların çoğunda bozulmuş katyon dengesinin nedeni membran proteinlerinden stomatin veya band-7.2 olarak adlandırılan proteinin eksikliğidir. Kalıtsal Stomatositozun diğer bir formunda membran anomalisi nedeniyle hücre su ve potasyum kaybeder ve sodyum içeriğinde de bunlarla orantılı bir artış görülmez. Bu varyant formuna dehidrate stomatositoz veya “kalıtsal xerositozis” denir (109).

2.1.2.5. Orak Hücre Sendromu ve Eritrosit Deformabilitesi

Orak hücre sendromu veya hastalıkları hemoglobin S geninin kalıtsal olarak geçtiği tüm hastalıkları kapsar. Hemoglobin S heterozigot durumunda (HbAS veya orak hücre karakteri), homozigot durumda (HbSS veya orak hücre anemisi ya da orak hücre hastalığı), diğer beta zincir anomalisi gösteren anomalilerle (HbSD, HbSC, HbSE hastalığı), beta talasemi ve alfa talasemi ile birlikte bulunabilir.

HbS (Orak hücre hemoglobini) beta zincir geni DNA'sında 6. kodondaki adenin yerine timin (GAG yerine GTG) geçmesiyle oluşan mutasyon sonucu beta-zincirinin 6. pozisyonundaki glutamik asidin yerinde valin bulunan bir anormal hemoglobindir. HbS'in özelliği deoksi durumda çözünürlüğünün azalmasıdır. Bu hemoglobin molekülleri oksijeni azalmış ve oksijensiz ortamda agregasyona uğrayarak uzun polimerler meydana getirmek üzere birbirleri ile birleşirler ve taktoid adı verilen sıvı kristallerden oluşan bir jel halini alırlar. Polimerizasyon olayında ilk basamak çekirdeklenme safhası olup HbS molekülleri küçük agregatlar oluştururlar. Daha sonra bu agregatlar takip eden hemoglobin molekülü ilavesi ile büyüyerek lineer olarak sıralanıp, elektron mikroskopta spiral görünümlü, elektron yoğun ve içi boş yapılar şeklinde görülür. Polimerizasyon olayı sonucunda eritrositin hücre içi bileşeni, yani hemoglobin, yapışkan bir jel halini alır. Bu durum eritrositin şeklini bozup, esnekliği kaybolmuş, küçük damarlardan ya zorlukla geçen ya da hiç geçemeyen, orak şeklinde hücrelerin oluşmasına neden olur. Eritrositin şekil değişikliği polimerize olmuş S hemoglobinin hücre içinde meydana getirdiği jel tarafından oluşturulan pasif bir olay olduğu için polimerizasyon olayı geriye dönüşümlüdür. Hemoglobin moleküllerinin tekrar oksijenlenmesi ile agregasyona uğramış moleküller dağılır ve jel sıvı halini alır. Orak şeklini almış eritrosit membranı polimerizasyondan zarar görmedikçe eritrosit normal şeklini tekrar kazanır. Oraklaşma ve normalleşme dönemlerinin tekrarı ile geri dönüşümsüz oraklaşmış eritrositler meydana gelir. Orak şeklindeki eritrositlerin dolaşımdan uzaklaştırılma hızı kemik iliğinin bu olayı kompanse etme kapasitesini aştığı zaman hemolitik anemi gelişir. Küçük damarların orak hücrelerle tıkanması tekrarlayan infarktlara ve özellikle dalak, akciğerler, böbrekler ve beyin gibi organların zarar görmesine neden olur. Küçük kan damarlarının orak hücrelerle tıkanması sadece

hücre şekillerinin bozukluğu ve rijiditesine yani eritrositlerin esnekliğinin kaybına bağlı değildir. Bunun yanında, hücre membran değişikliği sonucu orak hücreler endotele de yapışmaktadır.

HbS içeren eritrositlerin oraklaşması yalnız eritrositin içindeki hemoglobinin oksijenlenme derecesine bağlı olmayıp, HbS miktarının fazlalığına, pH'nın düşüklüğüne (asidoz) ve hücrenin dehidrate olmasına da bağlıdır. Bunun haricinde HbS moleküllerinin agregasyonu sonucu oluşan lineer yapıların meydana gelişi ani bir olay değildir. Oraklaşmaya zemin hazırlayan şartların oluşmasından itibaren geçen süre önemlidir (39, 117).

Vizkositometre, ektasitometre ve mikropipet aspirasyon gibi çeşitli teknikler kullanılarak oraklaşmış eritrositlerin deformabilitelerinin azaldığı gösterilmiştir (4, 118, 120).

2.1.2.6. Eritrosit Metabolizması

Eritrositler enerjiyi Embden-Meyerhof yolundaki (anaerobik glikoliz) glukozdan sağlar. Anaerobik glikoliz sırasında glukoz laktata dönüştürülür ve enerji için adenosin trifosfat (ATP) üretilir. Glukozun yaklaşık % 10'u nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADP) indirgenmiş hali olan ve hücrelere redüksiyon potansiyeli sağlayan NADPH'ın üretildiği hegzos monofosfat şantına aktarılır. Embden-Meyerhof yolundaki ilk enzim glikoz-6-fosfat-dehidrogenazdır. Embden-Meyerhof dışındaki ikinci bir yolda hemoglobinin oksijene olan affinitesinin primer fizyolojik düzenleyicisi olan 2,3-difosfogliseratın (2,3-DPG) üretildiği Rapoport-Luebering şantıdır. Embden-Meyerhof yolunun bir başka ürünü de nikotinamid adenin dinükleotidin (NAD) indirgenmiş hali olan NADH'tır.

Normal şartlarda hemoglobinin demir atomları ferröz (Fe^{2+}) formdadır. Demir atomu methemoglobin ve süperoksidin (O_2^-) oluşumu sırasında ferik (Fe^{3+}) forma okside olur. İçerdiği demir atomları ferik formda olan methemoglobinin oksijen taşıma kabiliyeti yoktur. Yeniden hemoglobine dönüşmedikçe, methemoglobin okside olarak hemikromları ve daha sonra da Heinz adı verilen denatüre hemoglobin agregatlarını oluşturur. Hemikromlar ve Heinz cisimcikleri hücre membranına tutunarak ona zarar

verebilirler. Hatta yeterli miktarda olduklarında eritrositin parçalanmasına (lisis) neden olabilirler. Methemoglobin redüktaz enzim sistemi methemoglobinin yeniden hemoglobine indirgenmesini sağlar. Bu enzim sistemi glikoliz sırasında üretilen NADH'ın varlığına ihtiyaç duyar. Süperoksit (O_2^-) güçlü bir oksitleyici ajandır ve nötralize edilmezse eritrosite zarar verir. Süperoksit dismutaz enzimi süperoksidi hidrojen perokside (H_2O_2) dönüştürür; hidrojen peroksit de oksidan özellik taşıdığından indirgenmiş glutatyon (GSH) tarafından nötralize edilmelidir. Okside glutatyon (GSSG) hegzos monofosfat şantında elde edilen NADPH'ın varlığında glutatyon redüktaz tarafından indirgenir. Eğer methemoglobin hemoglobine indirgenmez ise veya GSSG glutatyonla indirgenirse eritrosit zamanından önce parçalanır (hemoliz) (39).

2.1.2.7. Eritrositlerde Hücre İçi Sinyal İleti Mekanizmaları

İnsan eritrositleri, non-eritroid hücrelerde iyi tanımlanmış sinyal ileti mekanizmalarına aracılık eden değişik türde reseptör ve onların efektörleri ile donatılmışlardır. Eritrosit komponentlerinden bazılarının eritrosit öncül hücrelerinin fonksiyonları için kritik olan sinyal ileti yollarının artıkları olabileceği ve olgun eritrositlerde bunlara daha fazla ihtiyaç olmayabileceği söylenmiştir. Fakat birtakım sinyal komponentleri eritrositlerin ilişki içinde oldukları diğer hematopoetik hücrelerin ve endotel hücrelerinin ihtiyaçlarını fark etmesine ve bunlara cevap vermesine olanak sağlar. Bu sinyal komponentlerinin en önemli kısmını hormonlar ve hormon reseptörleri oluşturmaktadır (121).

Eritrositlerde diğer hücre tiplerinde bulunanlara benzer yapısal özelliklere sahip insülin reseptörlerinin varlığı bildirilmiştir. Bu reseptörler öngörüldüğü gibi insülin ile stimüle edilen tirozin kinaz aktivitesi gösterirler ve diabetle ilişkili durumlarda diğer dokularda bulunan insülin reseptörleri ile benzer anomaliler gösterirler. Eritrosit insülin reseptörlerine insülin bağlanması reseptörlerde kısa süreli ve geri dönüşümlü bir downregülasyona neden olur. Bu olay reseptör internalizasyonuna bağlı gibi görünmektedir. Aynı zamanda eritrosit yaşam süresi boyunca bu reseptörlerin sayısı giderek azalmaktadır. İnsülinin reseptörüne bağlanması eritrositlerde bir miktar

fonksiyonel değişime neden olsa da bu değişimlerin tümü her zaman gerek eritrosit ve gerek de organizma için gözlenebilir koruyucu etkilerle sonuçlanmaz (121).

İnsülin, plazmadan eritrosit içine Mg^{2+} transportunu sağlıyor görünmektedir ve bu durumun bozulduğu diabetik kişilerde açıkça görülmektedir. Bununla birlikte eritrositlerin selektif olarak insüline cevabının bozulması ile ilgili herhangi bir patoloji ya da disfonksiyon bildirilmemiştir. Mg^{2+} ile benzer şekilde insülinin eritrositlerde Na^+/H^+ değişimini de stimüle ettiği gösterilmiştir. Birtakım çalışmalar da insülin tedavisinin eritrosit deformabilitesini arttırdığını gösterirken yine aynı çalışmalar açığa çıkarmaktadır ki insüline bağımlı diabetes mellitusla birlikte bulunan insülin eksikliği eritrosit deformabilitesinde bir azalmayla sonuçlanmaktadır. İnsülinin eritrositlerdeki muhtemelen doğruluğu kabul edilebilen en önemli özelliği hücre içine glukoz alınımını indüklemesi olmakla birlikte, ki bu istenen kan glukoz düzeylerinin sağlanmasına katkıda bulunur, eritrositlerde ne yağ asidi ne de glikojen biyosentezi olmadığından glukoz girişi sürekli olmaktadır ve bu nedenle insülinin buradaki önemi sorgulanmalıdır. Bu fonksiyonel belirsizliklere rağmen, sağlıklı kişilerin trombositlerinin insüline bağımlı diabeti olanlardan elde edilen eritrositlerin varlığında aşırı derecede kümelenediği ve normogliseminin sağlanması ile bu durum düzeltilebildiği bildirilmiştir (121, 122, 123, 124).

Öte yandan eritrositlerde insülin-benzeri büyüme faktörü (İGF-1) reseptörlerinin de bulunduğu ve eritrositler yaşlandıkça sayılarının azaldığı bildirilmiştir (125).

Eritrositlerde adrenerjik reseptörlerin agonistler tarafından uyarılması ve bunun sonucunda sAMP düzeylerindeki maksimum artışlar plazma bağımlıdır. Şöyle ki eritrositlerde adrenerjik reseptörlerin sayısının da plazmasız mediumda azaldığı rapor edilmiştir (121, 126).

Katekolaminlerin eritrosit deformabilitesini azalttığı bildirilmiştir. Huestis ve McConnell, 10^{-6} M adrenalin uygulamasının eritrosit membran viskozitesini arttırdığını bildirmişlerdir. Bunun nedeninin membranın sodyum geçirgenliğinin artması olduğu ve bu nedenle olaya hücresel şişmenin de dahil olduğu bildirilmiştir (127).

Bu bulgularla tutarlı olarak Rasmussen ve arkadaşları düşük dozlarda (10^{-11} - 10^{-12} M) adrenalin ve izoproteronolün eritrositlerin filtre edilebilirliğini azalttığını bildirmişlerdir (128). Bu eritrosit deformabilitesinin azaldığını işaret eden bir bulgudur. Daha sonra yapılan çalışmalarda da insan eritrositlerinde katekolaminlere cevaben sAMP düzeylerinin arttığı bulgusu desteklenmiştir (126, 128, 129).

Öte yandan muskarinik kolinerjik reseptörlerin varlığı ve kolinerjik ligandların eritrosit içine Ca^{2+} girişini stimüle ettiği ve bununla birlikte sGMP düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (127, 130).

Rasmussen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, prostaglandin reseptörlerinin varlığı ve prostaglandin E_2 'nin eritrosit filtre edilebilirliğini azalttığını bildirilmiştir (128). Daha sonra yapılan çalışmalar da prostaglandin E_2 tarafından eritrosit deformabilitesinin azaltıldığını desteklemektedir. Ayrıca bu çalışmalar göstermiştir ki prostaglandin E_2 Gardos kanallarını aktive ederek Ca^{2+} bağımlı potasyum dışı akışını artırmakta ve osmotik olarak hücrenin büzüşmesine neden olmaktadır. Diğer taraftan ise prostaglandin E_1 'in de eritrosit membranına bağlandığı ve prostaglandin E_1 ile indüklenen eritrosit deformabilitesinde artış olduğu bildirilmiştir (128, 131, 132, 133, 134, 135, 136).

Bunlara ilaveten eritrosit membranında tiroid hormonları triiyodotironin ve tiroksin için yüksek afiniteli bağlanma bölgelerinin olduğu gözlenmiştir. Bu hormonların en önemli etkisi, olasılıkla kalmodulin sensitivitesinin artması yolu ile eritrosit membranı Ca^{2+} -ATPazının aktivasyonudur. Paratiroid hormonunun da Ca^{2+} bağımlı bir biçimde eritrosit deformabilitesini azalttığı gösterilmiştir (137, 138).

Diğer taraftan eritrosit sinyal komponentlerinden bahsedecek olursak; aktin dışındaki tüm eritrosit membran iskelet proteinleri geri dönüşümlü bir biçimde fosforilasyon reaksiyonlarına uğrarlar. Eritrositler protein kinaz C, kazein kinaz I ve II, sAMP- bağımlı protein kinaz, Ca^{2+} veya Ca^{2+} /kalmodulin-bağımlı protein kinaz ile bir takım tirozin kinaz ve tirozin fosfatazları içermektedir. Eritrosit membranı ile ilişkili protein tirozin kinazlar p72^{syk} ve src ailesi ile ilişkili kinaz p56/53^{lyn} olarak tanımlanmışlardır. Protein tirozin fosfatazlar da aynı zamanda eritrosit membran ve sitozolünden saflaştırılmışlardır. Eritrositlerde protein tirozin fosfatazlar için major

substrat anyon değiştirici, band 3 tür. Band 3'ün sitoplazmik parçasının tirozin 8 fosforilasyonu eritrosit glikolizisinin düzenlenmesi ve hücre şekli ile ilişkilidir. Eritrositlerdeki diğer bir tirozin fosforilasyonu bağımlı fenomen ise eritrosit volüm değişikliklerini ve eritrosit membranından K^+-Cl^- kotransportunun indüksiyonunu içerir (121, 139).

Hemoglobin dışında en fazla bulunan protein olan kalmodulin eritrosit sitozolünde mikromolar konsantrasyonlarda bulunur. Kalmodulin eritrosit şeklinin düzenlenmesinde ve Ca^{2+} 'a bağımlı membran stabilite azalmasında rol alıyor görünmektedir. Kalmodulin için primer hedef Ca^{2+} pompası olmakla birlikte aynı zamanda addusin, protein 4.1 ve spektrine bağlandığı bildirilmiştir (140, 141, 142).

Öte yandan fosfoinozitidlere bakacak olursak, fosfatidilinozitol ailesi üyeleri total eritrosit membran fosfolipidlerinin % 2 ile % 5'ini oluşturur. Fosfatidilinozitol lipidler, kinazlar ve esterazlarla katalize edilir ve fosfat döngüsüne girerler. Böylece eritrosit fosfoinozitidlerinin çeşitli protein etkileşimlerini düzenlerler. Buna ilaveten eritrositlerde fosfatidilinozitol lipidlerini diaçilgliserol ve inozitol fosfatlara hidrolize edebilen ve sonrasında intraeritrositik kalsiyum artışına neden olan fosfoinozitidaz C de bulunmaktadır. Hücresel kalsiyumun hormonal stimülasyonla artması indirekt olarak fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat düzeylerinde değişiklik oluşturur. Fosfoinozitidler aynı zamanda protein 4.1 ve glikoforinler arasındaki fosfatidilinozitole duyarlı etkileşimleri etkileyerek veya eritrosit membranının iç ve dış yaprakları arasındaki fosfolipid dağılımına etki ederek hücre şeklinin düzenlenmesinde de rol oynarlar (143, 144).

Bunlara ilaveten eritrositlerde heterotrimerik G proteinlerinin varlığı birçok çalışmada iyi bir şekilde belgelenmiştir. Psödohipoparatiroidizm hastalarında yapılan bir çalışmada bu hastaların eritrositlerinde stimülatör G aktivitesinde azalma olduğu bildirilmiştir (121). Diğer taraftan insan eritrosit membranında Ca^{2+} -ATP az aktivitesinin modülasyonunda G proteininin rol aldığı bildirilmiştir (121).

Ayrıca küçük GTP bağlayıcı Rho GTPazların eritrositlerdeki rolleri henüz tam olarak çalışılmamıştır. Rho A proteininin eritrositlerde hem sitozol hem de membranda

varlığı tespit edilmiş ve spesifik olarak eritrosit membranının sitoplazmik bölgesine yüksek afinite ile bağlandığı bildirilmiştir. Diğer taraftan Ras ile ilişkili GTPaz Rap-1' in orak hücre hastalığında eritrositlerin adezyonunda rol aldığı bildirilmiştir. Buna ilaveten Kalfa ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada da Rac-1 ve Rac-2 GTP azların eritrosit hücre iskeleti dinamiğini modüle ettiğini ve bunu F-aktin aracılığı ile yaptığını bildirmişlerdir (337).

2.1.2.7.1. Nitrik Oksid ve Eritrositler

Nitrik oksid (NO) esas olarak çözünür guanilat siklazın aktivasyonu ile siklik guanozin monofosfat (sGMP) düzeylerini artırır ve bunun sonucu olarak da sGMP bağımlı bir protein kinaz olan protein kinaz G (PKG) aktive olur. Vasküler endotel NO için önemli bir kaynaktır. İlginç olarak eritrositler hipoksi ve mekanik deformasyona cevaben adenozin trifosfat (ATP) salarak endotel hücrelerden NO salınımını düzenleyebilir (145, 146).

Yüksek parsiyel oksijen basınçlarında NO hemoglobine yüksek affinite ile bağlanıyor görünmektedir. Oysa düşük parsiyel oksijen basınçlarında NO, hemoglobinden ayrılarak prekapiller rezistans arteriyollerde kan akımını artırır (146).

Son zamanlarda band 3'ün eritrositlerde NO salınımını sağlayabildiği gösterilmiştir. Öte yandan band 3'ün sitozolik parçasının S-nitrozillenmiş hemoglobinin oksijene afinitesini büyük ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Bu da göstermektedir ki hücre içindeki S-nitroso-Hb-band 3 kompleksi NO'nun hedeflenmesinde rol oynayabilir (147).

Bunların dışında eritrositlerin (inaktif olduğu düşünülse de) kendi nitrik oksid sentaz enzimlerine sahip olduğu bildirilmiştir (7). Fakat daha sonra yapılan bir çalışma ise eritrositlerde aktif nitrik oksid sentazın varlığını desteklemektedir (7). NO/sGMP/PKG yolağının bir sonraki komponenti olan çözünür guanilat siklaz da eritrositlerde bulunmaktadır (148).

Hem eritrositlerde hem de vasküler düz kas hücrelerinde K^+-Cl^- kotransportunun NO ile aktivasyonu genistein (protein/tirozin kinaz inhibitörü) ve kalikulin (serin/treonin fosfataz inhibitörü) tarafından inhibe edilir. Bu da göstermektedir ki NO bir fosforilasyon/defosforilasyon reaksiyon kaskadını hedef alır. Düz kas hücrelerinde NO'nun sGMP bağımlı yolla fosfotirozin fosfataz-1B ve 2SH₂ bölgesi içeren protein tirozin fosfatazı (SHP-2 tirozin fosfataz) aktive ettiği gösterilmiştir (149). Eritrositlerde nitrovazodilatörlerin K^+-Cl^- kotransportu üzerine stimüle edici etkileri sGMP bağımlı protein kinaz aktivitesi ile olmaktadır (149).

İnsan eritrositlerinde SHP-2 tirozin fosfataz ve protein tirozin fosfataz 1 B proteinleri bulunmaktadır ve bu tirozin fosfatazlar band 3 proteini ile ilişkilidirler. Öte yandan NO eritrositlerde Na^+/H^+ değiş tokuşunu aktive eder. Bu olayın sGMP bağımlı olduğu düşünülmektedir (98).

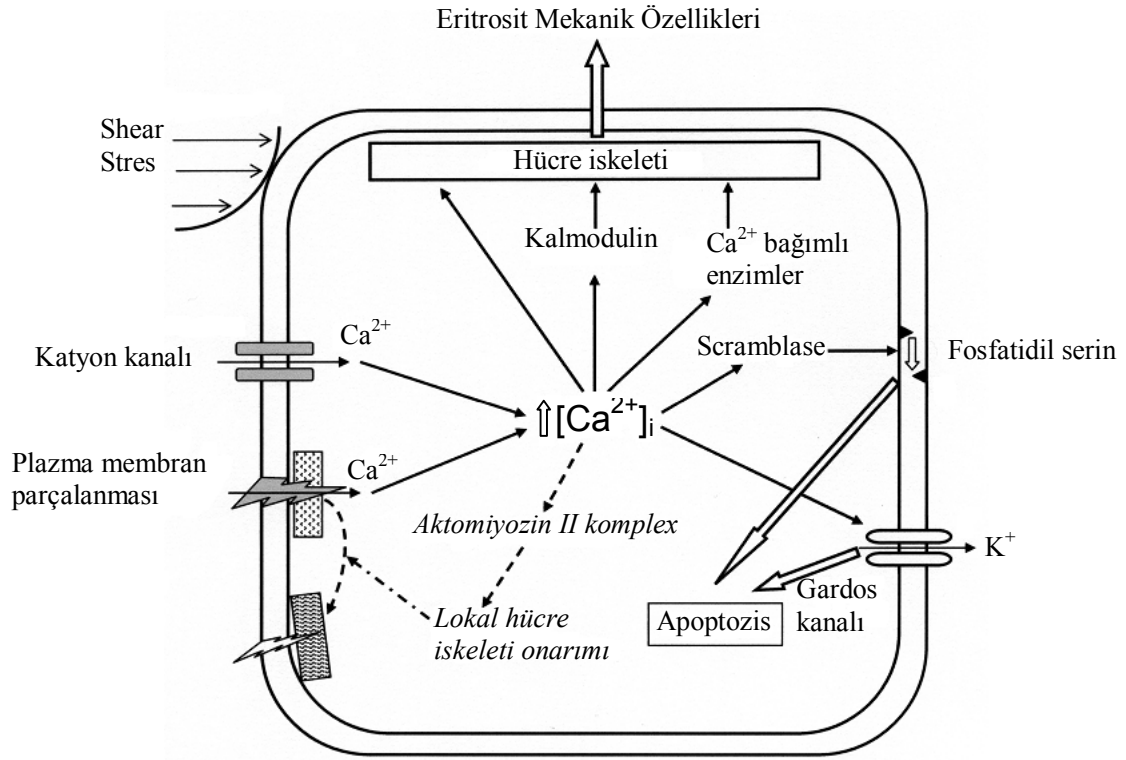
Ayrıca eritrosit şekli de NO'den etkilenmektedir. NO eritrosit membranının reolojik özelliklerini düzeltir. Ancak sepsiste NO eritrosit deformabilitesini azaltmaktadır (150). Diğer bir yandan sGMP bağımlı sinyal ileti sisteminin atrial natriüretik peptid ile aktivasyonu eritrositlerin filtre edilebilirliğini artırır.

2.1.2.7.2. Shear Stresle İndüklenen ve Kalsiyum Bağımlı Mekanizmalar

Eritrositler mikrosirkülasyonda maksimum mekanik yüke maruz kalırlar. Mekanik stres, plazma membranının bütünlüğünü sağlamak için birçok sinyal yolağını ve hücre iskeleti reorganizasyonunu aktive eder (151).

Endotelial hücrelerde shear stres ile indüklenen çok sayıda sinyal mekanizması incelenmiştir. Endotelial hücrelerde, shear stresle indüklenen sinyal mekanizmalarında integrinler ve heterotrimerik G proteinlerinin rolü iyi bilinmektedir. Heterotrimerik G proteinlerinin Gi subtipi, adenil siklaz ve protein kinaz A sinyal transdüksiyon yollarının komponentleridir. Bu moleküller eritrositlerde deformasyonla indüklenen

ATP salınımı için gerekli olmakla birlikte vasküler rezistansı düzenlemede rol oynarlar (146).



Şekil 2.7. Eritrositlerde shear stres ile indüklenen Ca^{2+} -bağımlı mekanizmaların şematik gösterimi (98).

Mekanik stres hücre membranının parçalanmasına neden olmaktadır. Fizyolojik shear stres eritrosit membranının monovalan katyonlara ve Ca^{2+} 'a geçirgenliğini artırır. Membranın mekanik olarak parçalanması ve mekano-sensitif iyon kanallarının aktivasyonu shear stres ile indüklenen iyon akışları için major yollardır. Shear strese benzer bir biçimde hücresel şişme de eritrositlerde mekano-sensitif Ca^{2+} 'a geçirgen katyon kanallarını açar ve hücre içine Ca^{2+} girişine neden olur. Bunun yanı sıra hücre büzüşmesi sırasında ise Ca^{2+} girişi hücresel şişme ve intrasellüler Cl⁻ artışı sırasında inhibe olan non-selektif katyon kanallarından olmaktadır. Buna ilaveten insan eritrositlerinde gerilimle aktive olan içe-yönelik düzeltici anyon kanalları da mevcuttur (98).

Mekanik stres ile aktive olan katyon kanallarından hücreye giren kalsiyum, hücre içinde düzenleyici mekanizmalarda görev alan çeşitli proteinleri aktive etmektedir. Bu proteinler arasında kalmodulin, Ca^{+2} /kalmodulin bağlı protein kinaz, fosfolipaz C ve protein kinaz C yer almaktadır. Ca^{+2} , bu proteinler arasından özellikle kalmoduline bağlanmak yoluyla hücre membranının yapısal ve mekanik özelliklerinin düzenlenmesinde önemli roller üstlenir. Ca^{+2} ve kalmodulin etkilerini başlıca eritrosit membranında bulunan kalsiyum pompası, addusin, protein 4.1 ve spektrin üzerinde gösterir (152, 153, 154, 121, 59).

Eritrosit yaşlanmasına bağlı ortaya çıkan hücre içi Ca^{2+} artışını Gardos kanalı, scramblase (fosfolipid asimetrisini sağlayan taşıyıcı) ve kalpain (Ca^{2+} bağımlı proteaz) aktivasyonu takip eder. Bu olaylar da programlı hücre ölümü ve eritrositlerin dolaşımdan uzaklaştırılmalarında rol almaktadır. Eritrosit yaşlanması, gerime duyarlı- Ca^{+2} 'a geçirgen katyon kanallarının aktivitesinde artış meydana getirirken hücreden Ca^{+2} çıkışını sağlayan Ca^{+2} pompasının aktivitesinde de düşüşe neden olmaktadır (155, 156, 157).

Çekirdekli hücrelerde, programlı hücre ölümü sürecinin tipik göstergeleri; hücre büzülmesi, membran katlanması ve fosfotidilserin asimetrisinin bozulmasıdır. Bunlar aynı zamanda Ca^{+2} iyonoforu iyonominin ile muamele edilerek hücre içi Ca^{+2} seviyeleri arttırılan eritrositlerde de gözlenmiştir (158, 159, 160). Katyon kanallarından hücre içine Ca^{2+} girişi apoptozisi baskılayıcı Bcl-XL ve apoptozis öncülü Bak tarafından düzenleniyor görünmektedir ve bunlar eritrositlerde eksprese edilmektedir.

Öte yandan plazmada eritrosit canlılığının sürdürülmesini sağlayan çeşitli koruyucu faktörler bulunmaktadır. Bu gibi faktörlerden biri Ca^{2+} 'a geçirgen katyon kanallarını inhibe eden eritropoetindir (161). İlginç olarak da eritrositlerin böbrek medullasında maruz kaldıkları yüksek konsantrasyonda üre ve NaCl eritrositler üzerinde antiapoptotik etki yapmaktadır (162).

Son zamanlarda eritrositlerde osmotik şok, oksidatif stres, enerji azlığı ve Cl^{-} 'un uzaklaştırılması ile aktive edilen non-selektif katyon kanallarından hücre içine Ca^{+2}

girişinin programlı hücre ölümünün başlaması için temel mekanizma olduğu bildirilmiştir (163).

Hücre içine Ca^{2+} girişindeki artış fosfatidilserini membranın iç yüzünden dış yüzüne taşıyan scramblase adlı proteini aktive eder. Hücre membranının dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserin, fagositik hücrelerin eritrositleri tanınmasını kolaylaştırarak dolaşımdan uzaklaştırılmalarına neden olmaktadır (164).

Aynı zamanda mekanik stres de eritrositlerin dolaşımdan uzaklaşmasını sağlamaktadır. Mekanik stres bu etkisini, mekano-sensitif katyon kanallarının aktivasyonu ile hücreye Ca^{2+} girişine neden olarak yapar. Bu olay Gardos kanal aktivasyonuna neden olur ve bu şekilde hücre dehidrasyonu ve büzüşmesi meydana gelmektedir. Ayrıca, hücre membranındaki fosfolipid asimetrisi membranın mekanik stabilitesini iyileştirirken sitozolik Ca^{2+} artışları eritrosit membranında vezikül oluşumunu indükler (165).

Öte yandan, membranın mekanik olarak hasarlanması ve Ca^{+2} 'a geçirgen kanalların açılmasına bağlı olarak hücre içine ani Ca^{+2} girişi sadece sözkonusu proapoptotik mekanizmayı stimüle etmekle kalmaz fakat aynı zamanda aktomiyosin II kompleksinin oluşumu ile hücre iskeletinin lokal olarak tamirinin de başlamasına neden olur (166).

Ayrıca eritrosit membran proteinlerinden spektrin Ca^{+2} ve Mg^{+2} 'a özgü bağlanma bölgeleri içerdiğinden, mekanik stres altında eritrosit yapısal bütünlüğünün sürdürülmesinde spektrin divalan katyonlara bağlanması ile mekanik özelliklerinde meydana gelen değişimlerin önemli olabileceği bildirilmiştir (167).

Eritrosit membranında, mono ve divalan katyonların konsantrasyon artışlarına cevaben geri dönüşümlü ve enerji gerektirmeyen kontraksiyonlar meydana gelmektedir. Ca^{2+} ve Mg^{2+} triton ile muamele edilmiş eritrosit membranlarında geri dönebilen şekil değişikliklerini indükler ve bu membranların kontraksiyonlarından Ca^{2+} sorumludur (98). Diğer taraftan göze çarpan bir diğer olay şudur ki hem Ca^{2+} aracılıklı yollar ve hem de NO ile indüklenen olaylar, mekanik stres altında hücre içine artmış Ca^{2+}

girişlerinin eritrosit deformabilitesini bozabildiği mikrosirkülasyonda kendiliğinden başlatılır (168).

2.1.2.8. Eritrosit Deformabilitesi Ölçüm Yöntemleri

Vücudun farklı bölgelerinde kanın akış kapasitesini değerlendirmek için eritrosit özelliklerinin doğru bir şekilde değerlendirilmesini sağlayabilen tekniklere ihtiyaç vardır. Bu tekniklerden eritrosit deformabilitesinin ölçümü için kullanılanları şu şekilde sıralanabilir.

1. Mikroskop altında direkt olarak eritrositlerin nasıl şekil değiştirdikleri incelenebilir.
2. Bir tek eritrositi belli çapta bir mikropipete çekmek için gerekli olan basınç ölçülebilir.
3. Osmotik hemoliz yöntemi kullanılabilir.
4. Filtrasyon yöntemi kullanılabilir: Bu yöntemde eritrositlerin belli çapta porlara sahip filtrelerden sabit basınç altında geçiş süresi veya sabit sürede geçişleri sırasında meydana gelen basınç değişimleri ölçülür. Daha uzun geçiş süresi deformabilitenin bozulduğuna işaret eder.

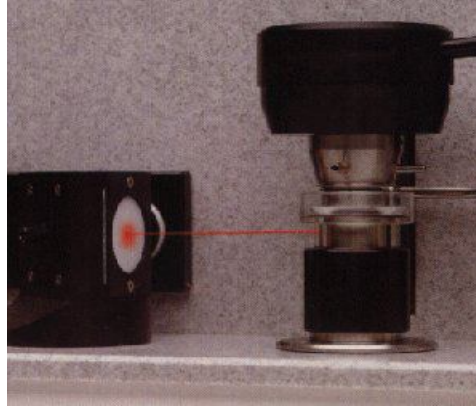
Coulter tipi kan sayım cihazlarının ortalama eritrosit hacmini belirlemek amacıyla eritrositleri belli çaptaki porlardan geçirdikleri, dolayısıyla da deformabilitesi bozuk eritrositlerin ortalama eritrosit hacmini olduğundan daha yüksek gösterebileceği akılda bulundurulmalıdır.

5. Bu tekniklerden bir diğeri ise “Laser Optical Rotational Cell Analyser” LORCA ile eritrosit deformabilitesinin değerlendirilmesidir.

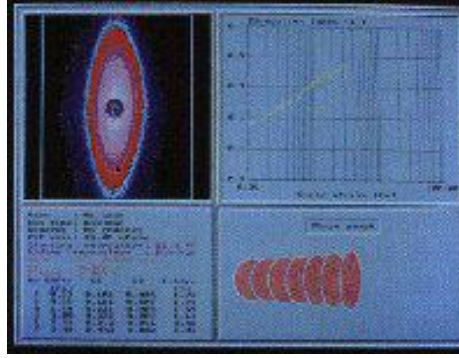
2.1.2.8.1. LORCA ile Eritrosit Deformabilitesi Ölçümü



Şekil 2.8. LORCA Ektasitometre cihazı (I) (169).



Şekil 2.9. LORCA Ektasitometre cihazı (II) (169).



Şekil 2.10. LORCA Ektasitometre cihazı (III) (169).

LORCA araştırma merkezlerinin hemoreoloji laboratuvarları, hematoloji bölümleri, yoğun bakım üniteleri için önemli bir araçtır. Bir cam kupa içine daldırılmış statik bir metal silindirden oluşur. Cam kupanın döndürülmesiyle, silindir ile kupa arasındaki çok dar aralıkta sıvılar için basit bir kayma stresi yaratılır.

Kayma stresi = kayma hızı x ortam viskozitesi ($\tau = \eta \times \gamma$)

τ = Kayma stresi (Pa)

η = viskozite (mPa.sn)

γ = Kayma hızı (1/sn)

Kupanın dönüş hızı ve sıvının konduğu aralık verileri kullanılarak kayma hızı hesaplanır. İstenen kayma hızı bilgisayar yardımı ile uygulanabilir.

Kayma hızı (Shear rate): $\gamma = [(4\pi \times R_b \times R_c) / (60 \times (R_c^2 - R_b^2))] \times N$

γ = kayma hızı (1/sn)

R_b = Silindirin çapı (mm)

R_c = Kupanın çapı (mm)

N = Kupanın dönme hızı (dönüş/dk)

Aralıktaki kana değişik kayma stresleri uygulanarak bir lazer ışını yardımıyla eritrositlerin görüntüleri saptanarak bilgisayarda deformabiliteleri veya agregasyonları hesaplanır.

EDTA'lı kandan alınan küçük bir örnek 30 mPa.sn viskozitedeki PVP solüsyonunda dilüe edilir. Bu süspansiyon kupa ile silindir arasına konur. Ortam sıcaklığı 37°C'ye getirilir. Bilgisayar kontrollü olarak 0.01-100 Pa arasında kayma stresleri uygulanır. Kayma stresi altında eritrositler şekil değiştirir (elongasyon). Kan süspansiyonunun içinden geçen lazer ışınları eritrositler tarafından kısmen kırılır. Eritrositlerin kırıkları ışınlar göre, projeksiyon ekranında eritrositlere ait bir yansıma oluşur. Bu yansımaları kaydeden bir kamera verileri bilgisayara aktarır. Bilgisayar bu yansıma verilerine uyan en iyi elipsi çizdirir. Bu elipsin uzun ve kısa çapları ölçülerek eritrositlerin elongasyon indeksleri (EI) hesaplanır.

$$EI = (A-B)/(A+B)$$

Seçilen her kayma stresi için ayrı ayrı EI hesaplanır. Her strese eritrositlerin verdiği şekil değiştirme cevabı ölçülmüş olur (170, 171, 172).

2.2. G Proteinleri

Sinyal ileten G proteinleri GTP'azlar iki sınıfa ayrılır.

- Heterotrimerik G proteinleri
- Düşük molekül ağırlıklı G proteinleri (11).

2.2.1. Heterotrimerik G Proteinleri

Heterotrimerik G proteinleri hücre membranında bulunan ve hücre içine sinyal ileten moleküler yapılardır. Hücre membran reseptörleri bir agonist tarafından işgal edildiği zaman, reseptör aktivitesinde uygun yapısal değişiklikler oluşturulur ve bu

sinyal ilgili G proteinini aktive eder. Bunun sonrasında reseptöre ait hücre içi efektör yapılar aktive olarak biyolojik etkileri meydana getirirler (11).

2.3.2. Düşük Molekül Ağırlıklı G Proteinleri

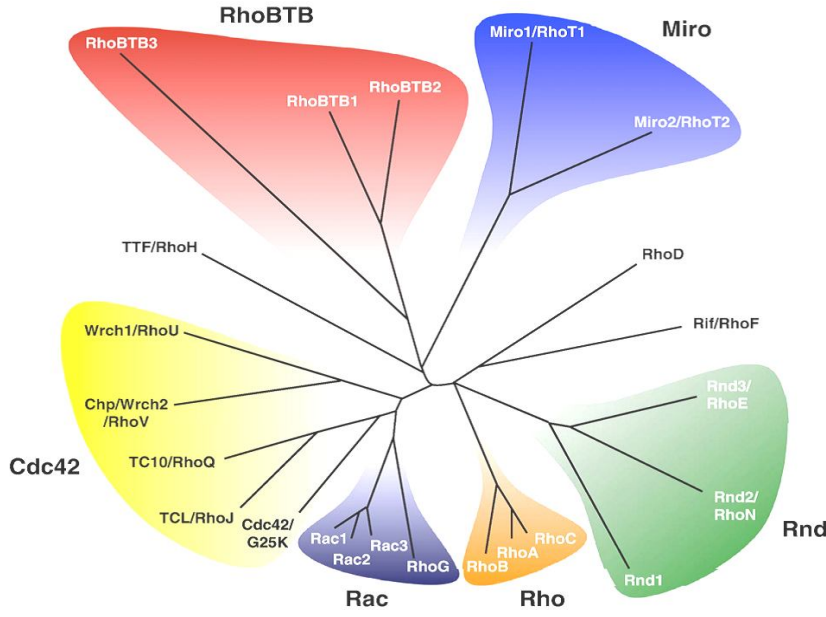
Küçük GTP bağlayıcı proteinler (Düşük molekül ağırlıklı G proteinleri) molekül ağırlıkları 20-40 kDa olan monomerik yapıda G proteinleridir. Mayalardan insanlara kadar tüm ökaryotlarda bulunur ve 100'den fazla üyesi olan Ras superfamilyasını oluştururlar. Ras superfamilyasını oluşturan proteinler sırasıyla; Ras, Rho/Rac/Cdc 42, Rab, Sar1/Arf ve Ran proteinlerinden oluşmaktadır (12, 13, 14).

Düşük molekül ağırlıklı G proteinleri birçok hücrel fonksiyonu düzenlerler. Örneğin Ras ailesi gen ekspresyonunu, Rho ailesi (Rho/Rac/Cdc42) hücre iskeleti reorganizasyonunu ve gen ekspresyonunu, Rab ve Sar1/Arf ailesi intrasellüler vezikül trafiğini, Ran ailesi G₁, S ve G₂ fazlarında nükleostoplazmik transportu ve M fazındaki mikrotübül organizasyonunu düzenler (14).

2.3.3. Rho Proteinleri

Memelilerde Rho ailesi üyeleri 8 grupta toplanmaktadır;

- Rac (Rac1-3, RhoG),
- Cdc42 (Cdc42, TC10, TCL, Chp, Wrch-1),
- Rho (RhoA, RhoB, RhoC),
- RhoD (RhoD ve Rif),
- RhoH/TTF,
- RhoBTB (RhoBTB1 ve RhoBTB2),
- Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE),
- Miro (Miro-1 ve Miro-2) (15).



Şekil 2.11. Rho ailesi küçük GTPazlar (173).

RhoA, vücutta en fazla eksprese edilen ve en çok çalışılan Rho proteini alt tipidir. Rho proteinleri, başlıca hücre iskeleti kontrolünden, stress liflerinin yapılanmasından ve fokal adezyondan, (174), hücre şeklinden (175), agregasyonundan (176), hücre hareketinden (177) ve düz kas kasılmasından (178) sorumludurlar. Ayrıca nörit retraksiyonu (179) ve sitokinezis (180) gibi birçok hücrel fonksiyonda önemli rol oynarlar.

2.3.4. Rho Aktivitesinin Düzenlenmesi

Küçük G proteinleri diğer G proteinleri gibi guanindifosfat (GDP) ve guanin trifosfat (GTP) ile spesifik etkileşme ve GTP'az aktivitesi için gerekli aminoasit dizilimine sahiptirler ve efektörleri ile etkileşime girecek özelleşmiş bölgeleri vardır (18).

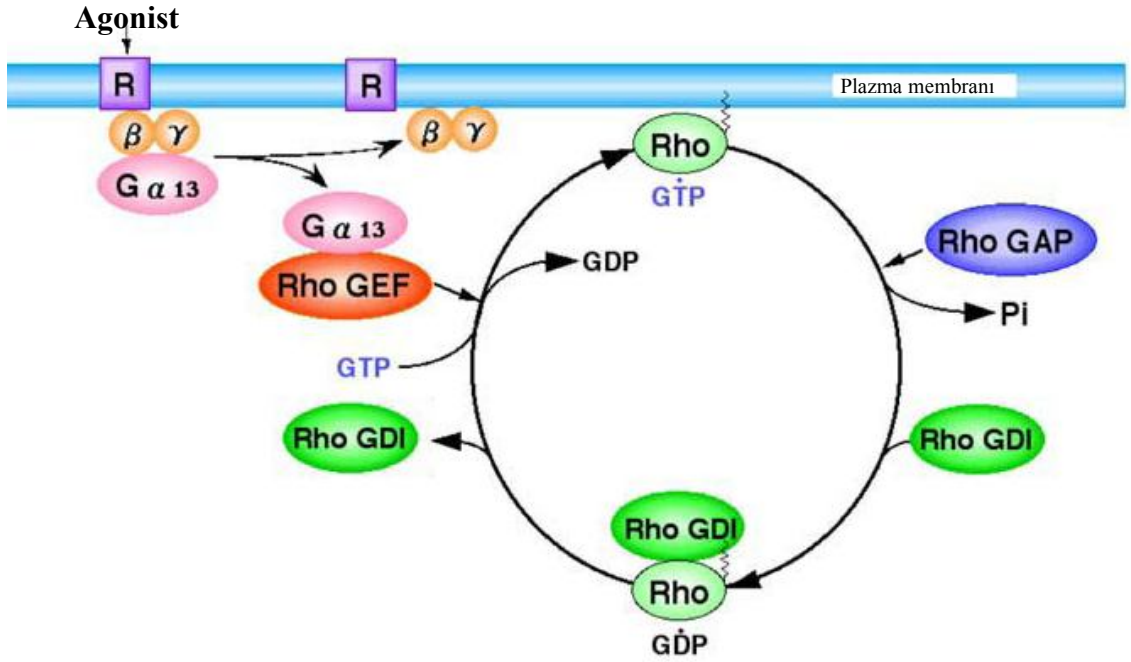
Bu proteinler sentezlendikten sonra palmitoil, farnesil ve geranil gibi lipidler ile posttranslasyonel değişikliklere gereksinim duyarlar. Küçük G proteinlerinin lipid

modifikasyonu, bunların membrana ve düzenleyicilere bağlanmaları ve alt efektörlerini aktive edebilmeleri için gereklidir (181).

Küçük G proteinleri, GDP-bağlı inaktif ve GTP-bağlı aktif olmak üzere birbirine dönüşebilen iki forma sahiptir. Rho'nun aktivitesi siklik olarak düzenlenir. Rho aktivitesinin GTP'az aktive edici protein (GAP) ve GTP'az ayrıştırıcı inhibitör (GDI) olmak üzere iki negatif ve guanin nükleotid değiştirici faktör (GEF) olmak üzere bir pozitif düzenleyicisi vardır. İstirahattaki hücrelerde Rho-GDP disosiyasyon inhibitörü (Rho-GDI), GDP-Rho'ya bağlanır ve onu membrandan sökerek sitozole getirir. Hücreler bazı agonistlerle stimüle edilirse Rho spesifik GEF'ler, GDP ayrışmasını ve bunu izleyerek GTP bağlanmasını başlatarak Rho'nun aktivasyonunu arttırırlar. Bundan sonra GTP-Rho C-terminali geranil-geranillenmiş kuyruğuyla hücre membranına tutunur ve spesifik hedefleriyle etkileşir. GTPazı aktive eden proteinler (GAP) Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini hızlandırarak ve onu inaktif GDP-Rho'ya dönüştürerek negatif regülatörler gibi çalışırlar. GAP, Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini arttırarak GTP bağlı aktif formunu inhibe eder. Bu GDP/GTP dönüşüm reaksiyonunun hız kısıtlayıcı basamağı GDP-bağlı form'dan GDP'nin ayrılmasıdır. Bu reaksiyon oldukça yavaştır ve GEF tarafından stimüle edilir (181, 182).

Rho'nun aktivitesi G_{12} ve G_{13} proteinleri ile düzenlenir. G_{12} ve G_{13} küçük molekül ağırlıklı GTP bağlayıcı Rho proteinini aktive eder (183, 184).

Sfingozin 1 fosfat (S1P), lizofosfatidik asid (LPA), sfingozilfosforilkolin gibi lizofosfolipidler G proteinlerinin aktivasyonuna aracılık ederek RhoA/ROCK yolunu aktive ederler (185).



Şekil 2.12. Rho ailesi GTPazların aktivasyonu (186).

Kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı bir enzim olan hidrosimetilglutaril Ko-A redüktaz enziminin inhibitörü statinler, geranilgeranilasyonlarını engelleyerek başta Rho proteinleri olmak üzere diğer bazı küçük G proteinlerinin aktivitelerini inhibe ederler (188). Bunun yanı sıra botulinum toksin C3, Rho'yu spesifik olarak ADP-riboziller ve bu nedenle C3 toksin Rho'nun spesifik inhibitörü olarak kabul edilir.

2.3.5. Rho Proteininin Alt Efektörleri

2.3.5.1. Rho-kinaz:

RhoA'nın tanımlanmış ilk efektörü bir serin-treonin protein kinaz olan Rho-kinaz/ROKα/ROCK2'dir. ROKβ/ROCK-1 ise tanımlanan bir diğer izoformdur. 1354 aminoasitten oluşan ROCK-1 proteinini kodlayan gen 18. kromozomda (18q11.1) yer alırken 1388 aminoasite sahip ROCK-2 proteini ise 2. kromozomda (2p24) yerleşen genler tarafından kodlanmaktadır (189). Rho kinazın N-terminal ucunda kinaz bölgesi bulunur ve bu kinaz bölgesi miyotonik distrofi kinaz ile %72 homoloji göstermektedir. Öte yandan Rho-kinazın orta bölgesinde kangal gibi kıvrılmış (coiled-

coil) bölge ve COOH-terminal bölgesinde plekstrin homoloji (PH) bölgesi bulunur. Aktive olmuş Rho, kangal gibi kıvrılmış bölgenin COOH-terminal kısmıyla etkileşerek Rho-kinazın kinaz aktivitesini artırır (190). Rho-kinaz düz kas kasılması, stres liflerinin oluşması ve fokal adezyon, nörit retraksiyonu ve sitokinezde rol oynar ve Rho-kinazın bu etkilerine aracılık ettiği gösterilen çok sayıda substratı bildirilmiştir. Bunlar; myozin hafif zincir fosfatazın myozin bağlayıcı alt ünitesi, myozin hafif zinciri, addusin, intermediyer filamentler, ezrin/radiksin/moesin protein ailesi, vimentin, desmin gibi ara filamentler, glial fibriler asidik protein, nörofilamentler, LIM kinaz ve kofilini içerir (185, 191-202).

Öte yandan Rho-kinaz inhibisyonu yaptığı bildirilen ajanlar ise Y-27632, Y-39983, HA1077 (fasudil), hidroksifasudil, H1152P, GSK-269962A, SB772077 Wf536, Slx2119'dur. Bütün ROCK inhibitörleri ATP bağlanma alanları ile yarışır (19, 202).

2.3.5.2. Myozin Fosfatazın Myozin Bağlayıcı Alt Ünitesi:

Miyozin II'nin miyozin hafif zincirinin fosforilasyonu düz kas ve hücre kasılması, hücre hareketi, yapışması, hücre iskeleti yapısı, sitokinezis, trombosit aktivasyonu ve çeşitli iyon kanallarının etkileri gibi birçok hücreyel fonksiyonlar için önemlidir. Miyozin hafif zincirini (MHZ) defosforile eden miyozin fosfataz enzimi; 37 kDa katalitik alt ünite tip 1 fosfataz (PP1c), 130 kDa miyozin bağlayıcı alt ünite (MBS) ve 20 kDa (M20) küçük düzenleyici alt birimlerden oluşmuştur. MBS'nin N-terminal ucunda ankrin tekrarları bulunur ve hem katalitik ünite PP1c ve hem de MHZ ve addusin gibi birtakım substratlarla etkileşime girer (203).

MBS'in fosfataz aktivitesini kontrol ettiği düşünülmektedir. MBS COOH-terminal bölgesi ile aktive olmuş Rho ile etkileşir (195). Rho-kinaz MBS ve MHZ'ni fosforile ederek miyozin fosfatazın inaktivasyonuna neden olur. Rho-kinaz ve MBS birlikte MHZ fosforilasyonunu düzenler (190).

2.3.5.3. Protein Kinaz N:

PRK1 olarak da bilinen protein kinaz N (PKN)'nin bir N-terminal düzenleyici bölgesi ve bir de C-terminal katalitik bölgesi bulunmaktadır. Katalitik bölge protein kinaz C'nin katalitik bölgesi ile homoloji göstermektedir (204). Aktive olan Rho N-terminal bölge ile etkileşime girerek protein kinaz N'nin kinaz aktivitesini artırır (199).

PRK2, PKN/PRK'nin bir izoformudur ve GTP-Rac ve Rho ile GDP/GTP bağımsız bir şekilde etkileşime girdiği bildirilmiştir. PRK2 izoformunun kinaz yoksun formunun ekspresyonu aktin stres liflerinin bozulmasına neden olmaktadır bu nedenle PRK2'nin aktin hücre iskeleti reorganizasyonunda rol oynayabileceğini işaret etmektedir (194, 205).

2.3.5.4. Rhofilin ve Rhotekin:

Rhofilinin Rho-bağlayan, Bro1 ve PDZ olmak üzere üç farklı bölgesi vardır. Rhofilin hem GDP hem GTP Rho ile invitro etkileşir. Rhofilin ve rhotekin Rho-bağlayıcı ve aktive olmuş Rho ile etkileşim bölgesinde MBS ve PKN/PRK1 ile homoloji gösterir (199, 200).

2.3.5.5. Sitron ve Sitron-kinaz:

Sitron kinaz Rho-bağlayıcı bir protein olarak ilk kez mayalardan izole edilmiştir (197). Sitron Rho-kinaz ile yapısal benzerlik göstermekle birlikte kinaz bölgesi içermez. Sitron-kinazın ise Rho-kinazın N-terminal bölgesi ile homoloji gösteren bir kinaz parçası bulunmaktadır. Sitron-kinaz sitokinezde rol oynar (198). Sitron-N ise nöron spesifik aktin bağlayıcı bir protein olan profilin-IIa ve Rho-kinaz ile birlikte nöronlarda aktinin bölgesel toplanmasını kontrol eder (206).

2.3.5.6. p140 mDia:

mDia, formin ile ilişkili protein ailesine ait ve sitokinezde rol oynayan drosophila diaphanus'un memelilerdeki homologudur (207). mDia Rho ile N-terminal bölgesinde GTP-bağımlı bir şekilde etkileşir. Aktin polimerizasyonunda rol oynar. Rho-kinaz ve mDia ile birlikte aktin hücre iskeletinin Rho ile indüklenen reorganizasyonunda görev alırlar (208).

Son yapılan çalışmalar ise göstermiştir ki; mDia sadece aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde değil aynı zamanda mikrotübül hareketini de etkileyerek hücre morfolojisi, motilitesi ve polaritesinde rol oynamaktadır (209, 210).

2.3.5.7. Fosfolipaz D:

Rho'nun fosfolipaz D'nin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (201). Fosfolipaz D fosfolipidleri fosfatidik aside hidrolize eder. Fosfatidik asidin ikincil mesajcı olduğu bildirilmekle birlikte metabolize olarak diaçil gliserol ve lizofosfatidik asid gibi ikincil mesajcılara da dönüşebildiği bildirilmiştir (211).

FLD'nin aktivitesi büyüme faktörleri ve hormonlar gibi çeşitli ekstrasellüler sinyaller tarafından arttırılabilir. Biyolojik ve biyokimyasal çalışmalar Rho'nun Ras süperfamilyasının bir üyesi olan Arf ile birlikte FLD'nin aktivitesini düzenlediğini göstermiştir (212, 213).

2.3.5.8. Fosfatidilinozitol 5'kinaz (PI5K):

Rho memeli hücrelerinde PI5K'ın düzenlenmesinde rol oynamaktadır (214). Daha önce yapılan çalışmalar, fosfatidil inozitol 4,5 bifosfatın (PIP₂) profilin, α -aktinin, gelsolin ve p39CapZ'yi içeren birçok aktin bağlayıcı proteinin etkileşimlerini düzenleyebildiğini göstermiştir (215). Böylece artmış PIP₂ sentezi aktin polimerizasyonunun ve fokal adhezyonun artmasına neden olabilir.

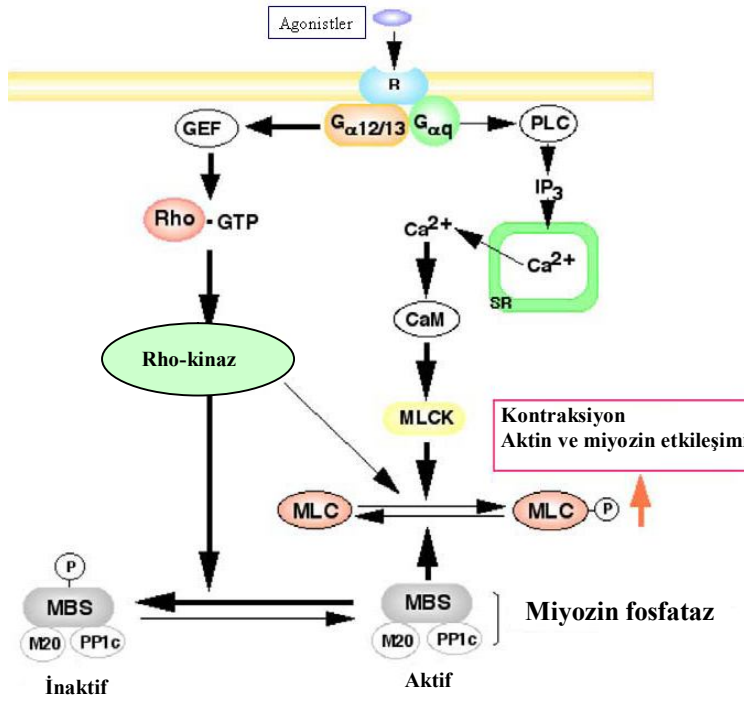
2.3.6. Rho Proteini ve Alt Efektörlerinin Biyolojik Fonksiyonları

2.3.6.1. Düz Kas Kasılması

Hücre membran reseptörlerinin karbakol ve endotelin gibi agonistler ile uyarılması sonucunda oluşan sinyal farklı heterotrimerik G proteinlerine aktarılabilir. $G_{q/11}$ tipi G proteinine aktarılırsa, fosfolipaz C (fosfoinoziditaz) enzimi aktive olur ve fosfatidil inozitol 4,5-difosfat hidrolize olarak diaçilgliserol (DAG) ve inozitol-3-fosfat (IP_3)'ı oluşturur. DAG, protein kinaz C'nin aktivasyonu aracılığı ile bir takım hücrel etkilere aracılık ederken, IP_3 endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} açığa çıkmasına neden olur. Kalsiyum kritik konsantrasyonun üzerine çıkınca myozin hafif zincir kinaz enzimini (MLCK) aktive eder. Bu enzim myozin hafif zincirini (MHZ) fosforile ederek kasılmaya neden olur. Ancak hücre içi kalsiyum düzeylerinin monitorize edildiği ve aynı zamanda kasılma yanıtlarının ölçüldüğü çalışmalar, hücre içi kalsiyum düzeylerinin düşmesine rağmen başlatılan kasılma olayının sürdürülebildiğini göstermiştir. Bu durum, kalsiyumdan bağımsız ilave bir mekanizmanın/mekanizmaların olabileceğini düşündürmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalar hücre içi kalsiyum düzeylerinin düşmesine rağmen kasılmanın sürdürülmesini sağlayan bir Ca^{2+} -duyarlaştırıcı mekanizmanın söz konusu olduğunu göstermiştir. Sözü edilen bu Ca^{2+} -duyarlaşmasına Rho/Rho-kinaz yolağının katkısı olduğu gösterilmiştir (216).

Rho-kinaz yolağı, myozin II'nin myozin hafif zincirinin fosforilasyon düzeyinin düzenlenmesini esas olarak myozin fosfatazı inhibe ederek yapar ve düz kas kasılmasında agonistle indüklenen Ca^{2+} duyarlığına katkıda bulunur. Sonuç olarak çalışmalar GTP bağlayıcı protein olan Rho'nun agonist aracılı Ca^{2+} duyarlığında yer aldığını ortaya çıkarmıştır. Daha da önemlisi sabit bir Ca^{2+} konsantrasyonunda artmış kasılmaların, aktive edilmiş Rho ile MLC fosforilasyon oranındaki artıştan ziyade, defosforilasyon oranındaki azalmadan kaynaklandığı bildirilmiştir. Rho proteinleri bu etkiyi downstream efektörleri olan "Rho-associated kinase" (Rho-kinaz) aracılığıyla oluşturmaktadırlar (178).

Rho-kinaz için spesifik inhibitörler kullanılarak daha sonra yapılan çalışmalar, Rho-kinaz aracılıklı Ca^{2+} duyarlılığının hipertansiyon ve koroner arter spazmı gibi hastalıklarda rolü olduğunu ortaya çıkarmıştır (27).



Şekil 2.13. Düz Kas Kasılma Mekanizmasının Rho/Rho-kinaz tarafından düzenlenmesi

2.3.6.2. Stres Fibril Oluşumu ve Fokal Adezyonlar

Rho'nun aktin stres fibrillerinin oluşumunda ve fokal adezyonunda rol oynadığı bildirilmiştir. Botulinum C₃ ADP-ribozil transferaz (C₃) ile ön uygulama yapılan hücrelerde Rho'nun inhibisyonu LPA ile indüklenen stres fibril oluşumunu azaltır (175).

Öte yandan hücrelere dominant aktif Rho'nun mikroenjeksiyonu stres fibril oluşumunu indükler ki bu da Rho'nun stres fibril oluşumunda önemli bir rolü olduğunu gösterir. Rho aynı zamanda lizofosfatidik asit ile indüklenen fokal adezyon oluşumunda da rol oynar (218). Rho burada fibronektin gibi ekstrasellüler matrikse integrin aracılı stres fibril bağlanmasında etkilidir (219).

Öte yandan dominant aktif Rho-kinazın ekspresyonu stres fibril oluşumunu indüklerken, dominant negatif Rho-kinaz LPA ya da RhoV14 ile indüklenen stres fibril oluşumunu inhibe eder (220). Miyozin hafif zincirin Rho-kinaz tarafından fosforilasyonu miyozin ATPaz'ı aktive eder böylelikle stres liflerin kontraksiyonu meydana gelir (221).

Tüm bunlar göz önünde tutulduğunda, bu gözlemler Rho/Rho-kinaz yolağının stres fibrilleri ve fokal adezyonun oluşumunda miyozin II aktivasyonu yolu ile etki ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, Rho-kinaz direkt olarak LIM-kinazı fosforile eder. LIM-kinaz ise aktini depolimerize eden protein olan kofilin/ADF'yi fosforile etmek üzere aktive olur (222).

Kofilinin LIM-kinaz tarafından fosforilasyonu onun fonksiyonunu inhibe eder. Kofilinin inhibisyonu ise stres fibrilleri gibi aktin filamentlerinin stabilizasyonu ile sonuçlanır. Rho-kinaza ilaveten mDia da stres fibril oluşumunda rol alır (208).

Dominant aktif form mDia ve Rho-kinazın eş zamanlı ekspresyonu aktin fibrillerinin yoğunlaşmasını indükler. Bu sonuçlar göstermektedir ki Rho-kinaz ve mDia Rho'nun alt efektörleri olarak stres fibril oluşumunda birlikte görev alırlar.

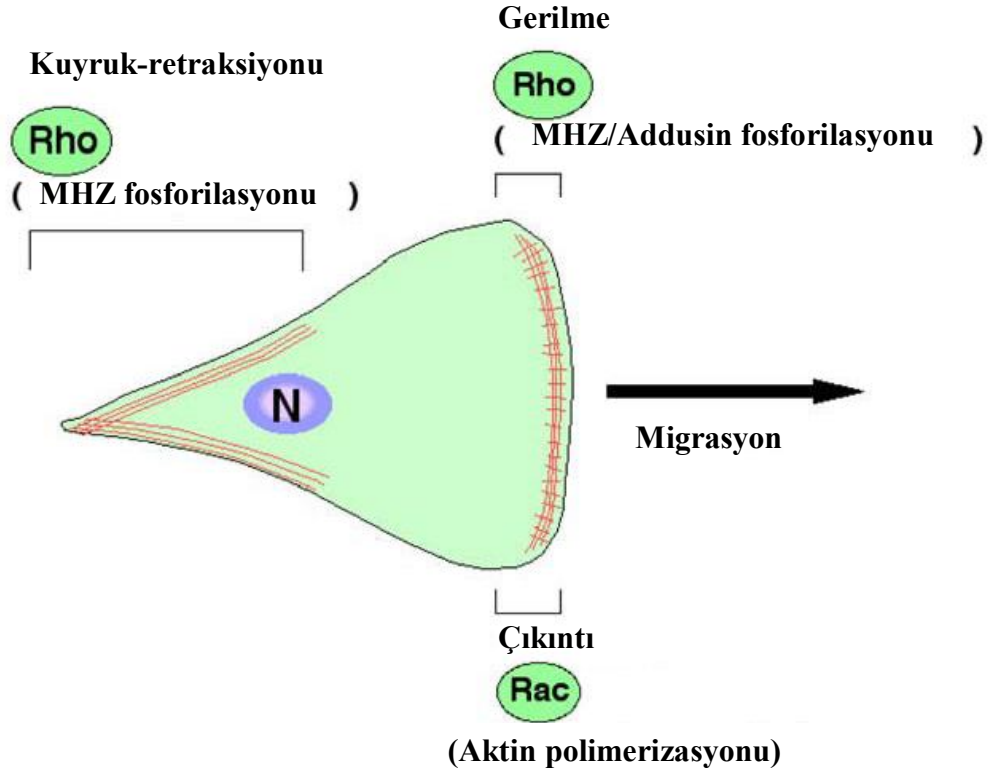
2.3.6.3. Hücre Motilitesi ve Migrasyonu

Hücre motilitesi için aktin filamentlerinin reorganizasyonu ve lamellipodyal çıkıntılarının oluşması gerekmektedir. Hücre polaritesi Cdc42 aktivitesi ile gerçekleşir. Rac ise lamellipodyal çıkıntılar içindeki aktinin polimerizasyonu için göç oluşturuyor görünmektedir (223). Membran kıvrımlarının oluştuğu kısımlarda aktin hücre hareketi süresince sürekli depolimerize olup ve sonra repolimerizasyona uğrar (224). Rho hareket eden hücrelerin arka kısımlarında ve membran kıvrımları oluşan bölgelerde MHZ fosforilasyonu aracılığı ile miyozin II'yi aktive eder (Şekil 2.14). Anti-MHZK antikorlarının makrofajlara enjekte edilmesi ile MHZ fosforilasyonunun hücre migrasyonunda rol oynadığı doğrulanmıştır (225).

Daha önce yapılan çalışmalar Rho'nun hücre motilitesini düzenlediğini işaret etmektedir. Rho GDI veya botulinum C₃ toksin mikroenjeksiyonu, keratinositlerde hepatosit büyüme faktörü (HGF) ile indüklenen hücre hareketini inhibe etmiştir. Ancak dominant negatif Rac uygulaması için aynı şey sözkonusu olmamıştır. Bununla birlikte Rho'nun dominant negatif formu HGF ile indüklenen hücrelerde membran kıvrımlarının oluşmasını inhibe etmiştir. Bu şekilde, Rho epitelyal hücre motilitesinde GDP/GTP bağımlı bir şekilde önemli rol oynar. Aynı zamanda dominant-negatif Rho-kinaz formunun ekspresyonu da HGF ile indüklenen hücrelerde membran katlanması ve hasarlanma ile indüklenen hücre migrasyonunu inhibe eder ki bu Rho-kinazın hücre hareketi için önemli olduğunu işaret etmektedir (226).

Tüm bunlar birlikte değerlendirildiğinde, Rho/Rho-kinaz yolağı tarafından oluşturulan MHZ fosforilasyonunun hücre motilitesi için önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. MHZ'e ilaveten, Rho-kinaz addusin gibi substratların direkt fosforilasyonu ya da miyozin fosfatının inaktivasyonu yolu ile de hücre motilitesinin düzenlenmesinde rol oynar (227).

Nötrofilik lökositler gibi, diferansiye olmuş HL60 hücreleri de kemoatraktanlar polarize olmuş morfolojiye adapte olarak tepki gösterirler. Bunun için çıkıntı oluşturan psödopotlar içinde de F-aktin ve yanlarda ve arka kısımlarda ise aktin-miyozin komplekslerinin varlığına ihtiyaç duyarlar. Xu ve arkadaşları (228) hücre polaritesi için farklı G-proteinlerinin aktivasyonuna bağlı itici ve çekici sinyallerin oluşması gerektiğini bildirmişlerdir. İtici sinyaller, Gi aracılığı ile oluşturulan 3' fosfoinozitol lipidlerinin (PI3P) üretimi ve bunun sonucu küçük GTPaz'lardan Rac'ın aktive olmasına ve F-aktine bağlıdır. Hücre içinde yüksek Rac aktivitesi ve Rho aktivitesi bu itici ve çekici sinyalleri düzenler. Bu sinyaller arasındaki antagonizma kemotaktik sinyallere cevabın yönünü belirler (228).



Şekil 2.14. Rho'nun hücre motilitesindeki rolü

2.3.6.4. Nörit Retraksiyonu ve Ekstansiyonu

Büyümekte olan nöronal yapılarda nörit retraksiyonu ve ekstansiyonu nöronal plastisite ve sinir sistemi gelişimi için önemli olan ekstrasellüler moleküller tarafından uyarılır. Rho'nun NIE-115 nöroblastoma hücrelerinde trombin, serum ve LPA ile indüklenen nörit retraksiyonunda ve hücre yuvarlanmasında Rac ve Cdc42 ile birlikte rol oynadığı gösterilmiştir (229).

Rac and Cdc42 büyüme konisi içinde filopodya ve lamellipodya oluşumunda rol oynayarak nörit uzamasına öncülük ederken RhoA ise aktomyozin kontraksiyonu yolu ile nörit retraksiyonunu stimüle eder. Bu farklı RhoGTPaz'ların birbirine zıt aktiviteleri arasındaki denge nöronların morfoloji ve fonksiyonları için önemlidir (230).

Rho'nun alt efektörü Rho-kinaz'ın aktomyozin kontraksiyonlarını arttırarak nörit retraksiyonunu indüklediği bildirilmiştir (231). Bununla uyumlu olarak da Rho-kinazın inhibisyonunun serebellar granüler nöronlarda aksonal süreçlerin aşırı büyümesine neden olduğu gösterilmiştir (232).

Öte yandan RhoA'nın sinir büyüme faktörü ile indüklenen Rac1 aktivasyonunu Rho-kinaz bağımlı bir şekilde azaltarak nörit formasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (233).

2.3.6.5. Sitokinez

Hücreler mitotik fazda hücre membranının altında kontraktıl bir halkanın oluşması ile bölünmeye (sitokineze) uğrarlar. Kontraktıl halka temel olarak aktin filamentleri ve miyozinden oluşmuştur. Bu kontraktıl halkanın kontraksiyonu sırasında membranı içe doğru çekerek hücreyi iki yavru hücreye böldüğü düşünülmektedir (234). Döllenmiş kurbağa embriyosunda stoplazmik bölünme Rho-GDI veya botulinum C3 toksin mikroyeksiyonu ile inhibe edilir fakat nükleer bölünme normal olarak devam eder (235).

Rho-GDI ve aktive RhoA'nın birlikte enjekte edilmesi Rho-GDI etkisini önler. Bu nedenle Rho kontraktıl halkanın kasılmasının düzenlenmesi yolu ile stoplazmik bölünmeyi kontrol ediyor görünmektedir. Rho ve Rho-kinaz MHZ fosforilasyonunun oluştuğu bölünme yarığında akümüle olur (236).

Dominant negatif Rho-kinaz ekspresyonu memeli hücrelerinde ve kurbağa embriyosunda sitokinezi inhibe eder ve multinükleer hücreler oluşmasına neden olur (237). Bu nedenle Rho/Rho-kinaz aracılı MHZ fosforilasyonu kontraktıl halkanın kasılmasını sağlayarak sitokinezde önemli bir rol oynar. Ayrıca Rho-kinaz özellikle sitokinez sırasında bölünme yarığındaki glial fibriler asidik protein (GFAP) ve vimentin gibi intermediate filament proteinlerini de fosforile eder (238). Rho-kinazın

fosforilasyon bölgelerinde mutasyona uğramış GFAP ekspresyonu mitoz sonrası yavru hücrelerde bozulmuş glial filament ayrışmasına neden olur (237).

Bu sonuçlar göstermektedir ki Rho-kinaz sadece sitokinez yani hücre bölünmesi için değil fakat aynı zamanda yavru hücrelerde etkin hücresel parçalanmayı sağlayan GFAP proteinin ayrışımında da önemli rol oynamaktadır.

Sitron kinaz da aynı zamanda bölünme yarığında yer almaktadır (198). Sitron kinaz mutantlarının aşırı ekspresyonu multinükleer hücrelerle sonuçlanır. Sitron kinaz knockout fareler daha yavaş büyürler, şiddetli ataksik durumları vardır ve fatal krizler nedeniyle erişkin yaşa gelmeden ölürlere (239).

Spesifik nöronal grupların eksikliğine bağlı olarak defektif nörogenezis gösterirler. Bu tür anomaliler santral sinir sistemi gelişimi sırasında bozulmuş sitogenezis ve masif apoptozise bağlı olarak meydana gelmektedir. Sitron kinaz miyozin II'nin MHZ'ni serin 19 ve treonin 18'de invitro olarak fosforile eder. Sitron kinaz sitokinez sırasında Rho'nun alt efektörü MHZ'in defosforilasyonunun düzenlenmesinde rol alabilir.

2.3.6.6. Mikrovillus Oluşumu

ERM (Erzin, Radiksin, Moezin) ailesi proteinleri plazma membranı ve aktin filamentleri arasında çapraz bağlar oluşturan proteinler olarak fonksiyon gösterirler (240). ERM ailesi proteinlerin amino ve karboksi terminal uçlarının sırası ile CD44 ve aktin filamentleri gibi integral membran proteinleri ile direkt bağlar oluşturduğu bildirilmiştir (241).

ERM ailesi proteinleri aktive olduğu zaman sitozolden plazma membranına transloke olurlar ve Rho ve Rac ile indüklenen hücre iskeleti reorganizasyonunda rol oynarlar (242). Biyokimyasal analizler göstermiştir ki Rho-kinaz enzimi moezini Thr-558'de fosforile eder ve bu şekilde radiksin proteininin karboksi ve amino terminal

bölgeleri arasındaki intramoleküler etkileşimler inhibe olur. Böylece Rho/Rho-kinaz yolağı ERM ailesi proteinlerini fosforile ederek aktive eder.

Öte yandan LPA'in NIH 3T3 hücrelerinde radixin proteininin mikrovillus benzeri yapılara relokalizasyonunu stimüle ettiği ve botulinum C3 toksininin bunu bloke ettiği gösterilmiştir (243).

Rho'nun dominant aktif formunun ekspresyonu moezin fosforilasyonunu indükler ve mikrovilli benzeri yapıların apikal membranda biçimlenmesi ile birlikte Thr-558'in fosforile olduğu bölgede moezinin kümelenmesine neden olur (193).

Rho'nun alt efektörlerinden biri olan Rho-kinazın da dominant aktif formunun ekspresyonu moezinin fosforilasyonunu indükler. Moezinin Rho-kinaz tarafından fosforilasyonu mikrovillus benzeri yapıların oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Bu Rho-kinaz aracılı ERM fosforilasyonu koroner arterde, santral sinir sisteminde, akciğerler ve kalpte gösterilmiştir. Öte yandan bu fosforilasyon hipertansiyon patogenezi, vazospazm ve arterioskleroz ile yakından ilişkilendirilmiştir (244, 245, 246).

2.3.6.7. Hücre Şekil Değişiklikleri

Hücrelerin şekil değiştirebilme yetenekleri hücreler arası farklılaşma ve hücre hareketi için kritik öneme sahiptir. Upstream sinyallere cevaben oluşan kortikal aktin filamentlerinin yeniden düzenlenmesi hücre şeklindeki değişiklikler için olmazsa olmazdır. Örneğin hematopoetik hücreler enfeksiyon bölgesine ulaşabilmek için kan damarı duvarından ve dokular arasından geçmek zorundadır. Öte yandan metastatik kanser hücreleri diğer dokulara göç ederek ve invaze olarak kanserin yayılımına neden olurlar. Gelişmekte olan çok hücreli organizmalarda dokuların morfolojik yapıları çeşitli Rho-GTP azllara bağlı hücre şekil değişiklikleri ve hücre hareketlerine bağlıdır. Küçük G proteinlerinden Rho ailesi üyeleri Rho, Rac, Cdc42 hücre şeklinin belirlenmesinde rol oynarlar. Fibroblastlarda Rho aktivasyonu stres fibrillerinin

oluşumu, Rac aktivasyonu lamellipodya oluşumu ve Cdc42'nin aktive olması ise filopodya oluşumunda rol oynamaktadır (223).

2.3.7. Rho ve Alt Eftörü Rho-kinaz'ın Diğer Etkileri

2.3.7.1. Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkiler

Rho/Rho-kinaz sinyal yolağı noradrenalin, trombin, anjiyotensin II ve serotonin gibi çeşitli vazoaktif ajanlar tarafından aktive edilir. Dolayısı ile Rho-kinaz yolağının vasküler lezyonların gelişiminde önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir. Rho-kinaz inhibitörleri ile uzun süreli tedavi sonrasında vasküler düz kas hücresi ve fibroblastların proliferasyonu, migrasyonu ve inflamatuvar hücrelerin vasküler duvarlara göçü gibi hücresele olaylar inhibe edilebilmektedir. Rho-kinaz sinyal yolağı sadece hipertansif vaskülopatide değil, aynı zamanda vasküler hastalıkların diğer formlarında da rol oynamaktadır.

Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizması bir yandan damar düz kas tonusunu düzenlerken diğer taraftan da inflamatuvar aterosklerotik lezyonların gelişmesinde rol oynamaktadır. Rho-kinaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda söz konusu aterosklerotik lezyonların azaldığı gösterilmiştir (248). ROCK inhibitörü Y-27632'nin kardiyak aritmilerde myokardı koruyucu etki yaptığı da bildirilmiştir (249). Bununla birlikte hipertansif hastalarda periferel vasküler direncin artmasının patogenezinde Rho-kinaz yolağının rolünün olabileceğini gösteren çalışmalar vardır (250).

Vasküler düz kas hücre kültürlerinde Rho aktivasyonu yaptığı bilinen sfingozin 1 fosfatın hücresele proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir (251). Trombinin insan umblikel veninde hızlı ve geçici bir RhoA aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bunu takiben de myozin hafif zincir fosforilasyonunun artışı, F-aktin stres liflerinin oluşumu ve permeabilite artışının olduğu ve bu etkilerin Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632 ile belirgin olarak azaldığı bildirilmiştir (252). Öte yandan izole sıçan mezenterik damar yatağında ROCK-2 enziminin eksprese edildiği ve damar yatağı perfüzyon basıncının

kontrolüne katkı sağladığı gösterilmiştir (253). Bununla birlikte lipopolisakkarit verilen sıçanların mezenterik arterlerinde endotelin-1 ile oluşturulan kasımlara ROCK-2 enzim ekspresyon artışının katkısı olduğu rapor edilmiştir (254). Yapılan bir başka çalışmada da insan umbilikal arterinde Rho-kinaz enziminin ROCK-2 izoformunun eksprese edildiği ve Rho/Rho-kinaz yolağının insan umbilikal arterinde agonistle indüklenen kasımlara aracılık ettiği bildirilmiştir (255).

2.3.7.2. Gastrointestinal Sistem Üzerindeki Etkiler

Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizması insan ve koyun safra keselerinin kontraktıl aktivitelerine aracılık etmektedir (256, 257). Gastrik fundusta Rho-kinaz enziminin kontraktıl aktivitede rol oynadığı ve kolinerjik sinir uçlarından asetil kolin salınımını uyarabildiği gösterilmiştir (258). Öte yandan kolon adenokarsinoma hücre hattı olan Caco-2 hücrelerinde prolaktinin transsellüler aktif kalsiyum transportu üzerindeki non-genomik etkilerine Rho-kinazın aracılık ettiği bildirilmiştir (259).

2.3.7.3. Solunum Sistemi Üzerindeki Etkiler

Bronşiyal düz kas tonusunun düzenlenmesinde Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizması rol almaktadır. Bununla birlikte yakın zamanda yapılan bir çalışmada farelerde geranilgeraniltransferaz inhibisyonunun bronşiyal düz kas aşırıduyarlılığını ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle selektif geranilgeraniltransferaz inhibitörlerinin alerjik bronşiyal astım gibi hava yolu aşırı duyarlılığı sonucu oluşan patolojik durumlarda potansiyel bir terapötik ajan olabileceği ileri sürülmektedir (260). Öte yandan, Rho kinaz inhibitörü Y-27632 inhalasyonunun, asetilkolin ile indüklenen solunum yolu rezistans artışını inhibe ettiği bildirilmiştir (261). Buna ilaveten ROCK inhibitörlerinin inhalasyon yolu ile uygulandığında pulmoner hipertansiyonda selektif ve potent bir etki ile vazodilatasyona neden olduğu gösterilmiştir (262). Köksel ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada da oleik asitle indüklenen akciğer hasarlanmasının Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 ile geri çevirilebildiği ve bu neden ile

akciğer hasarlanması ile seyreden hastalıklarda terapötik etkisinin olabileceği bildirilmiştir (263).

2.3.7.4. Santral Sinir Sistemi Üzerindeki Etkiler

Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizmasının vücutta birçok farklı hücrel fonksiyonun yanı sıra santral sinir sisteminde de birtakım hücrel olaylara aracılık ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu yolağın anormal aktivasyonları santral sinir sistemine ait birçok hastalıkta ortaya konmuştur. Spinal kord ve kafa travmalarında Rho-kinaz enzim aktivitesinin artışına bağlı olarak nörit büyümesinin inhibe olabildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte Rho-kinaz enzim inhibitörlerinin spinal kord yaralanmasında, Alzheimer hastalığında, inflamatuvar ve demiyelinizan hastalıklarda, nöropatik ağrı ve diğer nörolojik hastalıklarda potansiyel nörodejeneratif tedavi edici ajan olabileceği öne sürülmektedir (202).

Öte yandan Rho-Rho-kinaz yolağı, nöronal fonksiyonları düzenlemekle birlikte sinir hücrelerinde de sinaps oluşumu, aksonal büyüme ve göç, dendrit şekillenmesi gibi olaylarda rol oynamaktadır (264, 265).

Diğer taraftan iskemik nöronal hasarların erken safhalarında striatumda ve özellikle aksonlarda Rho-kinaz enzim ekspresyon ve aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte ROCK enzim inhibitörü fasudilin bu aktivite artışını geri çevirdiği ve serebral infakta karşı *invivo* olarak koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca nöronal hücrelerde glutamatın ROCK enzim aktivitesinde rol oynadığı ve hidroksifasudilin de ROCK enzim inhibisyonu yolu ile glutamatın neden olduğu sinir hasarı ve hücre ölümünü inhibe ettiği gösterilmiştir (266).

Yapılan diğer çalışmalarda ise serebral damar yatağında Rho/Rho-kinaz yolağının, vasküler direnç ve kan akımının kontrolüne katkı sağladığı ve deneysel köpek subaraknoid kanama modelinde Rho-kinaz aktivitesinin arttığı ve Y-27632'nin arteriyel düz kas hiperkontraksiyonunu önlediği gösterilmiştir (267).

Öte yandan ROCK inhibitörü fasudilin insanlarda subaraknoid kanamadan sonrası oluşan vazospazmı azalttığı anjiyografik olarak gösterilmiştir (268). Bütün bu etkilere ilaveten Rho/Rho-kinaz yolağının santral sinir sisteminde kan basıncının santral düzenlenmesinde (246), hipotermide (269), nörotransmitter salınımında (270), beyin endotelial hücre permeabilite artışında (271), Alzheimer hastalığında rol oynayan β -amiloid plakların oluşumunda (272) rol oynadığı da yapılan diğer çalışmalar ile ortaya konmuştur. Bununla birlikte hem beyinde hem de omurilikte eksprese edildiği gösterilen Rho-kinaz enziminin nosisepsiyonda rol oynayabildiği ve ROCK inhibitörlerinin yeni bir antinosiseptif ilaç grubu olarak önerilebileceği bildirilmiştir (273).

Ayrıca yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada da Rho/Rho-kinaz sinyal yolağının farelerde epilepsi gelişiminde rol oynayabileceği bu nedenle Y-27632 ve fasudilin potansiyel anti-epileptik ajanlar olabileceği gösterilmiştir (274).

2.3.7.5. Ürogenital Sistem Üzerindeki Etkiler

İnsan ve tavşan penis kavernozaal düz kas hücrelerinde Rho-kinaz enzim ekspresyon ve aktivitesinin olduğu gösterilmiştir (275).

Bunun yanı sıra yapılan diğer çalışmalarda çeşitli türlerin korpus kavernozumlarında ROCK-1, ROCK-2, Rho-GDI ve Rho-GEF proteinlerinin varlığı tespit edilmiştir. Yaptıkları bir çalışmada Wang ve arkadaşları, tavşan ve insan korpus kavernozumunda Rho aracılı Ca^{2+} duyarlaşması olduğunu ve Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin, fenilefrinle kastırılmış kavernozaal dokuda doza bağımlı olarak gevşeme oluşturduğunu bildirmişlerdir (276).

Öte yandan Rho/Rho-kinaz aracılıklı vazokonstriksiyonun penil dolaşımın düzenlenmesinde rol oynadığı, Rho-kinaz enzim inhibitörünün intrakavernozaal uygulanmasının anesteziye edilmiş sıçanlarda ereksiyona neden olduğu gösterilmiştir (277).

Çeşitli hastalıklara sekonder gelişen erektil disfonksiyonda Rho-kinaz sinyal yolağının katkısının olduğu öne sürülmektedir. Örneğin diyabetik erektil disfonksiyon tedavisinde ROCK inhibitörleri, Y-27632 ve fasudilin tedavi değerlerinin olabileceğini bildirilmiştir (278).

Diğer taraftan, vas deferensin motor aktivitesinde Rho/Rho-kinaz yolağının etkili olduğu ve bu yolağın inhibitörlerin hem erektil disfonksiyonda hem de prematür ejakülasyon bozukluklarında potansiyel terapötik ajanlar olabileceğini öne sürülmüştür (20).

Bunun yanısıra bir başka çalışmada da Rho/Rho-kinaz yolağının üreter düz kasının eksitatör uyarılarla indüklenen kontraktıl aktivitesine önemli katkı sağladığı ve ROCK inhibitörlerinin renal kolik tedavisinde potansiyel antispazmodik ilaçlar olabileceğine işaret edilmiştir (22).

Bununla birlikte, üreter obstrüksiyonunda Rho-kinaz yolağının upregüle olduğu ve artmış üreteral kasılmalara bu yolağın aracılık ettiğini bildirilmiştir (279).

Rho/Rho-kinaz yolağının, mesane, uterus ve prostat düz kasının kontraktılitesine katkı sağladığı ve Rho-kinaz inhibitörlerinin benign prostat hipertrofinde terapötik etkiye sahip antispazmodikler olabileceği bildirilmektedir (280, 281, 282).

2.3.7.6. Göz Üzerindeki Etkiler

ROCK enzim inhibitörü Y-27632'nin intraoküler basıncı azalttığı ve aköz hümör dış akımını artırdığı, dolayısıyla başta glökom olmak üzere diğer bir takım göz hastalıklarının tedavisinde terapötik faydaları olabileceği bildirilmiştir (283). Diğer taraftan insan lens epitel hücrelerinin kontraktılitesine Rho/ROCK sinyal yolunun aracılık ettiği ve buna ilaveten ROCK-1 ve ROCK-2 proteinlerinin göz kapağı kapanmasında rol oynadığı da gösterilmiştir (284, 285).

2.3.7.7. Tümör Hücresi ve Metastaz Üzerindeki Etkiler

Rho/Rho-kinaz yolağının tümör hücre invazyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (286). Bununla birlikte Rho proteinlerinin esasen kanser gelişiminde ve progresyonunda rol oynadığı bilinen aktin reorganizasyonunda, hücre hareketi ve migrasyonunda, hücrelerin birbirlerine ve matrikse olan adezyonunda, hücre siklusunun düzenlenmesinde, gen ekspresyonlarında ve apoptoziste anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Öte yandan Rho-kinaz yolağını inhibe eden fasudilin insan ve sıçan modellerinde tümör progresyonunu azalttığı gösterilmiştir (287).

Bundan başka, Rho guanin nükleotid değiştirici faktörler (Rho-GEFler) onkojeniktirler ve malignite durumlarında sıklıkla Rho GTPazların ekspresyonları artmıştır. Diğer taraftan Rho proteinleri antineoplastik ajanlar ve iyonizan radyasyon gibi DNA hasarlanması oluşturan ajanlara karşı direnci de etkilemektedir. Böylelikle Rho ile indüklenen mekanizmalar geleneksel antineoplastik tedavinin terapötik etkililiğini ve/veya yan etkilerini değiştirmektedir. Pleotropik etkilerinden ötürü Rho proteinleri yeni anti kanser ilaç gelişiminde ümit vaat edici ajanlar olarak görünmektedirler. Burada aslında önemli olan Rho ve beraberinde Ras proteinlerin C-terminalinin izoprenilasyonudur ki bu proteinlerin hücre membranına bağlanıp aktif hale geçmesi, dolayısı ile onkojenik sinyali iletmesi için gereklidir. Dolayısıyla farnesil transferaz, geranylgeranil transferaz ve HMG-KoA-redüktaz inhibitörleri (statinler gibi), izoprenilasyonu önleyerek tümör tedavisinde faydalı olabilirler (288).

2.3.7.8. İnflamasyon Üzerindeki Etkiler

Rho/Rho-kinaz yolağı, inflamasyona aracılık edebilmektedir. İnflamatuar hücrelerin migrasyonu hücre iskeleti aktini tarafından düzenlenmektedir ve bu olayı düzenleyen en önemli mekanizmalardan birisi de Rho proteininin indüklediği sinyal ileti mekanizmasıdır (21).

Ayrıca Rho-kinazın sıçanlarda anjiyotensin-II ile indüklenen monosit kemoatraktant protein-1 ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ekspresyonuna

aracılık ettiği, bununla birlikte yine sıçanlarda yüksek glikoz düzeylerinin indüklediği artmış osteopontine de yine bu sinyal mekanizmasının aracılık ettiği bildirilmiştir (289, 290, 291).

Tüm bunlardan dolayı bu sinyal mekanizmasının vasküler fonksiyonlarla ilişkili inflamatuvar moleküllerin gen ekspresyonlarında ilgili olduğu düşünölmektedir. Ayrıca, anjiotensin-II ve interlökin-1 β ile kültür hücrelerinde oluşturulan inflamasyon ve bakteriyel endotoksinle (lipopolisakkaridlerle) *in vivo* olarak oluşturulan sistemik inflamatuvar yanıtta Rho-kinaz upregüle olmuştur (254, 292).

2.3.7.9. Endotelyal ve Epitelyal Hücreler Üzerindeki Etkiler

Endotel ve epitelyum hücreleri gibi kas olmayan hücrelerde hücre iskeleti aktini, başlıca hücre şekil değişikliği, hücre göçü, polaritesi ve adezyon oluşumu gibi çok çeşitli hücresel fonksiyonlara aracılık eder (293).

Trombin gibi bir takım uyarılara cevap olarak gelişen endotel hücre şekil değişikliği, endotelyal kontraktilite ve kapiller permeabilite artışı gibi olaylara Rho/kinaz sinyal ileti yolağının önemli katkı sağladığı gösterilmiştir (294). Öte yandan nötrofillerin aracı olduğu endotelyal hiperpermeabileden de Rho/Rho-kinaz yolağının sorumlu olduğu bildirilmiştir (295).

Yapılan bir diğer çalışmada Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin sıçanlarda karaciğer iskemik-reperfüzyon hasarı üzerine etkisi test edilmiş. Buna göre de Y-27632'nin polimorfonökleer lökositler (PMNL) ve inflamatuvar sitokinleri suprese etmek suretiyle hepatik iskemi-reperfüzyon hasarında kısmi koruyucu etkisi bulunduğu öne sürölmüştür (296).

Diğer taraftan insan bronşiyal epitel hücresinin interlökin-8 salgılamasında da Rho-kinazın rolü olduğu gösterilmiştir (297).

2.3.7.10. Kan Hücreleri Üzerindeki Etkiler

2.3.7.10.1. Trombositler

Rho-kinaz ve MHZ kinaz tarafından düzenlenen MHZ fosforilasyonunun proplateletler olarak da adlandırılan megakaryositlerin oluşumu ve fragmantasyonunu inhibe etmek yolu ile trombosit biyosentezinde inhibitör rol oynadığı bildirilmiştir (298).

Bunun dışında, insan trombositlerinin ADP tarafından G- protein bağımlı P2Y1 ve P2Y12 reseptörleri aracılığı ile çeşitli hücresel fonksiyonları indüklemek için aktive edildiği ve P2Y12 reseptörlerinin Rho-kinaz bağımlı bir mekanizma ile trombosit şekil değişikliklerini etkilediği gösterilmiştir (299). Öte yandan Rho-kinazın trombosit aktivasyonunda α -addusin ve spektrin aktin hücre iskeleti ile ilişkisini düzenlediği öne sürülmektedir (300).

Trombosit aktivasyonu her ne kadar vasküler hasarlanma bölgesinde primer hemostazın sağlanmasında önemli ise de miyokardiyal infarktüs ve inmeye neden olan arteriyel trombus oluşumunda da ciddi rol oynamaktadır. Bu nedenle trombosit fonksiyonunun inhibisyonu arteriyel trombozun önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir stratejidir. ADP, trombin ve tromboksan A₂ gibi agonistler heterotrimerik G proteinlerine bağlanarak hücre içi sinyal yollarını düzenlerler. Rho/Rho-kinaz yolunu aktive eden G₁₃ proteinin trombosit aktivasyonu ve trombosit-bağımlı arteriyel trombozda kritik öneme sahip olduğu ve G₁₃-aracılı sinyal yolunun anti-trombosit ilaçlar için yeni bir hedef olabileceği önerilmiştir (301).

2.3.7.10.2. Lökositler

Rho/Rho kinaz yolağının lenfosit ve nötrofillerin kemotaksisinde rol oynadığı bildirilmiştir. Öte yandan p160ROCK polimorfonükleer lökositlerin süperoksit üretimi, adhezyon ve agregasyonunda da rol oynamaktadır (35, 36). Yapılan bir diğer çalışmada

da iskemik hasarlanma sonrasında lökositlerde ROCK aktivitesinin arttığı ve ROCK inhibisyonunun iskemiye bağlı hasarlanmada infarkt alanını azalttığı gösterilmiştir (302). Buna ilaveten vasküler hasarlanma bölgesinde ROCK-1'in neointimal formasyona ve lökosit toplanmasına aracılık eden mekanizmalarda rol oynadığı ve bu nedenle vasküler inflamatuvar hastalıklarda potansiyel terapötik bir ajan olabileceği de öne sürülmektedir (303).

2.3.7.10.3. Eritrositler

RhoA proteininin eritrositlerde sitozolik ve membranal fraksiyonlarda bulunduğu, sitozolik fraksiyondaki Rho A'nın guanozin trifosfat (GTP) ile bağlanarak membrana transloke olabildiği gösterilmiştir (38). Bunun yanı sıra bir sitozolik serin/treonin kinaz olan ve daha önce RhoA'nın alt efektörü olduğu bildirilen PRK1/PKN'in eritrositlerde plazma membranının lipid tabakasında varlığı da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (304). Ancak Rho'nun alt efektörleinden Rho-kinazın eritrositlerdeki fizyolojik ve patolojik olaylara katkısını gösteren çalışmalar mevcut değildir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar

Protein Assay Dye Reagent (Biorad 500–0006)
Sığır Serum Albumin (BSA; Sigma A2058)
Akrilamid/bisakrilamid % 30'luk solüsyonu (Sigma A3574)
Tris HCL (Serva 37180)
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS; Sigma L4509)
Amonyumperoksodisülfat (APS; Merck 1.01200.1000)
Temed (Merck 1.10732.0100)
Trizma Base (sigma T6066)
Sodyum Klorid (Riedel–de Haën 13565)
Glisin (Merck 5.00190.1000)
Tween 20 (Merck 8.22184.0500)
Bromfenol Blue (Sigma B0126)
Merkaptoetanol (Merck 1.15433.0050)
Metanol (Riedel-de Haën 34906)
Filter paper 7.5x10 BİORAD170-3932
Nitroselüloz membran Biorad 162-0112
Yağsız Süt Tozu (Nestle)
Rho A (26C4) mouse monoclonal (Santa Cruz sc-418)
Goat anti-mouse IgG1-HRP (Santa Cruz sc-2060)
Anti- ROCK 2 goat poliklonal (Santa Cruz sc-1851)
Dankey anti-goat (Santa Cruz sc-2020)
Enhanced Kemiluminesans ECL Plus Western Blot Deteksiyon Kiti (Amersham Biosciences, Freiburg Germany)
Röntgen Film Developer Solüsyon (General Rapid Medical)
Röntgen Film Fixer Solüsyon (General Rapid Medical)
RhoA G-LISA™ Activation Assay (colorimetric) BK124 Cytoskeleton
Sodium metabisulfite (Na₂S₂O₅) SİGMA 7681-57-4

Sfingozin-1-fosfat (Tocris Cat. No. 1370)
Lizofosfatidik asid (Sigma L-7260)
PBS Tablet (Amresco E404)
PVP-360 (polyvinyl-pyrrolidone, Sigma, St. Louis, USA)

3.2. Kullanılan Deneysel Yöntemler

3.2.1. Western Blot Yöntemi İçin Kan Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmanın bu kısmı için 18-45 yaş arası alkol, sigara ve ilaç kullanmayan, sağlıklı gönüllü erkek bireylerden alınan kan örnekleri kullanıldı. Deneklerin ön kol venlerinden heparinli enjektörlere alınan kan örnekleri, dakikada 3000 devirde on dakika boyunca santrifüj edilip plazmaları ayrıldı. Plazması ayrılan örnekler, izotonik fosfat tamponu (PBS) ile üç kez yıkandı (3000 rpm, 10 dk). Elde edilen eritrositler eşit hacimde hipotonik lizis tampon ile [10 mM Tris (pH 7.6), 1 mM EDTA, 20 µg/ml phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)] karıştırılarak vortekslendi. Daha sonrasında elde edilen homojenatlar 15000 rpm. de 20 dk. santrifüj edilerek sitozolik fraksiyonu içeren supernatant ve membranal fraksiyonu içeren pellet ayrıldı (305). Membranal fraksiyonları içeren pelletler hipotonik lizis tampon ile sulandırıldı ve hem membranal hem de sitozolik fraksiyonlarda Bradford yöntemi ile protein tayinleri yapıldı.

3.2.2. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Oldukça duyarlı olan bu yöntem (5-100 µg/ml); organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek, renk oluşturmasını esas alır. Mavi rengin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi (özellikle arjinin gibi bazik amino asitler ve aromatik amino asitler) önemlidir. Yöntemde temel alınan olgu, boya normal şartlarda 465 nm'de maksimum absorbans verirken, protein ile bağlandığı zaman 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesidir (306, 307).

Standart olarak kullanılmak üzere 1 mg/ml sığır serum albumin (BSA) hazırlandı. Standartlar için; 0, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µl standart solusyonu (BSA) içeren ikişer adet ependorfun üzerleri distile su ile 100'er µl'ye tamamlandı. Ölçülecek olan örnekler de yine çift olarak hazırlandı ve 100'er µl'ye tamamlandı. Standart ve örnekler üzerine 1'er ml bradfort solüsyonu eklenerek vortekslendi. 595 (620) nm'ye ayarlı Elisa okuyucuda kör tüpüne karşı örnekler okutuldu. Daha sonra elde edilen absorbanların her örnek için ayrı ayrı ortalamaları alınarak Prism programında µl deki protein miktarları belirlendi

3.2.3. Western-Blot Yöntemi ile RhoA ve ROCK-2 Protein Ekspresyonlarının Gösterilmesi

Eritrositlerde membranal ve sitozolik fraksiyonlarda RhoA proteininin ve stoplazmik bir protein olan Rho-kinazın (ROCK-2) varlığını göstermek amacıyla özel bir protein-protein hibridizasyon tekniği olan Western-Blotlama yöntemi kullanıldı.

Öncelikle proteinler, örnek tamponu (0.5 M Tris HCl pH 6.8 0.125 M, %10'luk SDS 0.14 M, Gliserol % 20, 2-merkaptolanol 0.2 mM, bromfenol blue 0.03 mM) ile 1/2 (membranal) ve 1/4 (sitozolik) oranlarında karıştırıldıktan sonra 5'er dakika kaynatıldı. Kaynatılarak denatüre edilen proteinler örnek tamponu içeriğindeki SDS yardımı ile negatif yükü yükledi ve hidrofobik etkileşimleri bozularak lineer hale geldiler. Tamamen negatif yüklenen proteinler elektroforez sırasında katottan anoda doğru hareket ederler. Eşit miktarlarda protein % 10'luk sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel (SDS-PAGE) jelle yüklenerek elektroforeze tabi tutuldu ve jel üzerinde birbirlerinden ayrılmaları sağlandı.

Poliakrilamid jel matrisi farklı büyüklükte porlar içerir, bu nedenle protein karışımı jelle yüklenip elektroforez uygulandığında; proteinlerin bu kanallardan geçiş hızı tamamen büyüklüklerine bağlıdır. Küçük proteinler jelde hızlı, büyük proteinler yavaş ilerleyebilirler (308).

Jelde büyüklüklerine göre ayrılan ve bantlar oluşturan proteinler elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz bir membrana aktarıldı.

Membranlar yağsız süt tozu ve % 2'lik Tween-20 içeren Tris solüsyonu (TBS-T) ile 1 saat bloklama işlemine tabi tutuldu. Bu sayede membranların proteinsiz kısımlarının spesifik olmayan bir proteinle tutunması sağlanarak protein yapıda olan primer antikorun bir sonraki aşamada membrana non-spesifik bağlanması engellenmiş oldu.

Bir saatlik bloklama işleminden sonra membranlar 3 kez 10'ar dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandıktan sonra ROCK enzimine özgü ROCK-2 (ROK α) (Monoklonal IgG, Santa Cruz Biotechnonolgy Inc. CA, A.B.D.) antikoruna ile (1:2000 dilüsyonda, 2 saat süre ile) ve RhoA proteinine özgü RhoA (Monoklonal IgG, Santa Cruz Biotechnonolgy Inc. CA, A.B.D.) antikoruna ile (1:500 dilüsyonda gece boyunca) muamele edildi. Bu şekilde primer antikorlar membranlara bağlı olan hedef proteinler olan ROCK-2 ve RhoA ile bağlanmış oldu. Bu işlem sonrasında da membranlar tekrar TBT-T solüsyonu ile 3 defa 10'ar dakika yıkandı.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra membranlar bu kez HRP (horseradish peroxidase; Santa Cruz Biotechnonolgy Inc. CA, A.B.D) bağlı sekonder antikor ile (1:2000 dilüsyonda) bir saat muamele edildi ve bu şekilde sekonder antikorun primer antikorlara bağlanması gerçekleştirilmiş oldu. Bunun ardından membranlar tekrar 3 kez 10'ar dakika TBS-T içeren solüsyon ile yıkandı.

Daha sonra membranlar ECL (enhanced chemiluminescence) Plus Kit (Amersham Biosciences, Freiburg Germany) görüntüleme solüsyonu ile 10 dakika karanlıkta muamele edildi. Çeşitli sürelerde medikal röntgen filme basılarak görüntülendi.

3.2.4. Eritrosit Deformabilitesinin Değerlendirilmesi

Deformabilite deneyleri için 18-45 yaş arası sağlıklı gönüllü erkek bireylerden alınan kan örnekleri kullanıldı. Deneklerin ön kol venlerinden heparinli enjektörlere alınan kan örnekleri, dakikada 3000 devirde on dakika boyunca santrifüj edilip plazmaları ayrıldı. Plazması ayrılan örnekler, izotonik fosfat tamponu (PBS) ile üç kez yıkandı (3000 rpm, 10 dk). Sonrasında otolog plazmaları ile eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra deneyler planlandı.

Eritrosit deformabilitesi bir ektasitometre (LORCA, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands) kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Eritrositler izotonik fosfat tamponu içinde hazırlanmış, PVP-360 (polyvinyl-pyrrolidone, Sigma, St. Louis, USA) çözeltisi içinde yaklaşık 1/200 dilüsyonda süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyonun yaklaşık bir mililitresi aralarında 0.3 mm boşluk kalacak şekilde birbirine uyan iki cam silindirden oluşan bir vizkometre sistemine yerleştirildi. İki cam silindirin arasındaki boşluğa doldurulan süspansiyon, dıştaki cam silindirin sistemi kontrol eden bilgisayar tarafından, uygun kayma kuvvetlerini oluşturmak üzere hesaplanan bir hızda döndürülmesiyle, bu kuvvetlerin etkisi altında bırakıldı. Belirlenen aralıktaki kayma kuvvetlerini oluşturacak dönme hızları bilgisayar tarafından izotonik fosfat tamponu-PVP çözeltisinin vizkozitesi de dikkate alınarak hesaplandı. Bu sırada sabit silindirin içinde yer alan bir lazer kaynağından çıkan ışın, eritrosit süspansiyonuna ulaşmakta ve sonra bir ekran üzerine yansıyan difraksiyon paterni, süspansiyondaki eritrositlerin şeklini ve dönme hareketinin yarattığı akıma oryantasyonlarını yansıtmaktadır. Artan kayma kuvvetlerine paralel olarak, dairesel bir formdan elipsoid forma dönüşümün derecesi ile eritrositlerin şekil değiştirme yetenekleri (deformabilitesi) arasında doğru orantı vardır. Elipsoid difraksiyon paterninin uzun (A) ve kısa eksenlerinin (B) uzunluklarının bilgisayar tarafından saptanmasıyla $EI = A \cdot B / (A + B)$ şeklinde bir elongasyon indeksi (EI) hesaplandı. Ölçümler 37°C'de yapıldı. EI değerleri dokuz kayma stresi arasında (0.3-30 Pa) ölçüldü. Bu değerler kullanılarak her örnek için maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti ($SS_{1/2}$) Lineweaver-Burke analizi uygulanarak hesaplandı.

3.2.4.1. Lizofosfatidik Asid Uygulanan Seriler

Lizofosfatidik asid uygulamaları için 18-45 yaş arası gönüllü erkek bireylerden alınan kan örnekleri kullanıldı. Deneklerin ön kol venlerinden heparinli enjektörlere alınan kan örnekleri, dakikada 3000 devirde on dakika boyunca santrifüj edilip plazmaları ayrıldı. Plazması ayrılan örnekler, izotonik fosfat tamponu (PBS) ile üç kez yıkandı (3000 rpm, 10 dk).

1. seri deneyler;

Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri otolog plazmaları ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 10^{-5} M, 2×10^{-5} M, 5×10^{-5} M konsantrasyonlarda lizofosfatidik asid ile 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika sürelerle oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra LORCA ektasitometre ile çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde deformabilite ölçümleri yapıldı.

2. seri deneyler;

Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri otolog plazmaları ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra;

- 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 10 dakika,
- Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudil ile (10^{-5} ve 10^{-4} M) 45 dakika inkübasyonu takiben 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 10 dakika,
- Tek başına Y-27632 ve fasudil ile 45 dakika inkübe edildi.

İnkübasyonlar oda sıcaklığında yapıldı ve sonrasında LORCA ektasitometre ile çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde deformabilite ölçümleri yapıldı.

3.2.4.2. Sfingozin-1 Fosfat (S1P) Uygulanan Seriler

Sfingozin 1 P uygulamaları için 18-45 yaş arası gönüllü erkek bireylerden alınan kan örnekleri kullanıldı. Deneklerin ön kol venlerinden heparinli enjektörlere alınan kan örnekleri, dakikada 3000 devirde on dakika boyunca santrifüj edilip plazmaları ayrıldı.

Plazması ayrılan örnekler, izotonik fosfat tamponu (PBS) ile üç kez yıkandı (3000 rpm, 10 dk). Daha sonra eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri otolog plazmaları ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra,

- 10^{-6} M konsantrasyonda sfingozin-1 fosfat ile 5 dakika,
- Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632 (10^{-5} ve 10^{-4} M) ile 45 dakika inkübasyonu takiben 10^{-6} M konsantrasyonda sfingozin-1 fosfat ile 5 dakika
- Tek başına Y-27632 (10^{-5} ve 10^{-4} M) ile 45 dakika inkübe edildi.

İnkübasyonlar oda sıcaklığında yapıldı ve sonrasında LORCA ektasitometre ile çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde deformabilite ölçümleri yapıldı.

3.2.5. Eritrositlere Mekanik Stres Uygulaması

Mekanik stres uygulamaları için 18-45 yaş arası gönüllü erkek bireylerden alınan kan örnekleri kullanıldı. Deneklerin ön kol venlerinden heparinli enjektörlere alınan kan örnekleri, dakikada 3000 devirde on dakika boyunca santrifüj edilip plazmaları ayrıldı. Plazması ayrılan örnekler, izotonik fosfat tamponu (PBS) ile üç kez yıkandı (3000 rpm, 10 dk). Daha sonra otolog plazmaları ile eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra Rho-kinaz enzim inhibitörleri Y-27632 ve fasudil ile (10^{-7} - 10^{-4} M) inkübasyonlar gerçekleştirildi. İnkübasyonların bitiminde 3000 rpm de 10 dk. santrifüjle plazmaları uzaklaştırıldı ve uzaklaştırılan plazma ile aynı hacimde %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ilave edildi. Kullanılan dekstran 40 solüsyonunun vizkozitesi 37 °C'de 19.5 mPa.s olacak şekilde bir vizkometre ile (Brookfield Engineering Lab, Midleboro, MA, USA) ayarlandı. Dekstran ilavesinden sonra eritrositler LORCA cihazında aralarında 0.356 mm boşluk kalacak şekilde birbirine uyan, çapları sırasıyla 16.008 mm ve 16.652 mm olan iki cam silindirden oluşan sisteme kondu. Bu sistem yardımı ile eritrositlere 120 Pa şiddetinde 15 ve 30 saniye sürelerde mekanik olarak sürtünme kuvveti uygulandı. Mekanik stres süresi sonunda eritrositlerden 10'ar µl lik ikişer örnek deformabilite ölçümü için kullanılırken kalanı hızlıca sıvı azot içinde donduruldu. Deformabiliteleri ölçülen bu eritrositlerin dondurulan örnekleri -80 °C'de saklandı ve sonrasında RhoA protein aktivasyonlarını değerlendirmek için kullanıldı.

3.2.6. Orak Hücre Anemili Hastalarda Eritrosit Deformabilitesine Rho-kinaz Enzim İnhibisyonunun Etkisinin Değerlendirilmesi

Bu amaçla orak hücre anemisi tanısı almış gönüllü hastalardan ön kol venlerinden heparinli enjektörlere kan alındı. Kan örneklerinde LORCA ektasitometre cihazı ile eritrosit deformabilite ölçümleri hem kontrol şartlarda ve hem de Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 ile (10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M ve 10^{-4} M) 45 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra gerçekleştirildi. Beraberinde sağlıklı donörlerden alınan kan örnekleri ile hasta eritrositlerinin deformabiliteleri karşılaştırıldı.

3.2.7. RhoA Protein Aktivasyonunun Değerlendirilmesi

RhoA aktivasyonlarının değerlendirileceği örneklerde protein miktar tayinleri G-LISA RhoA aktivasyon ölçüm kiti içerisinde bulunan Presicion Red Advanced protein tayin solusyonu ile yapıldı. Bunun için 5'er µl örnek 150'şer µl protein tayin solüsyonu ile Elisa plate kuyucuklarında karıştırılarak oda ısısında 1 dk. inkübe edildikten sonra Elisa okuyucuda 600 (620) nm. de köre karşı absorbansları ölçüldü. Ölçülen absorbanslara karşılık gelen protein konsantrasyonları hesaplandıktan sonra kit içerisinde bulunan Rho GTP bağlayıcı protein (RBD, Rho'nun efektör proteinlerinin Rho bağlayıcı bölgeleri) ile kaplı wellere eşit protein konsantrasyonları (0,4-2 mg/ml) içeren örnekler konuldu. Örnek içeren well plate 30 dk. 4 °C'de 250 rpm. orbital karıştırıcıda çalkalanarak inkübe edildikten sonra weller 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Bu şekilde örnekler içinde bulunan aktif, GTP-bağlı Rho wellerin tabanına bağlanırken, inaktif GDP-bağlı Rho yıkama sırasında uzaklaştırılmış oldu. Bu yıkamanın ardından wellere 200'er µl. antijen presenting buffer eklenerek 2 dk. oda ısısında inkübe edildi ve tekrar 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Bundan sonra wellerin tabanına bağlanan aktif RhoA'nın tayini için RhoA spesifik primer antikor ile 45 dk. oda ısısında 350 rpm. orbital karıştırıcıda inkübasyon yapıldı. Primer antikor uygulamasından sonra tekrar 3 kez yıkama tamponu ile yıkanan wellere bu kez HRP (horseradish peroxidase) işaretli sekonder antikor ilave edilerek tekrar 45 dk. oda ısısında 350 rpm. orbital karıştırıcıda inkübe edildi. Primer RhoA antikor ve HRP işaretli sekonder antikor kit içerisinde önerilen oranlarda antikor dilüe edici tampon ile

dilüe edilerek kullanıldı. Sekonder antikor inkübasyonu sonunda weller tekrar yıkama tamponu ile 3'er defa yıkandı. Ardından HRP A ve B solüsyonları 1:1 oranında karıştırılarak eşit miktarlarda wellere eklendi ve 37 °C'de 15 dk. etüvde bekletildi. Bu süre sonunda oluşan renk reaksiyonu wellere HRP stop solüsyonu eklenerek sonlandırıldı. Sonrasında ELİSA okuyucuda köre karşı pozitif kontrol (Rho kontrol protein) ile birlikte 490 nm de absorbansları ölçüldü.

3.2.8. Eritrosit Oraklaşmasına Rho-kinaz Enziminin Katkısının Değerlendirilmesi

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı tarafından Orak Hücre Anemisi tanısı almış hastalardan heparinli tüplere alınan venöz kan örneklerinde oraklaşma testi yapılarak Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632'nin eritrosit oraklaşmasını etkileyip etkilemediği araştırıldı.

Hastalardan alınan venöz kan örnekleri;

- Kontrol,
- Serum fizyolojik (Y-27632'nin çözücüsü) ile 45 dakika inkübe edilmiş kontrol ve
- Y-27632 ile dört farklı dozda (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) 45 dakika süre ile inkübe edilmiş üç grup şeklinde çalışıldı.

Kan örnekleri eşit miktarda kan ve serum fizyolojik ile (100µl/100µl) bir ependorf tüp içinde karıştırıldı. Bu karışımdan alınan 10 µl örnek 20 µl Na-metabisülfid stok (%2'lik) ile bir lam üzerinde karıştırıldıktan sonra üzeri lamel ile kapatıldı. Daha sonra lamelin etrafı oje ile yapıştırılarak zaman içinde eritrositlerin deoksijene olmaları beklendi. Deoksijenizasyona bağlı Na-metabisülfid ile oluşturulan oraklaşmanın 15, 30, 60 ve 90. dakikalarında her zaman dilimi için 3 farklı alandan olmak üzere eritrositlerin fotoğrafları çekildi. Çekilen mikroskopik fotoğraflardaki orak ve sağlıklı hücreler sayıldı ve her zaman dilimi için üç farklı alanın ortalamaları hesaplandı. Oraklaşma miktarı orak hücre/sağlıklı hücre % oranı olarak değerlendirildi.

3.3. Bulguların Değerlendirilmesi

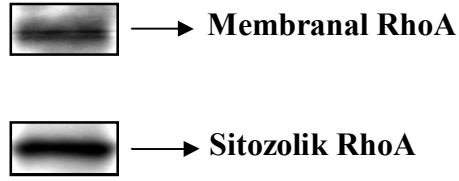
Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirilme için öncelikle verilerin Kolmogorov Smirnow testi ile normal dağılım kontrolü yapıldı. Dağılımı normal olan verilere Eğleştirilmiş t testi, normal dağılıma sahip olmayanlarda ise Wilcoxon Sign Rank testi uygulandı. % RhoA aktivasyon ve % oraklaşma oranlarının hesaplanmasında tek örneklem t testi kullanılırken mekanik stresin RhoA aktivasyonu üzerine etkisi Eğleştirilmemiş t test ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Eritrositlerde Membranal ve Sitololik RhoA Protein Ekspresyonları

Sağlıklı erkek donörlerden alınan kanlardan eritrositler izole edildikten sonra RhoA proteinini eksprese edip etmedikleri araştırıldı. Western Blot yöntemiyle eritrosit hücre homojenatlarının sitozolik ve membranal fraksiyonlarında RhoA proteininin varlığı gösterildi (Şekil 4.1).

Eritrosit Hücre Homojenatı

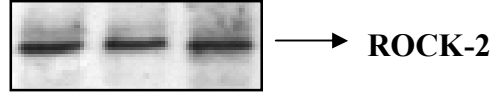


Şekil 4.1. Eritrosit hücre homojenatlarında RhoA protein ekspresyonlarının Western Blot yöntemiyle gösterilmesi. Eritrositler total kandan izole edildikten sonra lizis tamponu ile homojenize edildi. Sitololik ve membranal fraksiyonun ayırımı için 15.000 rpm. de 20 dk. santrifüjü takiben total protein konsantrasyonları Bradford yöntemiyle hesaplandı. Daha sonra % 10'luk SDS-poliakrilamid jel kuyucuklarına yüklenen sitozolik ve membranal protein fraksiyonları 150 voltta elektroforeze tabi tutuldu. Dansitelerine göre ayrılan proteinler nitroselüloz membrana sabit akım altında (90 mA) transfer edildi. RhoA proteinine karşı geliştirilmiş primer özgül antikor ile (Fare, monoklonal IgG, 1:500) ve sonrasında HRP ile konjüge edilmiş sekonder antikorla (1:2000) inkübe edilen membranlar ECL plus görüntüleme kiti yardımıyla radyolojik filmler üzerinde görüntülendi.

4.2. Eritrositlerde Rho-kinaz (ROCK-2) Enzim Ekspresyonunun Gösterilmesi

Sağlıklı erkek donörlerden alınan kanlardan eritrositler izole edildikten sonra Rho-kinaz enzimini eksprese edip etmedikleri araştırıldı. Western- Blot yöntemiyle eritrosit hücre homojenatlarında Rho-kinaz enziminin ROCK-2 izoformunun ekspresyonu tespit edildi (Şekil 4.2).

Eritrosit Hücre Homojenatı

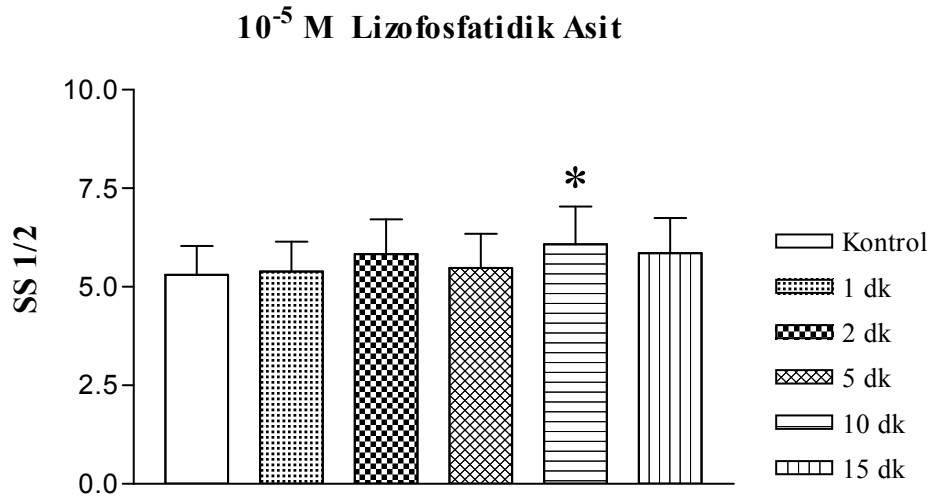


Şekil 4.2. Eritrosit hücre homojenatlarında Rho-kinaz (ROCK-2) enzim ekspresyonlarının Western Blot yöntemiyle gösterilmesi. Eritrositler total kandan izole edildikten sonra lizis tamponu ile homojenize edildi. Sızozolik ve membranal fraksiyonun ayırımı için 15000 rpm. de 20 dk. santrifüjü takiben total protein konsantrasyonları Bradford yöntemiyle hesaplandı. Daha sonra % 10'luk SDS-poliakrilamid jel kuyucuklarına yüklenen sızozolik protein fraksiyonları 150 voltta elektroforeze tabi tutuldu. Dansitelerine göre ayrılan proteinler nitroselüloz membrana sabit akım altında (90 mA) transfer edildi. ROCK-2 proteinine karşı geliştirilmiş primer özgül antikor ile (Fare, monoklonal IgG, 1:4000) ve sonrasında HRP ile konjüge edilmiş sekonder antikorla (1:2000) inkübe edilen membranlar ECL plus görüntüleme kiti yardımıyla radyolojik filmler üzerinde görüntülendi.

4.3. Lizofosfatidik Asidin Farklı Konsantrasyonlarda Eritrositlerde Zaman Bağımlı Deformabilite Değişikliklerine Etkisinin İncelenmesi

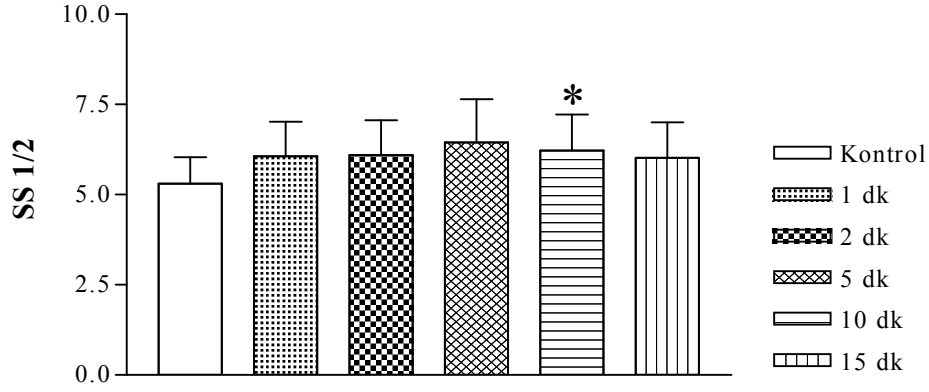
4.3.1. Lizofosfatidik Asidin Farklı Konsantrasyonlarda Eritrositlerde Zaman Bağımlı Olarak Maksimum Elongasyon İndeksinin Yarıları Kadar Şekil Değiştirmeye Neden Olan Kayma Kuvvetine (SS 1/2 Kuvvetlerine) Etkisi

Eritrosit süspansiyonları 10^{-5} , 2×10^{-5} ve 5×10^{-5} M konsantrasyonlarda ve 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika sürelerde lizofosfatidik asid ile oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra deformabiliteleri ölçüldü ve maksimum elongasyon indeksinin yarıları kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti (SS 1/2 kuvvetleri) hesaplandı. Kontrol grubunda ise eritrosit süspansiyonu lizofosfatidik asidin çözücüsü olan 10 mM fosfat tamponu ile oda sıcaklığında inkübe edildi. 10^{-5} ve 2×10^{-5} konsantrasyonlarda lizofosfatidik asit, SS1/2 kuvvetlerini 10. dakikada kontrole göre anlamlı olarak artırırken (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4), 5×10^{-5} M konsantrasyonda ise 1. dakikadaki artışlar kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bulundu (Şekil 4.5).



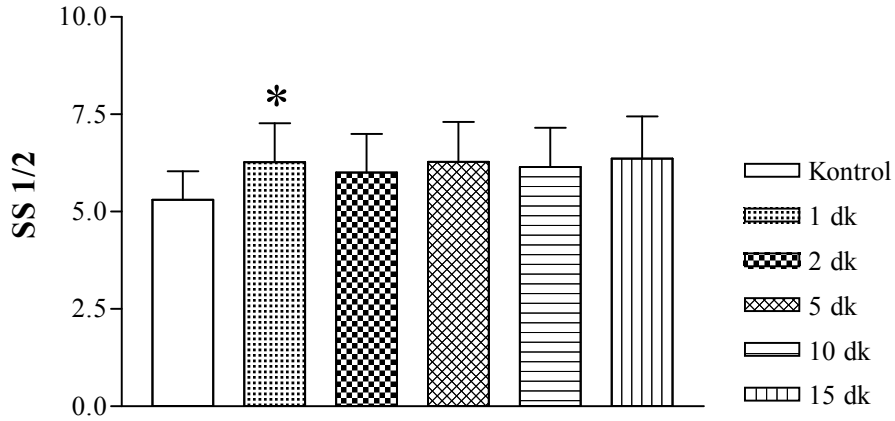
Şekil 4.3. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde maksimum elongasyon indeksinin yarıları kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvvetine etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı. *: $P < 0.05$, (n=8).

2x10⁻⁵ M Lizofosfatidik Asit



Şekil 4.4. 2x10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvvetine etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 2x10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı. *: P<0.05, (n=8).

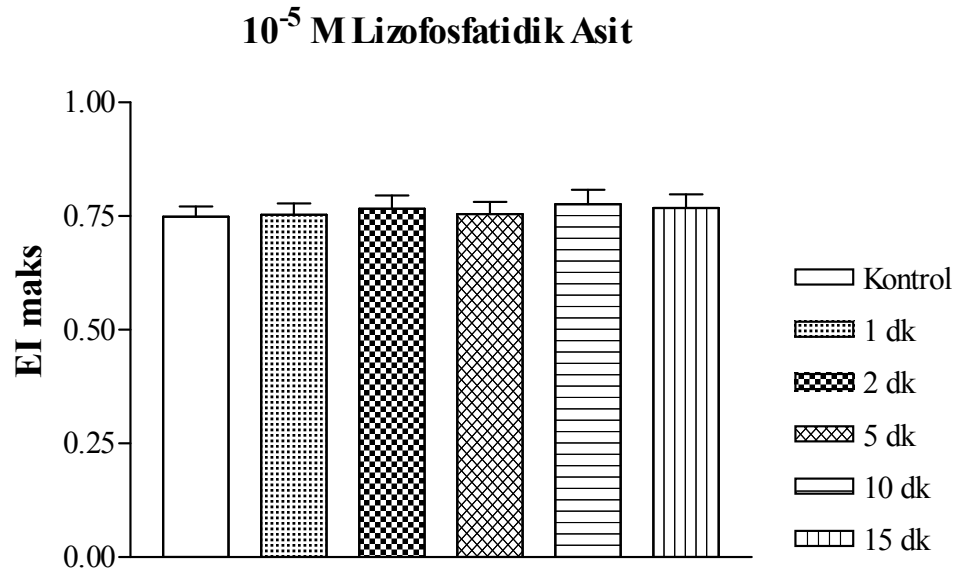
5x10⁻⁵ M Lizofosfatidik Asit



Şekil 4.5. 5x10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvvetine etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 5x10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı. *: P<0.05, (n=8).

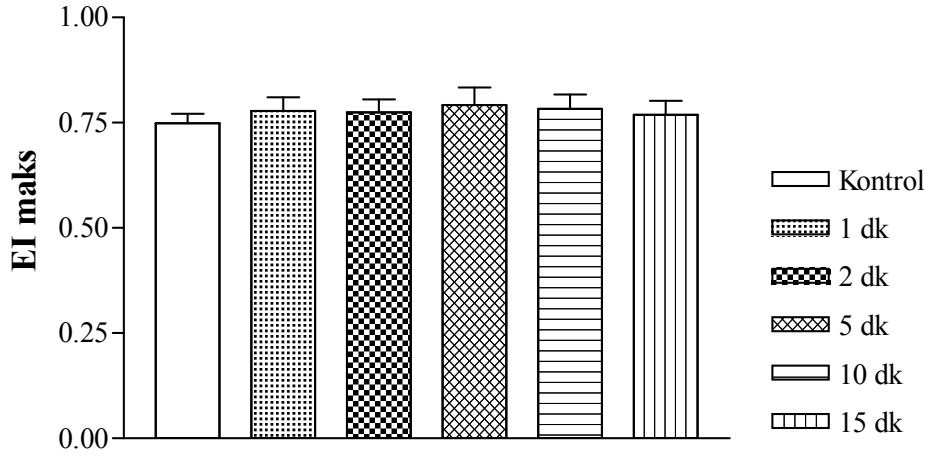
4.3.2. Lizofosfatidik Asidin Farklı Konsantrasyonlarda Eritrositlerde Zaman Bağımlı Olarak Maksimum Elongasyon İndeks (EI maks) Değerlerine Etkisi

Eritrosit süspansiyonları 10^{-5} , 2×10^{-5} ve 5×10^{-5} M konsantrasyonlarda ve 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika sürelerde lizofosfatidik asit ile oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra deformabiliteleri ölçüldü ve maksimum elongasyon indeksleri (EI maks) hesaplandı. Kontrol grubunda ise eritrosit süspansiyonu lizofosfatidik asidin çözücüsü olan 10 mM fosfat tamponu ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Lizofosfatidik asit EI maks değerlerini 10^{-5} ve 2×10^{-5} M konsantrasyonlarda 1, 2, 5, 10 ve 15. dakikalarda değiştirmezken (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7), 5×10^{-5} M konsantrasyonda 1. dakikada kontrole göre anlamlı olarak arttırmış bulundu (Şekil 4.8).



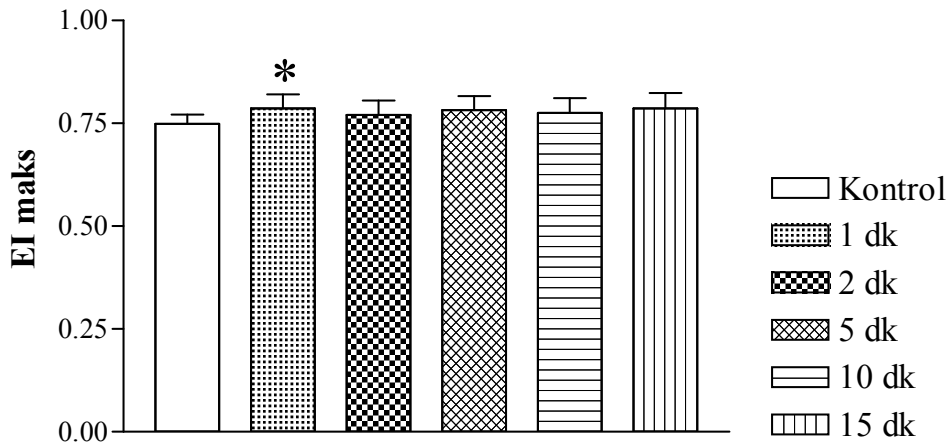
Şekil 4.6. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde maksimum elongasyon indekslerine etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı (n=8).

2x10⁻⁵ M Lizofosfatidik Asit



Şekil 4.7. 2x10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde maksimum elongasyon indekslerine etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 2x10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı (n=8).

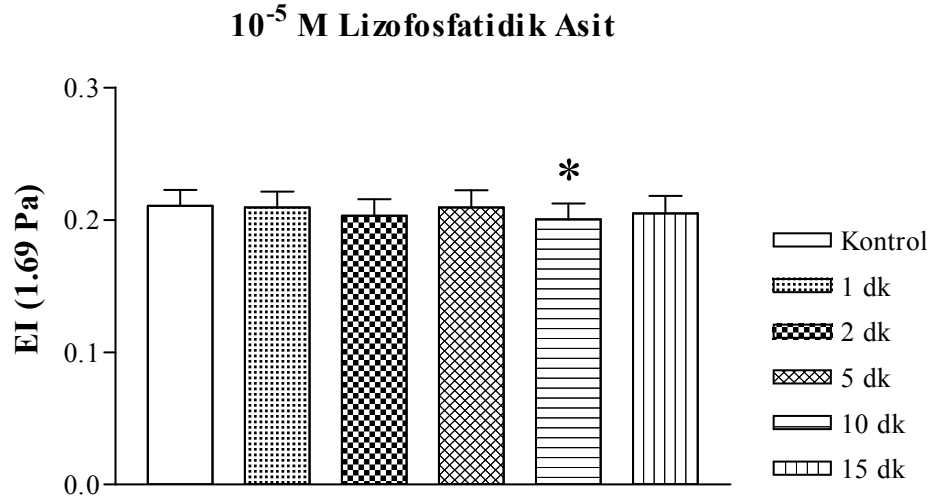
5x10⁻⁵ M Lizofosfatidik Asit



Şekil 4.8. 5x10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde maksimum elongasyon indekslerine etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 5x10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı. *: P<0.05, (n=8).

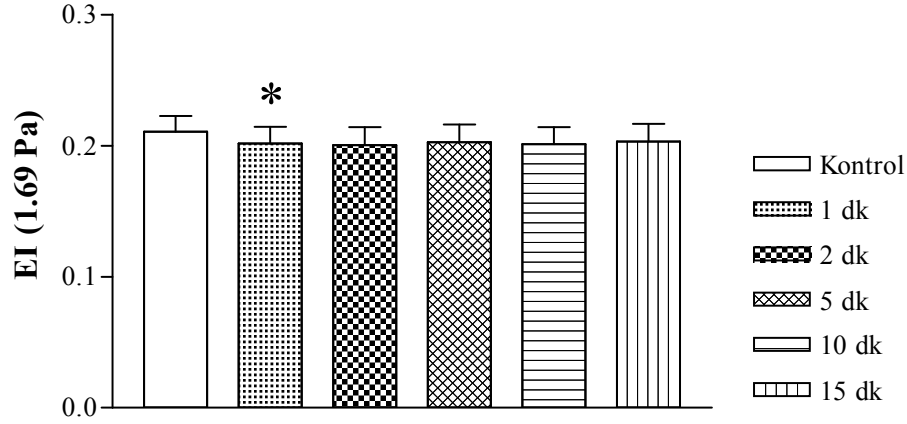
4.3.3. Lizofosfatidik Asidin Farklı Konsantrasyonlarda Eritrositlerde Zaman Bağımlı Olarak 1.69 Pa Kayma Kuvvetindeki Elongasyon İndeksi (EI 1.69 Pa) Değerlerine Etkisi

Eritrosit süspansiyonları 10^{-5} , 2×10^{-5} ve 5×10^{-5} M konsantrasyonlarda ve 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika sürelerde lizofosfatidik asit ile oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunda ise eritrosit süspansiyonu lizofosfatidik asidin çözücüsü olan 10 mM fosfat tamponu ile oda sıcaklığında inkübe edildi. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asit 10. dakikada elongasyon indeksini (EI 1.69 Pa) kontrole göre anlamlı şekilde azaltırken (Şekil 4.9), 2×10^{-5} M konsantrasyonda 1. dakikada, 5×10^{-5} M konsantrasyonda ise 1. ve 15. dakikalarda kontrole göre anlamlı olarak azalttı (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



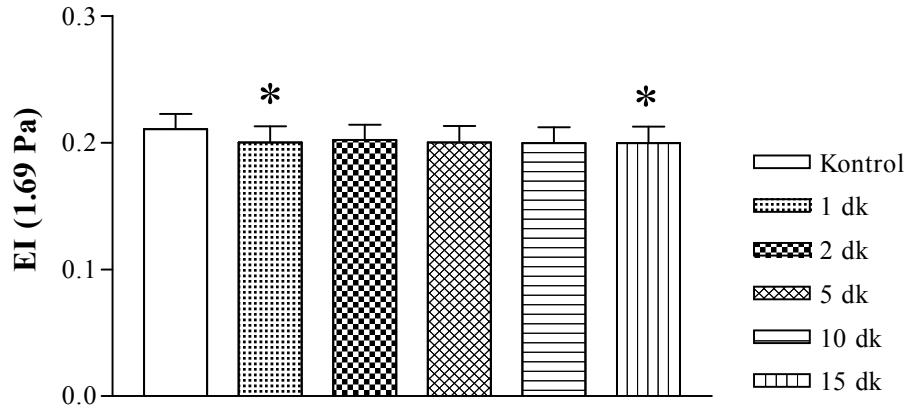
Şekil 4.9. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerine etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı. *: $P < 0.05$, (n=8).

2x10⁻⁵ M Lizofosfatidik Asit



Şekil 4.10. 2x10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerine etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 2x10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı. *: $P < 0.05$, (n=8).

5x10⁻⁵ M Lizofosfatidik Asit

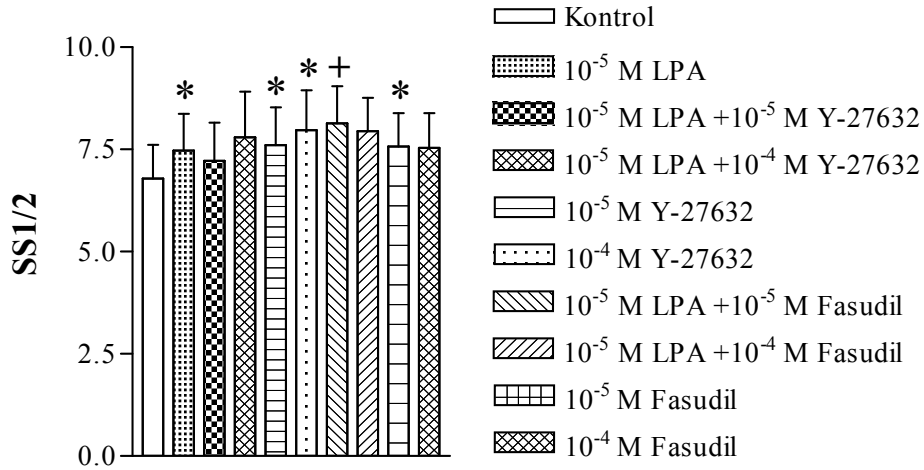


Şekil 4.11. 5x10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerine etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 5x10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 1, 2, 5, 10 ve 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı. *: $P < 0.05$, (n=8).

4.4. Eritrositlerde Lizofosfatidik Asit ile Oluşan Deformabilite Değişimlerine Rho-kinaz İnhibitörlerinin Etkisi

4.4.1. Maksimum Elongasyon İndeksinin Yarısı Kadar Şekil Değiştirmeye Neden Olan Kayma Kuvveti (SS 1/2 İndeksi) Değerlerine Rho-kinaz İnhibitörleri Y-27632 ve Fasudilin Etkileri

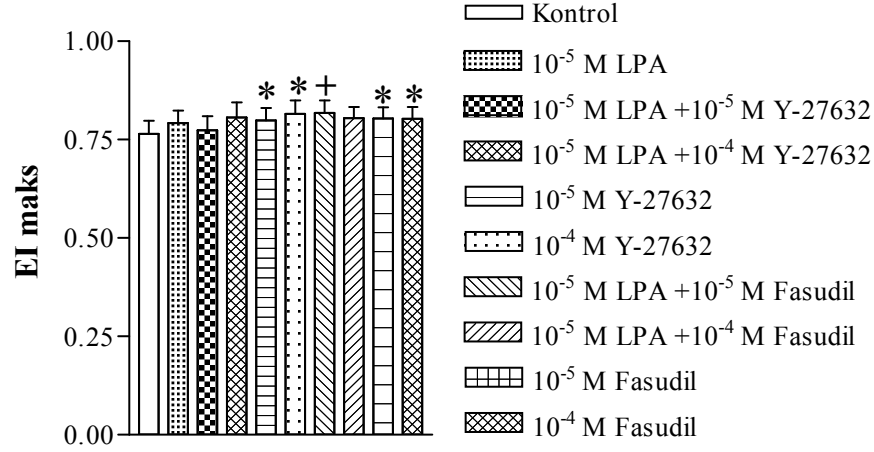
Daha önceki serilerde yapılan çalışmalarda lizofosfatidik asidin 10^{-5} M konsantrasyonda ve 10 dakika sürede deformabiliteyi azalttığı bulundu. Bu nedenle belirlenen bu konsantrasyon ve sürede Rho-kinaz inhibitörlerinin lizofosfatidik asit ile oluşan deformabilite bozukluklarına olan olası etkisi incelendi. Eritrosit süspansiyonlarının Rho-kinaz enzim inhibitörleri Y-27632 ve fasudil (10^{-5} ve 10^{-4} M, 45 dk.) ile oda sıcaklığında inkübasyonu sonrası, lizofosfatidik asit (10^{-5} M) ile 10 dakikada oluşan deformabilite bozulması üzerine etkileri incelendi. Kontrol grubunda ise eritrosit süspansiyonu lizofosfatidik asidin çözücüsü olan 10 mM fosfat tamponu ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Lizofosfatidik asit SS1/2 kuvvetlerini 10. dakikada kontrole göre anlamlı olarak arttırdı. Öte yandan 10^{-5} M ve 10^{-4} M konsantrasyonda Y-27632 ve 10^{-5} M konsantrasyonda fasudil tek başlarına uygulandıklarında SS1/2 kuvvetlerinde kontrole göre anlamlı artışlara neden oldu. Bununla birlikte Y-27632 (10^{-5} ve 10^{-4} M) ve fasudil (10^{-4} M) inkübasyonu 10^{-5} M lizofosfatidik asidin etkisini değiştirmezken, 10^{-5} M konsantrasyonda fasudil tek başına lizofosfatidik aside göre SS 1/2 değerlerinde daha fazla artış oluşturdu (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. 10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin (LPA) 10. dakikada oluşturduğu SS 1/2 kuvvet değişikliklerine Rho-kinaz inhibitörlerinin olası katkısının gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 10 dakika, Y-27632 ve fasudil ile (10⁻⁴ ve 10⁻⁵ M) 45 dakika inkübasyonu takiben 10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 10 dakika ve tek başına Y-27632 ve fasudil ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs Kontrol), +: $P < 0.05$ (vs LPA), (n=10).

4.4.2. Maksimum Elongasyon İndeksine Rho-kinaz İnhibitörleri Y-27632 ve Fasudilin Etkileri

Eritrosit süspansiyonları 10⁻⁵ M konsantrasyonda 10 dakika süre lizofosfatidik asit ile oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra Rho-kinaz enzim inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin maksimum elongasyon indekslerine (EI maks) etkisi değerlendirildi. Kontrol grubunda ise eritrosit süspansiyonu lizofosfatidik asidin çözücüsü olan 10 mM fosfat tamponu ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Lizofosfatidik asit inkübasyonu EI maks değerlerini değiştirmedi. Tek başlarına Y-27632 ve fasudil (10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M) inkübasyonları ile EI maks değerleri kontrole göre anlamlı olarak arttı. Diğer taraftan lizofosfatidik asit, Y-27632 (10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M) ve 10⁻⁴ M fasudilin EI maks değerleri üzerindeki etkisini geri çevirirken, 10⁻⁵ M konsantrasyonda fasudilin (45 dk.) etkisini değiştirmedi (Şekil 4.13).

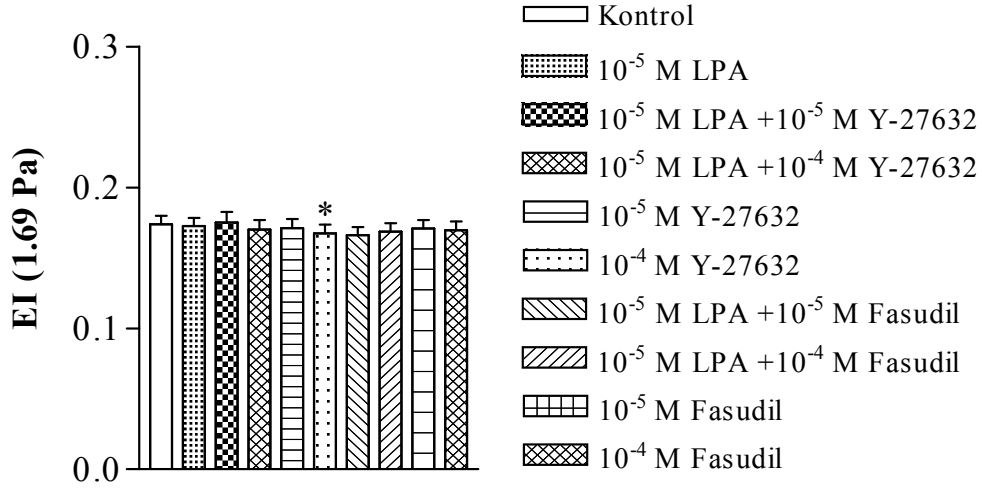


Şekil 4.13. 10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin (LPA) 10. dakikada oluşturduğu EI maks değerlerine Rho-kinaz inhibitörlerinin olası katkısının gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 10 dakika, Y-27632 ve fasudil ile (10⁻⁴ ve 10⁻⁵ M) 45 dakika inkübasyonu takiben 10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 10 dakika ve tek başına Y-27632 ve fasudil ile dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs Kontrol), +: $P < 0.05$ (vs LPA), (n=10).

4.4.3. 1.69 Pa Kayma Kuvvetindeki Elongasyon İndeksi (EI 1.69 Pa) Değerlerine Rho-kinaz İnhibitörleri Y-27632 ve Fasudilin Etkileri

Eritrosit süspansiyonları 10⁻⁵ M konsantrasyonda 10 dakika süre lizofosfatidik asit ile oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra Rho-kinaz enzim inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin (10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M) 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerine etkisi değerlendirildi. Kontrol grubunda ise eritrosit süspansiyonu lizofosfatidik asidin çözücüsü olan 10 mM fosfat tamponu ile oda sıcaklığında inkübe edildi. 10⁻⁵ M konsantrasyonda lizofosfatidik asit inkübasyonu elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerini 10. dakikada etkilemedi. Öte yandan Y-27632 ve fasudil (10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M) ile birlikte lizofosfatidik asit uygulaması da (EI 1.69 Pa) değerlerinde bir değişiklik oluşturmadı. Ancak tek başına 10⁻⁴ M konsantrasyonda Y-27632 inkübasyonu elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerini ve dolayısıyla eritrosit deformabilitelerini kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı. Bununla birlikte daha düşük konsantrasyonda (10⁻⁵ M) Y-27632 ve fasudilin her iki

konsantrasyonu da (10^{-5} ve 10^{-4} M) tek başlarına uygulandıklarında (EI 1.69 Pa) değerlerinde bir değişiklik oluşturmadı (Şekil 4.14).



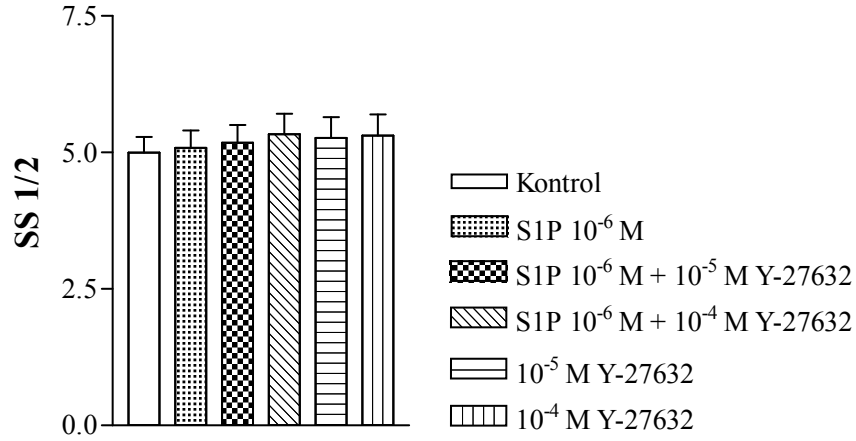
Şekil 4.14. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin (LPA) 10. dakikada oluşturduğu EI (1.69 Pa) değerlerine Rho-kinaz inhibitörlerinin olası katkısının gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 10 dakika, Y-27632 ve fasudil ile (10^{-4} ve 10^{-5} M) 45 dakika inkübasyonu takiben 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asit ile 10 dakika ve tek başına Y-27632 ve fasudil ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs Kontrol), (n=10).

4.5. Sfingozin-1 Fosfatın Eritrositlerde Deformabilite Değişikliklerine Etkisi ve Rho-kinaz İnhibitörü Y-27632'nin Olası Katkısı

4.5.1. Eritrositlerde Maksimum Elongasyon İndeksinin Yarısı Kadar Şekil Değiştirmeye Neden Olan Kayma Kuvvetine (SS 1/2 Kuvvetleri) Sfingozin-1 Fosfatın Etkisi ve Rho-kinaz İnhibitörü Y-27632'nin Olası Katkısı

Eritrosit süspansiyonları 10^{-6} M konsantrasyonda sfingozin-1 fosfat ile 5 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvvetine (SS 1/2 kuvvetleri) etkisi

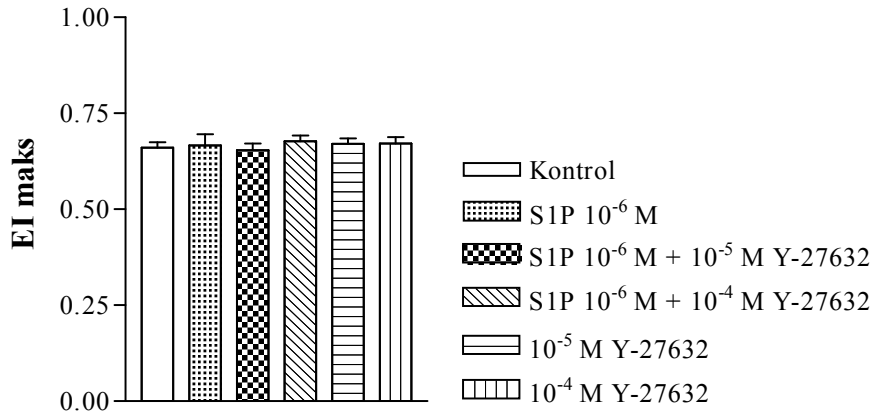
değerlendirildi. Sfingozin 1-P ve Y-27632 (10^{-4} M ve 10^{-5} M) tek başlarına ve birlikte inkübe edildiklerinde SS 1/2 kuvvetlerini değiştirmede (şekil 4.15).



şekil 4.15. 10^{-6} M konsantrasyonda 5 dakika sfingozin-1 fosfat (S1P) inkübasyonlarının eritrosit SS1/2 kuvvetlerine etkisi ve buna Rho-kinaz inhibitörlerinin olası katkısının gösterilmesi. Eritrosit süspanسیونlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 10^{-6} M konsantrasyonda sfingozin-1 fosfat ile 5 dk., Y-27632 (10^{-4} ve 10^{-5} M) ile 45 dakika inkübasyonu takiben 10^{-6} M konsantrasyonda sfingozin-1 fosfat ile 5 dakika ve tek başına Y-27632 (10^{-4} ve 10^{-5} M) ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı (n=7).

4.5.2. Maksimum Elongasyon İndeksi (EI maks) Değerlerine Sfingozin-1 Fosfatın Etkisi ve Rho-kinaz İnhibitörü Y-27632'nin Olası Katkısı

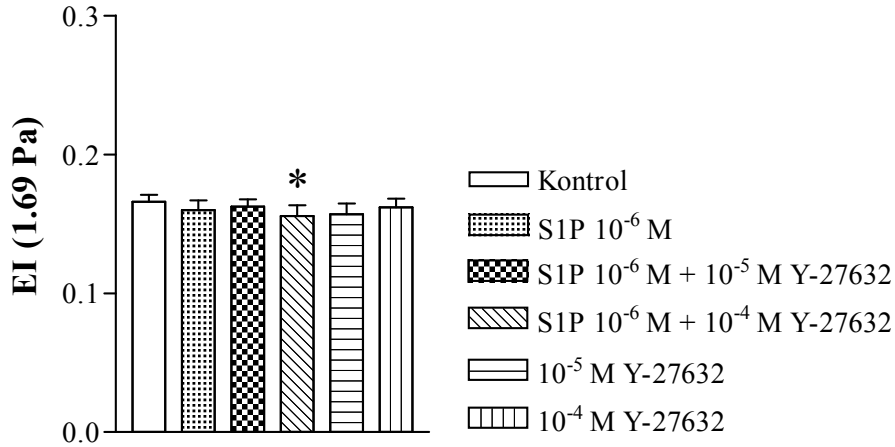
Eritrosit süspanسیونları 10^{-6} M konsantrasyonda sfingozin-1 fosfat ile 5 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra maksimum elongasyon indekslerine etkisi değerlendirildi. Sfingozin 1-P (10^{-6} M ve 5 dk.) ve Y-27632 (10^{-4} ve 10^{-5} M) tek başlarına ve birlikte oda sıcaklığında inkübe edildiklerinde EI maks değerlerini değiştirmede (şekil 4.16).



Şekil 4.16. 10^{-6} M konsantrasyonda 5 dakika sfingozin-1 fosfat inkübasyonlarının eritrosit EI maks değerlerine etkisi ve buna Rho-kinaz inhibitörlerinin olası katkısının gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 10^{-6} M konsantrasyonda sfingozin-1 fosfat ile 5 dakika, Y-27632 (10^{-4} ve 10^{-5} M) ile dakika inkübasyonu takiben 10^{-6} M konsantrasyonda sfingozin-1 fosfat ile 5 dakika ve tek başına Y-27632 (10^{-4} ve 10^{-5} M) ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteyi LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı (n=7).

4.5.3. 1.69 Pa Kayma Kuvvetindeki Elongasyon İndeksi (EI 1.69 Pa) Değerlerine Sfingozin-1 Fosfatın Etkisi ve Rho-kinaz İnhibitörü Y-27632'nin Olası Katkısının

Sfingozin 1 P (10^{-6} M, 5 dk.) eritrosit süspansiyonlarında 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerini değiştirmede. Aynı şekilde Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'de (10^{-5} ve 10^{-4} M) tek başına EI 1.69 Pa değerlerini değiştirmezken buna karşılık 10^{-4} M Y-27632 ve sfingozin 1-P birlikte inkübe edildiğinde elongasyon indeks (EI 1.69 Pa) değerlerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. 10⁻⁶ M konsantrasyonda 5 dakika sfingozin-1 fosfat inkübasyonlarının eritrosit EI (1.69 Pa) değerlerine etkisi ve buna Rho-kinaz inhibitörlerinin olası katkısının gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri plazma ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 10⁻⁶ M konsantrasyonda sfingozin-1 fosfat ile 5 dakika, Y-27632 (10⁻⁴ ve 10⁻⁵ M) ile 45 dakika inkübasyonu takiben 10⁻⁶ M konsantrasyonda sfingozin-1 fosfat ile 5 dk. ve tek başına Y-27632 (10⁻⁴ ve 10⁻⁵ M) ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı. *: P<0.05 (vs S1P 10⁻⁶ M), (n=7).

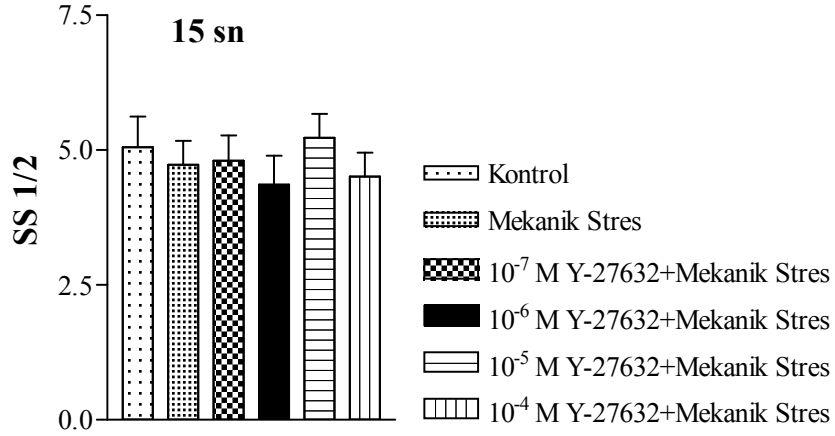
4.6. Eritrositlerde Mekanik Strese Bağlı Olarak Azalan Deformabilite Özelliklerine Rho-Kinaz Enzim İnhibitörü Y-27632'nin Etkisi

4.6.1. 15 Saniye Süre ile 120 Pa Mekanik Strese Maruz Bırakılan Eritrositlerde Rho-Kinaz Enzim İnhibitörü Y-27632'nin Deformabilite Bozukluğuna Etkisi

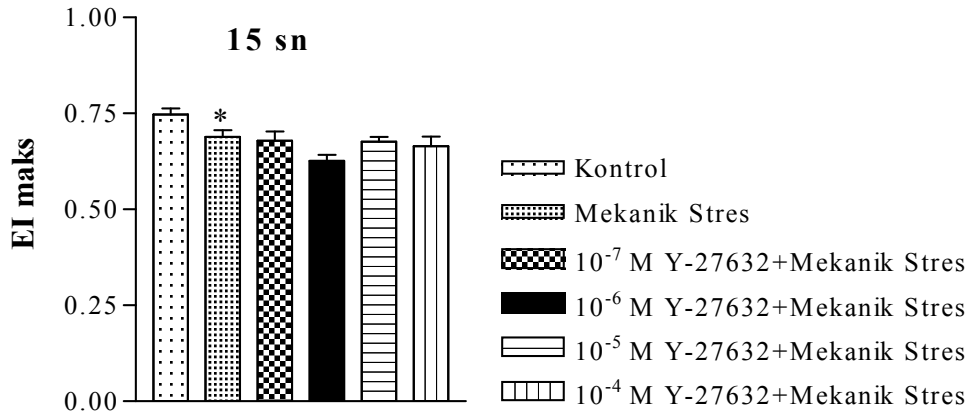
Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 15 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Diğer taraftan mekanik stresin neden olduğu deformabilite değişimlerine Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632'nin (10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M, 45 dakika) etkisi incelendi. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı.

Uygulanan mekanik stres sonucunda eritrositlerde maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti (SS 1/2 kuvvetleri) ve 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerinde kontrolle

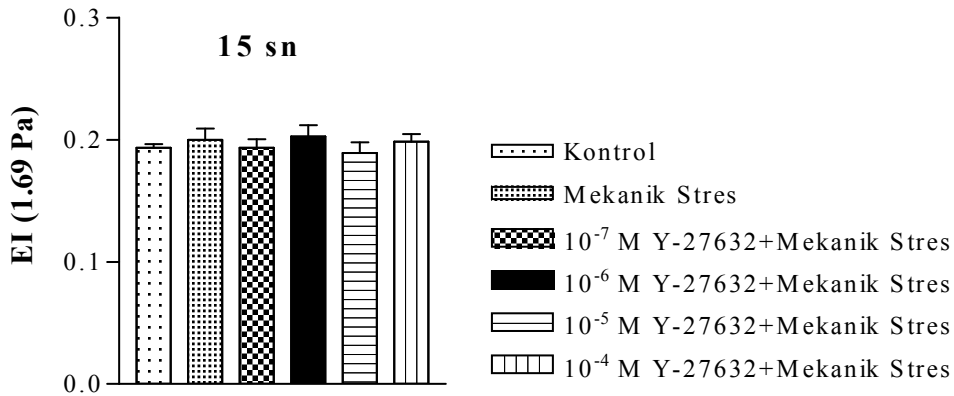
karşılaştırıldığında bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.18, Şekil 4.20) Ancak maksimum elongasyon indeks (EI maks) değerleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmış olarak bulundu. Bununla birlikte Y-27632 (10^{-7} - 10^{-4} M) mekanik stresin EImax değerleri üzerindeki etkisini değiştirmede (Şekil 4.19).



Şekil 4.18. 15 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki SS1/2 kuvvetlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandı. 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M konsantrasyonlarda Y-27632 ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 15 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı (n=6).



Şekil 4.19. 15 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI maks değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandı. 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M konsantrasyonlarda Y-27632 ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 15 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs Kontrol) (n=6).

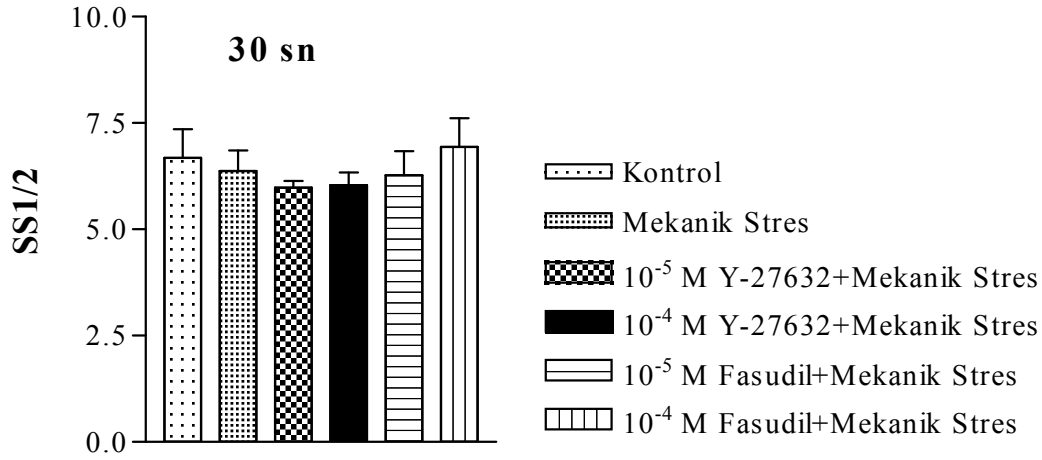


Şekil 4.20. 15 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (1.69 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandı. 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M konsantrasyonlarda Y-27632 ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 15 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Wilcoxon Signed Ranks Test kullanıldı (n=6).

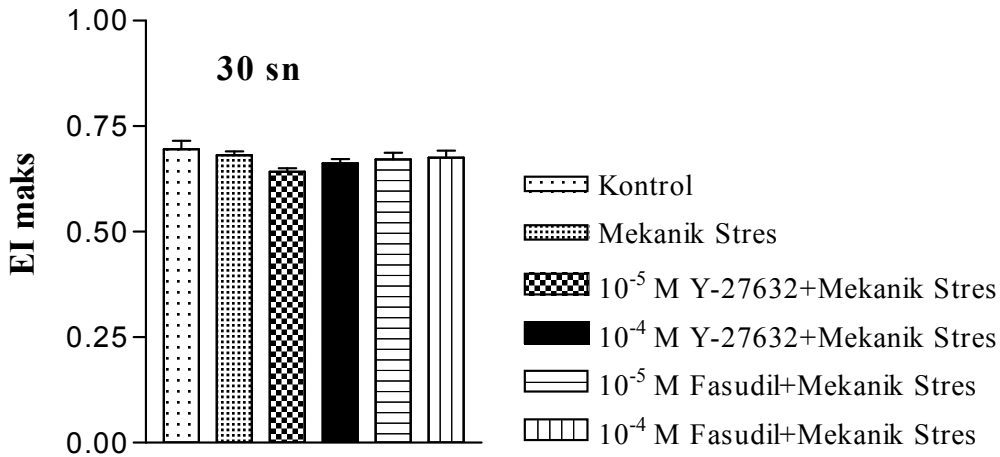
4.6.2. 30 Saniye Süre ile 120 Pa Mekanik Strese Maruz Bırakılan Eritrositlerde Rho-Kinaz Enzim İnhibitörü Y-27632'nin Deformabilite Bozukluğuna Etkisi

Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Diğer taraftan mekanik stresin neden olduğu deformabilite değişimlerine Rho-kinaz inhibitörlerinin etkisini değerlendirmek için ise eritrosit süspansiyonları Rho-kinaz enzim inhibitörleri Y-27632 ve fasudil ile (10^{-5} ve 10^{-4} M, 45 dakika) oda sıcaklığında inkübe edildi ve sonrasında 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldıktan sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı.

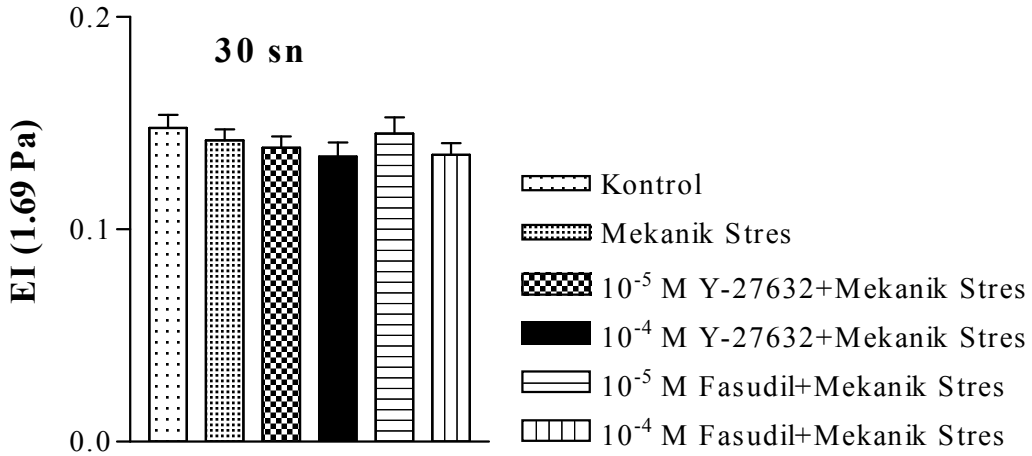
Uygulanan mekanik stres sonucunda eritrositlerin deformabilite ölçüm sonuçlarına göre maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti (SS 1/2 kuvvetleri) ve maksimum elongasyon indeks (EI maks) değerleri ve 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerinde kontrole karşılaştırıldığında bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23) Ancak 3.00 Pa, 5.33 Pa, 9.5 Pa, 16.88 Pa ve 29.92 Pa gibi artan kayma kuvvetlerinde elongasyon indeksleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmış olarak bulundu (Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27 ve Şekil 4.28). Öte yandan Y-27632 ve fasudil (10^{-5} M ve 10^{-4} M, 45 dakika) bu değerlerde mekanik stres ile karşılaştırıldığında herhangi bir değişime neden olmadı.



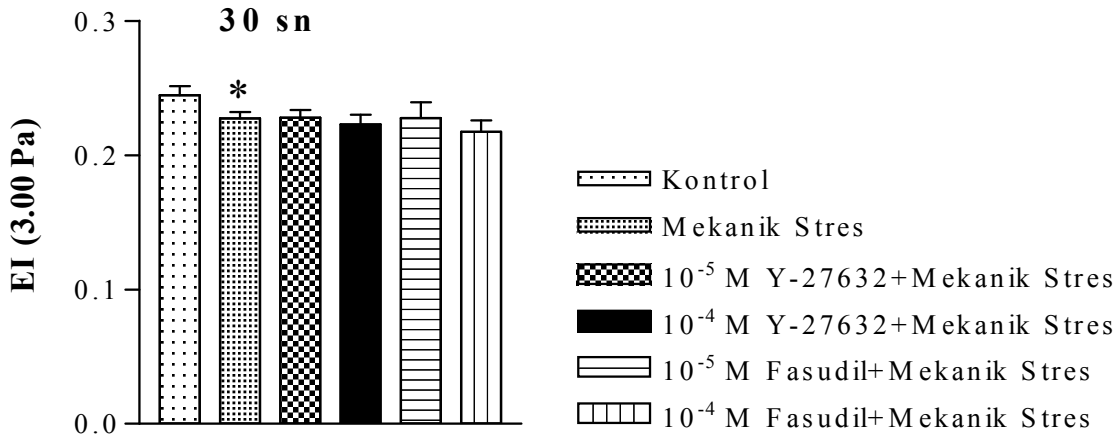
Şekil 4.21. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki SS1/2 kuvvetlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandı. Y-27632 ve fasudil ile (10^{-4} ve 10^{-5} M) 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı (n=10).



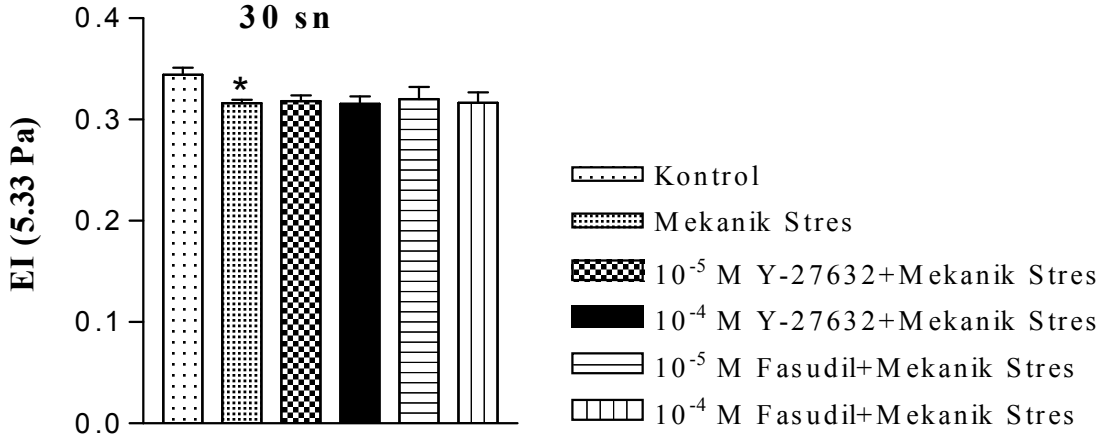
Şekil 4.22. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI maks değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandı. Y-27632 ve fasudil ile (10^{-4} ve 10^{-5} M) 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı (n=10).



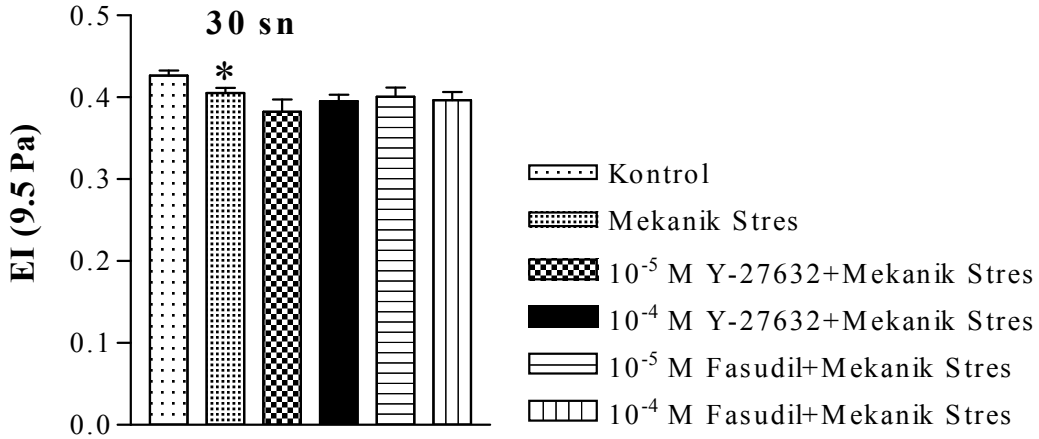
Şekil 4.23. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (1.69 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandı. Y-27632 ve fasudil ile (10^{-4} ve 10^{-5} M) 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı, (n=10).



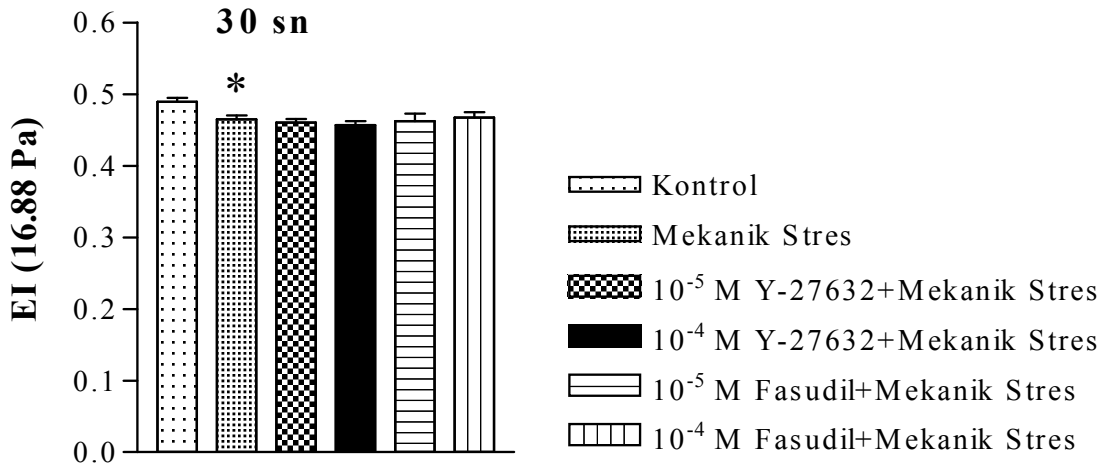
Şekil 4.24. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (3,00 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandı. Y-27632 ve fasudil ile (10^{-4} ve 10^{-5} M) 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs Kontrol), (n=10).



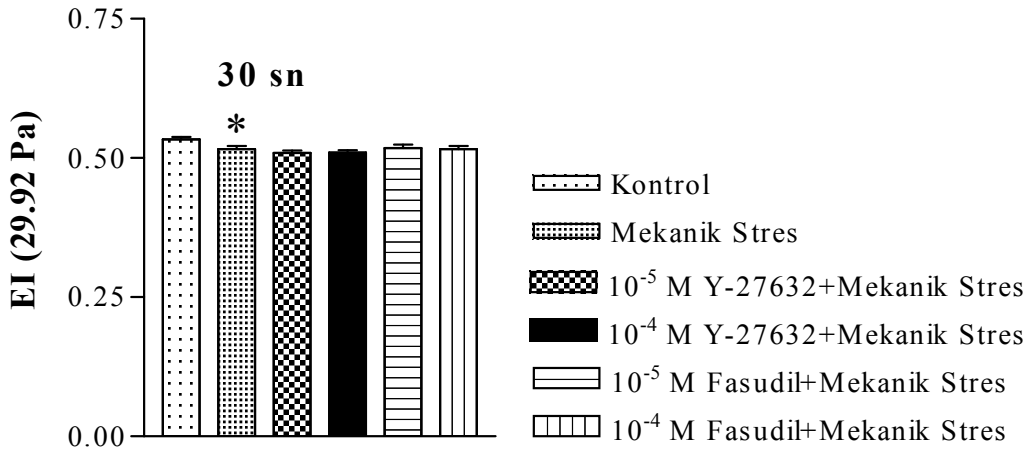
Şekil 4.25. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (5,33 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandı. Y-27632 ve fasudil ile (10^{-4} ve 10^{-5} M) 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs Kontrol), (n=10).



Şekil 4.26. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (9,5 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandı. Y-27632 ve fasudil ile (10^{-4} ve 10^{-5} M) 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs Kontrol) (n=10).



Şekil 4.27. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (16,88 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandı. Y-27632 ve fasudil ile (10^{-4} M ve 10^{-5} M) 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı. *: $P<0.05$ (vs Kontrol), (n=10).

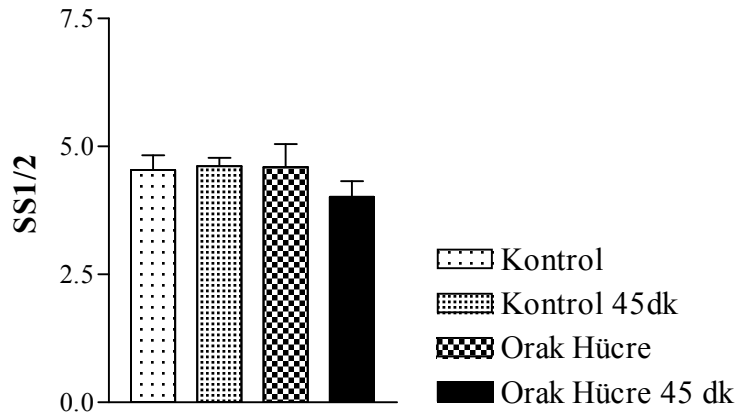


Şekil 4.28. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerdeki EI (29,92 Pa) değerlerindeki değişimler ve bu değişimlere Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandı. Y-27632 ve fasudil ile (10^{-4} ve 10^{-5} M) 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı ve sonra deformabiliteleri ölçüldü. Kontrol grubunun ise hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra mekanik stres uygulanmaksızın deformabilite ölçümleri yapıldı. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı. *: $P<0.05$ (vs Kontrol), (n=10).

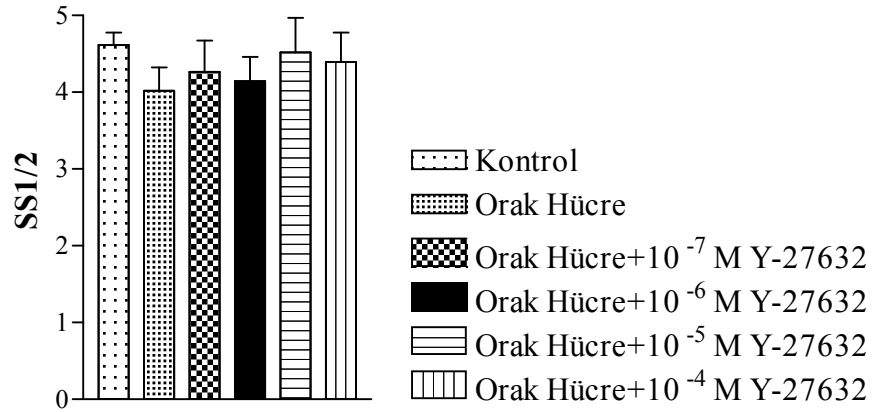
4.7. Orak Hücre Anemili Hastalarda Eritrosit Deformabilitesine Rho-kinaz Enzim İnhibitörü Y-27632'nin Etkisi

Gönüllü Orak Hücre Anemili hastalardan alınan kan örneklerinde eritrosit deformabiliteleri sağlıklı donörlerle karşılaştırıldı. Ayrıca Orak Hücre Anemili hastaların eritrositlerindeki deformabilite değişimlerine Rho-kinaz inhibitörlerinin etkisi incelendi. Bunun için hastaların eritrositleri Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 ile (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M, 45 dakika) oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra deformabiliteleri değerlendirildi. Öte yandan hasta eritrositlerinin kontrol grubu (Orak Hücre) ve sağlıklı donör kanları (Kontrol) ise Y-27632'nin çözücüsü olan serum fizyolojik ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Ayrıca 45 dk. lık inkübasyon için bekleme süresinin sağlıklı donör ve hasta eritrositlerinde deformabilite üzerine etkisi araştırıldı.

45 dk. inkübasyon gerek sağlıklı gerekse Orak Hücre Anemili hastaların eritrositlerinde deformabilite ölçüm sonuçlarına göre maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti (SS 1/2 kuvvetleri) değerlerini değiştirmezken Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632'nin de herhangi bir etkisi gözlenmedi (Şekil 4.29, Şekil 4. 30).

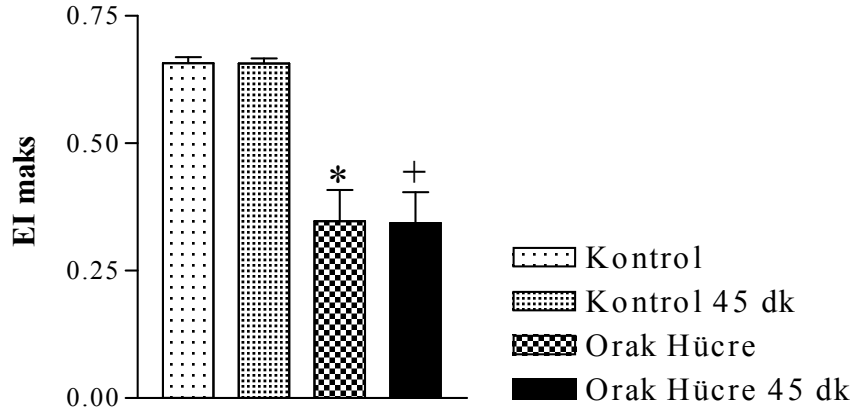


Şekil 4.29. Sağlıklı donör (Kontrol) ve hasta kanlarında eritrosit deformabilitelerinin SS1/2 kuvvetleri ile karşılaştırılması. Sağlıklı donör (Kontrol) ve hasta kanlarında başlangıçta ve 45 dk. inkübasyonu takiben eritrosit deformabilite ölçümleri yapıldı. İnkübasyon süresince kanlar Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632'nin çözücüsü olan serum fizyolojik ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı (n=7).

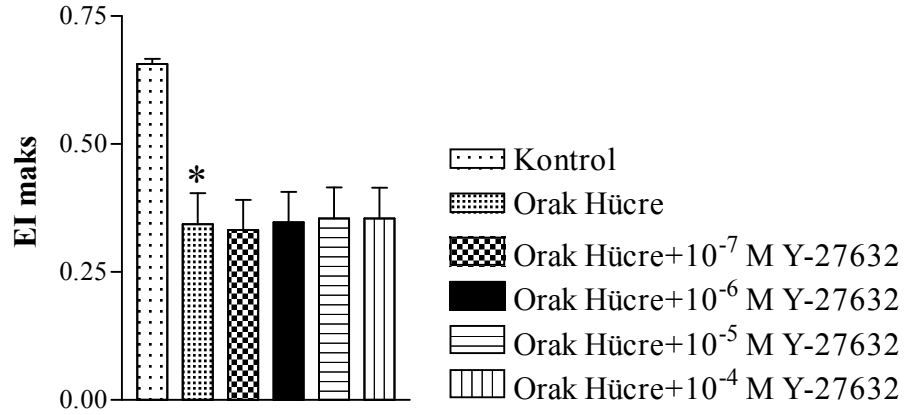


Şekil 4.30. Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin Orak Hücreli Hastalarda SS1/2 kuvvetlerine etkisinin gösterilmesi. Sağlıklı donör (Kontrol) ve hasta kanları 45 dk. serum fizyolojik ile ve hasta kanlarında Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı (n=7).

Öte yandan maksimum elongasyon indeks değerlerine bakıldığında, Orak Hücre Anemili hastalarda eritrosit EI maks değerlerinin sağlıklı kontrol kanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde düşük olduğu fakat 45 dk. serum fizyolojik ile inkübasyonun bu değerlerde anlamlı değişiklikler oluşturmadığı gözlemlendi (Şekil 4.31). Ayrıca Y-27632'nin orak hücre anemili hastalarda eritrosit deformabilitesini etkilemediği görüldü (Şekil 4.32).



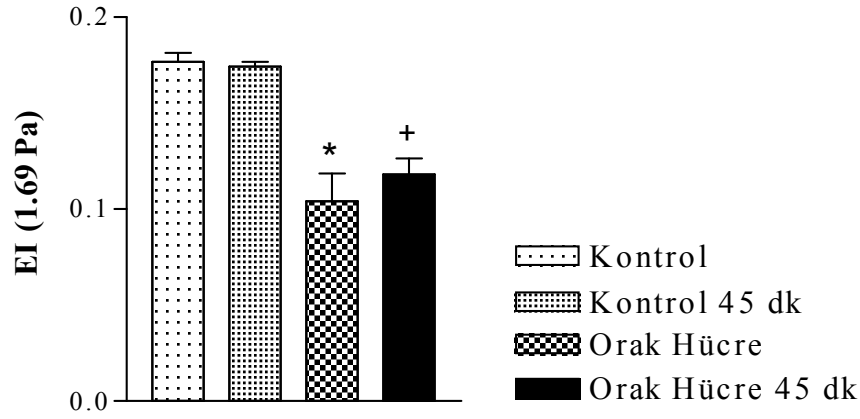
Şekil 4.31. Sağlıklı donör (Kontrol) ve hasta kanlarında eritrosit deformabilitelerinin EI maks değerleri ile karşılaştırılması. Sağlıklı donör (Kontrol) ve hasta kanlarında başlangıç ve 45 dk. inkübasyonu takiben eritrosit deformabilite ölçümleri yapıldı. İnkübasyon yapılan kanlar Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin çözücüsü olan serum fizyolojik ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs Kontrol), +: $P < 0.05$ (vs Kontrol 45 dk), (n=7).



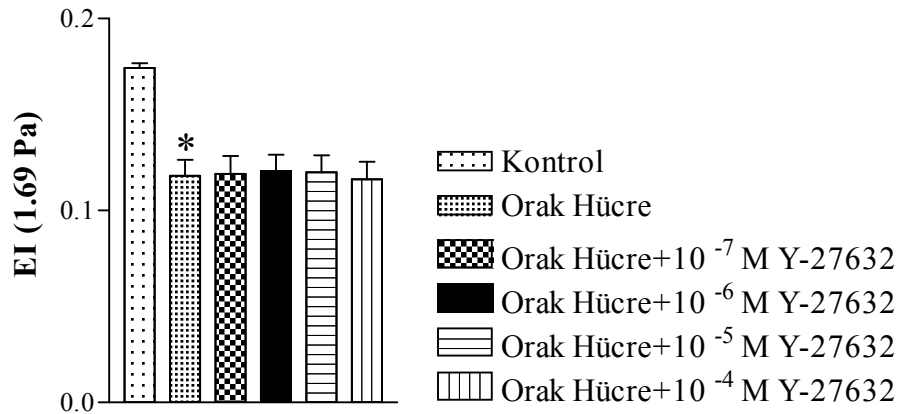
Şekil 4.32. Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin Orak Hücreli Hastalarda EI maks değerlerine etkisinin gösterilmesi. Sağlıklı donör (Kontrol) ve hasta kanları 45 dk. serum fizyolojik ile ve hasta kanlarında Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 ile 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M konsantrasyonlarda oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs Kontrol), (n=7).

Diğer taraftan 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeksi (EI 1.69 Pa) değerlerini incelediğimizde de Orak Hücre Anemili hastalarda eritrosit EI 1.69 Pa değerlerinin sağlıklı kontrol kanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde düşük olduğu fakat 45 dk. serum fizyolojik ile inkübasyonun bu değerlerde anlamlı

değişiklikler oluşturmadığı gözlemlendi (Şekil 4.33). Ayrıca Y-27632'nin (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M, 45 dakika) hastalarda eritrosit EI 1.69 Pa değerlerini de etkilemediği görüldü (Şekil 4.34).



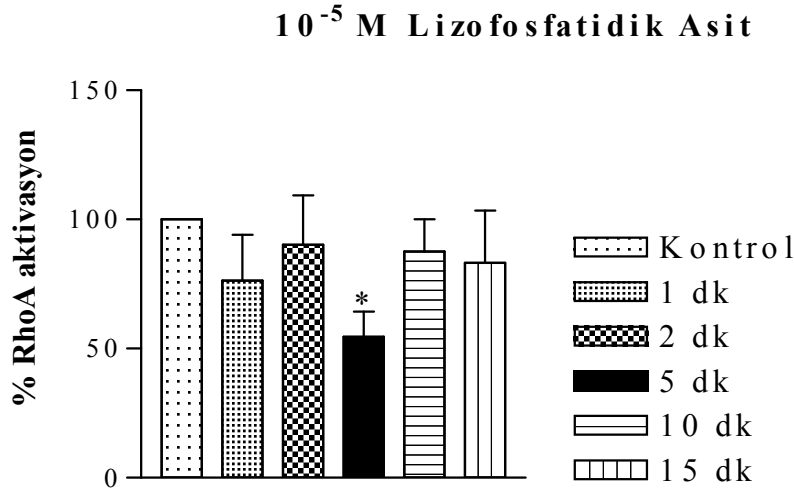
Şekil 4.33. Sağlıklı donör (Kontrol) ve hasta kanlarında eritrosit deformabilitelerinin EI 1,69 Pa değerleri ile karşılaştırılması. Sağlıklı donör ve hasta kanlarında başlangıç ve 45 dk. inkübasyonu takiben eritrosit deformabilite ölçümleri yapıldı. İnkübasyon yapılan kanlar Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin çözücüsü olan serum fizyolojik ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs Kontrol), +: $P < 0.05$ (vs Kontrol 45 dk), (n=7).



Şekil 4.34. Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin Orak Hücreli Hastalarda EI 1,69 Pa değerlerine etkisinin gösterilmesi. Sağlıklı donör (Kontrol) ve hasta kanları 45 dk. serum fizyolojik ile ve hasta kanlarında Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 ile 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M konsantrasyonlarda oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrosit deformabiliteleri LORCA ektasitometre kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmiş t testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs Kontrol), (n=7).

4.8. Eritrositlerde Lizofosfatidik Asit (10^{-5} M) İle Farklı Sürelerde İnkübasyonların RhoA Aktivasyonları Üzerine Etkisi

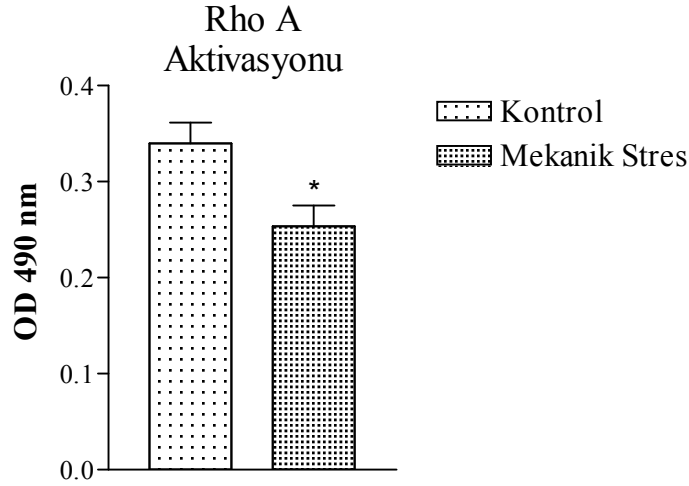
Eritrosit süspansiyonları 10^{-5} M Lizofosfatidik asit ile 1, 2, 5, 10 ve 15'er dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildikten G-LISA aktivasyon ölçüm kiti ile RhoA aktivasyonlarına bakıldı. Lizofosfatidik asidin 5 dakika süre ile inkübasyonu RhoA aktivitesini anlamlı bir biçimde azaltmış olarak bulundu (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. 10^{-5} M konsantrasyonda lizofosfatidik asidin farklı sürelerde eritrositlerde RhoA protein aktivasyonuna etkisinin gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonları lizofosfatidik asit (10^{-5} M) ile oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra G-LISA aktivasyon ölçüm kiti ile RhoA protein aktivasyonları ölçüldü. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Tek örneklem t testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs Kontrol), (n=8).

4.9. 30 Saniye Süre ile 120 Pa Mekanik Strese Maruz Bırakılan Eritrositlerde RhoA Protein Aktivasyonu

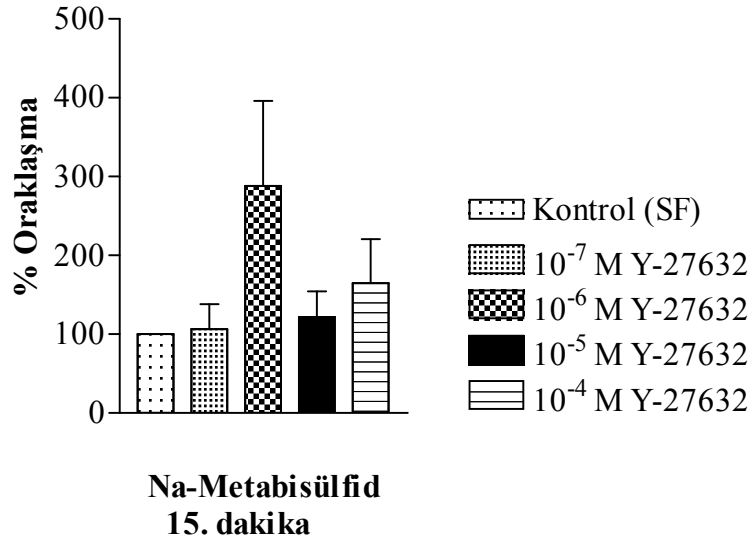
Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı. Mekanik stres uygulaması sonrasında hızlıca ependorf tüplere alınarak sıvı azot içerisinde donduruldu. Sonrasında G-LISA aktivasyon ölçüm kiti ile RhoA aktivasyonlarına bakıldı. Mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında RhoA protein aktivasyonunun anlamlı olarak azaldığı görüldü (Şekil 4.36).



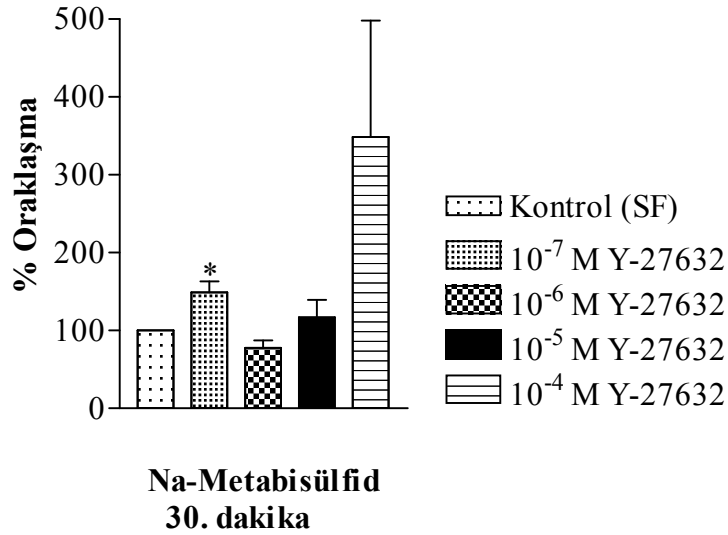
Şekil 4.36. 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerde RhoA protein aktivasyonunun gösterilmesi. Eritrosit süspansiyonlarının hematokrit düzeyleri %25 dextran 40 içeren fosfat tamponu ile % 40 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 30 saniye süre ile 120 Pa mekanik strese maruz bırakıldı. Mekanik stres uygulaması sonrası hızlıca ependorf tüplere alınarak sıvı azot içerisinde donduruldu. Sonrasında G-LİSA aktivasyon ölçüm kiti ile RhoA aktivasyonlarına bakıldı. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Eşleştirilmemiş *t* test kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs kontrol), (n=4).

4.10. Orak Hücre Anemili Hastalarda Eritrosit Oraklaşmasına Rho-kinazın Katkısı

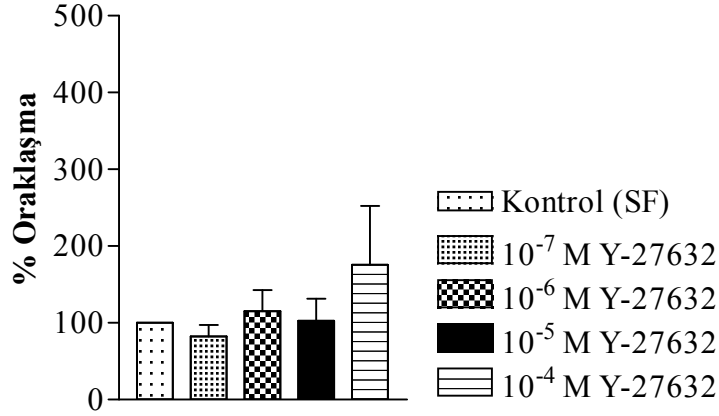
Gönüllü Orak Hücre Anemili hastalardan alınan kan örneklerinde Na-metabisülfid ile oraklaşma testi gerçekleştirildi ve Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632'nin hasta kanlarında eritrosit oraklaşması üzerine etkisi incelendi. Bunun için Na-metabisülfid ile oraklaşmanın 15, 30, 60 ve 90. dakikalarında eritrositlerin oraklaşma yüzdeleri hesaplandı. Bu bulgulara göre; Na-metabisülfid ile oraklaşmanın 15. dakikasında Y-27632'nin (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M, 45 dakika) oraklaşma oranlarına herhangi bir etkisi olmazken (Şekil 4.37), 10^{-7} M Y-27632'nin 30. dakikada oraklaşma oranını anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi (Şekil 4.38). Öte yandan 60. ve 90. dakikalarda da Na-metabisülfide cevaben oluşan oraklaşmaya Y-27632'nin farklı konsantrasyonlarında herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 4.39 ve Şekil 4.40).



Şekil 4. 37. Orak Hücre Anemili hasta eritrositlerinde Na- Metabisulfid ile oraklaşmanın 15. dakikasında Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin oraklaşmaya etkisinin gösterilmesi. Hasta eritrositleri 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M konsantrasyonlarda Y-27632 ve çözücüsü olan serum fizyolojik ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra Na-metabisulfid ile inkübasyonun 15. dakikasında eritrositlerin oraklaşma yüzdeleri hesaplandı. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Tek örneklem t testi kullanıldı, (n=7).

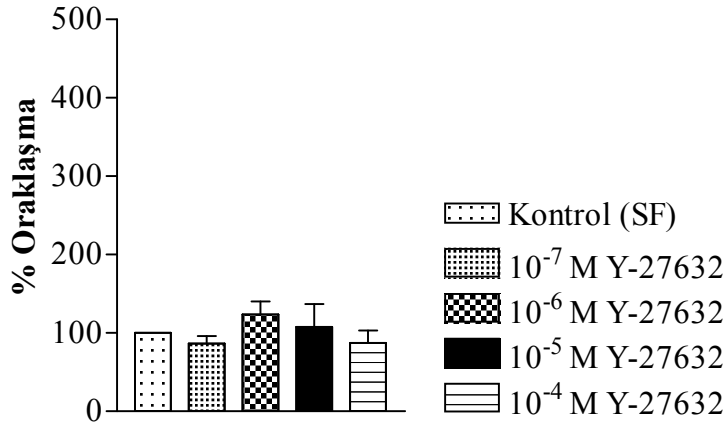


Şekil 4. 38. Orak Hücre Anemili hasta eritrositlerinde Na- Metabisulfid ile oraklaşmanın 30. dakikasında Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin oraklaşmaya etkisinin gösterilmesi. Hasta eritrositleri 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M konsantrasyonlarda Y-27632 ve çözücüsü olan serum fizyolojik ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra Na-metabisulfid ile inkübasyonun 30. dakikasında eritrositlerin oraklaşma yüzdeleri hesaplandı. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Tek örneklem t testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ (vs kontrol), (n=7).



**Na-Metabisulfid
60. dakika**

Şekil 4. 39. Orak Hücre Anemili hasta eritrositlerinde Na- Metabisulfid ile oraklaşmanın 60. dakikasında Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin oraklaşmaya etkisinin gösterilmesi. Hasta eritrositleri 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M konsantrasyonlarda Y-27632 ve çözücüsü olan serum fizyolojik ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra Na-metabisulfid ile inkübasyonun 60. dakikasında eritrositlerin oraklaşma yüzdeleri hesaplandı. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Tek örneklem t testi kullanıldı, (n=7).



**Na-Metabisulfid
90. dakika**

Şekil 4. 40. Orak Hücre Anemili hasta eritrositlerinde Na- Metabisulfid ile oraklaşmanın 90. dakikasında Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin oraklaşmaya etkisinin gösterilmesi. Hasta eritrositleri 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M konsantrasyonlarda Y-27632 ve çözücüsü olan serum fizyolojik ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra Na-metabisulfid ile inkübasyonun 90. dakikasında eritrositlerin oraklaşma yüzdeleri hesaplandı. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Tek örneklem t testi kullanıldı, (n=7).

4. TARTIŞMA

Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizması kas olmayan hücrelerde hücre membranı şekil değişiklikleri, migrasyon, proliferasyon, sekresyon, invazyon, gen ekspresyonu, adezyon ve hücre bölünmesi, aktin hücre iskeletinin kontrolü ve stres liflerinin oluşmasında, hücresel mikrotübül ağına etki ederek veziküler transport olaylarında, inflamasyon ve oksidatif streste, sinyal iletimi ve aynı zamanda da düz kas hücrelerinin kasılmasında Ca^{2+} duyarlılığının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (17, 18, 19, 216, 247, 310).

RhoA proteininin eritrositlerde sitozolik ve membranal fraksiyonlarda bulunduğu, sitozolik fraksiyondaki Rho A'nın guanozin trifosfat (GTP) ile bağlanarak membrana transloke olabildiği gösterilmiştir (38).

Eritroblastik hücre hattı olan TF-1 hücrelerinde forbol esteri ile indüklenen apoptoziste kaspaz aktivasyonu için ROCK-1 enzimi bağımlı miyozin aracılı kasılmaların gerekli olduğu bildirilmiştir (311). Ancak RhoA'nın alt efektörlerinden olan Rho-kinaz'ın eritrositlerde eksprese edilip edilmediği ve Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizmasının eritrosit fonksiyonlarına katkısı tam olarak araştırılmamıştır. Bundan dolayı bu çalışmada Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizmasının insan eritrositlerinde fizyolojik ve patolojik şartlarda (orak hücre anemisinde) fonksiyonel bir önemi olup olmadığını test etmeyi amaçladık.

Çalışmamızda öncelikle insan eritrositlerinde membranal ve sitozolik fraksiyonlarda RhoA protein ekspresyonları ve beraberinde Rho'nun alt efektörü olan Rho-kinaz enziminin ROCK-2 izoformunun varlığını özel bir protein-protein hibridizasyon tekniği olan Western-Blotlama yöntemi ile gösterdik.

Lizofosfatidik asit ve sfingozin 1 fosfat (S1P) gibi membran fosfolipidlerinin heterotrimerik G proteinleri ile kenetli olan ve bu şekilde biyolojik etkilerine aracılık ettiği bilinen spesifik reseptörlerinin varlığı bilinmektedir. Lizofosfatidik asidin üç farklı reseptör alt tipinin olduğu gösterilmiştir. Bunlar LPA_1 , LPA_2 ve LPA_3

reseptörleridir. Lizofosfatidik asit LPA₁ ve LPA₂ reseptörleri aracılığı ile ve sfingozin 1 fosfat ise S1P₂ ve S1P₃ reseptörleri aracılığı ile heterotrimerik G proteinlerinden G_{α12/13}'ü aktive ederek alt efektörü olan Rho'nun aktivasyonuna neden olmaktadır. Lizofosfatidik asit ve sfingozin 1 fosfatın bu şekilde Rho aracılı hücre şekil değişikliklerine ve kontraktileteye neden olduğu bilinmektedir (312, 313, 314).

Kas olmayan hücrelerde Rho/Rho-kinaz yolağını aktive etmek ve dolayısı ile bu yolağın ilgili hücrelerin fonksiyonuna katkısını araştırmak amacıyla lizofosfatidik asit ve sfingozin 1 fosfat'ın pek çok çalışmada kullanıldığını görmekteyiz. Bundan dolayı, her ne kadar insan eritrositlerinde söz konusu membran fosfolipidlerine ait reseptörlerin varlığı ve alt tiplerinin karakteristikleri ile kenetli oldukları sinyal yollarının neler olduğu henüz gösterilmemiş olsa da, bu çalışmada Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizmasının olası aktivatörü olarak lizofosfatidik asit ve sfingozin 1 fosfat'ı kullandık.

Çalışmamızda öncelikle lizofosfatidik asidin farklı konsantrasyonlarının farklı sürelerde eritrositlerin deformabilitesi üzerine etkisini inceledik. Maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar değişime neden olan kayma kuvveti (SS 1/2 kuvvetleri) ve 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeksleri (EI 1.69) değerlendirildiğinde, lizofosfatidik asidin 10⁻⁵ M konsantrasyonda 10. dakikada eritrosit deformabilitesini azalttığını saptadık. Bu etkinin RhoA aktivasyonu ile ilgisini ortaya koymak için lizofosfatidik aside maruz bırakılmış eritrositlerde "G-LISA GTP-RhoA activation assay" yöntemi ile RhoA aktivasyonunu inceledik. İlginç olarak, pek çok hücrede RhoA aktivasyonu oluşturan lizofosfatidik asidin (313) eritrositlerde tam tersine Rho inhibisyonu yaptığını bulduk. Bu ilginç etkinin detaylarının ortaya konulması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Lizofosfatidik asidin eritrosit hücresi içindeki serbest Ca²⁺ düzeylerini yükselttiği bilinmektedir (315).

İntrasellüler serbest Ca²⁺ düzeylerinin artması, eritrosit hücresinde bulunan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini aktive ediyor olabilir (316).

Öte yandan, lizofosfatidik asidin reseptör aracılı endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzim aktivasyonuna yol açtığı ve eNOS agonisti olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (317).

Bir başka çalışmada ise lizofosfatidik asidin trombositlerde L-arginin/NOS/NO yolağını aktive ederek nitrik oksit salınımını indüklediği rapor edilmiştir (318). Nitrik oksidin RhoA aktivasyonunu inhibe ettiği bulgusundan hareketle, bizim çalışmamızdaki LPA aracılı RhoA inhibisyonu kısmen buna bağlı olabilir.

Diğer taraftan, lizofosfatidik asit G_q proteinine kenetlenen LPA_3 reseptörleri aracılığı ile fosfolipaz C'yi aktive ederek diaçilgliserol ve 1,4,5-inositol-3-fosfat oluşumunu arttırmaktadır. Bunun sonucunda protein kinaz C aktive olmakta ve hücre içi kalsiyum düzeyleri artmaktadır (319).

Eritrosit içinde Ca^{2+} konsantrasyonunun çok dar sınırlar içinde sabit tutulması fizyolojik açıdan çok önemlidir; şöyle ki, mikromolar konsantrasyonlarda dahi (5-10 $\mu\text{mol/l}$) hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu artışının eritrositten K^+ sızmasına neden olduğu bildirilmiştir (Gardos etkisi). Hücre içinden K^+ ve beraberinde su kaybı, eritrositin hemoglobin konsantrasyonlarının yükselmesini takiben hücrenin sitoplazmik viskozitesinin artmasına neden olmaktadır. Bu durum, eritrositlerin şekil değiştirme yeteneklerinde yani diğer bir ifade ile deformabilitelerinde belirgin azalmalara yol açmaktadır (320).

Sonuç olarak lizofosfatidik asidin oluşturduğu deformabilite bozukluğuna hücre içi olası Ca^{2+} yükselmesi aracılık edebilir. Ne var ki, bu çalışmada intraeritrositer serbest Ca^{2+} düzeylerini tespit etmedik. Hücre içi Ca^{2+} düzeylerinin yükselmesi bir taraftan eritrosit deformabilitesini bozarken, diğer taraftan buna zıt yönde çalışan nitrik oksit (NO) oluşumunu tetikleyebilir çünkü hücre içi Ca^{2+} artışı eritrosit nitrik oksit sentazını aktive edebilir. Olası bu NO üretimi, RhoA translokasyonunu baskılıyor olabilir. İlginç olarak lizofosfatidik asit, diğer hücrelerden farklı olarak, eritrositlerde Rho inhibisyonuna neden oldu. Bu oldukça şaşırtıcı bir durumu zira bugüne kadar test edilen tüm hücrelerde LPA Rho aktivatörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Eğer bu

gerçekten doğruysa, o zaman LPA ile indüklenen RhoA inhibisyonunun fizyolojik öneminin aydınlatılması gerekmektedir zira lizofosfatidik asit hücre membranında doğal olarak oluşmaktadır. Nitekim fosfatidil serinin sekretuar fosfolipaz A2 enzimi ile lizofosfatidik aside dönüştüğü gösterilmiştir (321).

Ancak lizofosfatidik asit inkübasyonu sonrası deformabilite 10. dakikada anlamlı olarak bozulmaktadır. Buna karşılık RhoA translokasyonunun ölçüldüğü deneylerde sadece 5. dakikada RhoA inhibisyonunun görülmesi, tabloyu daha karmaşık hale getirmektedir. Çünkü bu sefer 10. dakikada RhoA inhibisyonu gerçekleşmemektedir. Bu durumda 10. dakikada görülen deformabilite bozukluğu 5. dakikada görülen RhoA inhibisyonuna sekonder olarak gerçekleşiyor olabilir.

Diğer taraftan RhoA proteininin alt efektörlerinden olan Rho-kinaz enziminin deformabilite üzerine etkisini araştırmak için onun inhibitörleri olan Y-27632 ve fasudil varlığında deneyler yapıldı. Yüksek doza (10^{-4} M) çıkılmasına rağmen, Y-27632 ve fasudil, lizofosfatidik asidin indüklediği deformabilite bozukluğu üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı. İlginç olarak, tek başlarına uygulanan Y-27632 ve fasudilin kendileri de deformabilite bozukluğu meydana getirdiler. Bu durum, lizofosfatidik asidin hem deformabilite bozukluğu oluşturması ve hem de RhoA inhibisyonu yapması bulgusuyla uyumlu gibi görünmektedir. Ancak, Y-27632 ve fasudilin lizofosfatidik asit ile kombine edilmesi, ilave bir deformabilite bozukluğu oluşturmamıştır. Tek bir veride böyle bir kümülatif etki olsa da (10^{-5} M LPA+ 10^{-5} M fasudil) daha yüksek dozda fasudil ve Y-27632 ile benzer bir durum görülmemiştir.

Sonuç olarak Rho/Rho-kinaz yolağı, insan eritrosit deformabilitesi üzerine olumlu bir katkı sağlayabilir ancak bu katkı sınırlı görülmektedir zira Rho-kinaz inhibitörleri, deformabiliteyi bozan lizofosfatidik asit varlığında daha fazla deformabilite bozukluğu oluşturmamıştır. Diğer taraftan, 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indeks (EI 1.69) verileri değerlendirildiğinde de benzer bir durum görmekteyiz. Buna karşılık maksimum elongasyon indeksi (EI max) verileri birbiriyle çelişkili sonuçlar verdiği için bu çalışmanın bulguları SS1/2 ve EI 1.69 değerleri dikkate alınarak yorumlanmıştır.

Bir başka biyoaktif sfingolipid olan sfingozin 1 fosfat'ın, lenfositler dahil bir çok hücre tipinde, sfingozin 1 fosfat reseptörlerine spesifik olarak bağlandığı ve reseptörü aktive ederek bu şekilde hücrede sinyal transdüksiyon oluşturduğu bilinmektedir.

Öte yandan, eritrositlerin sfingozin 1 fosfat'ı dolaşımdan alıp depo edebildikleri ve tekrar dolaşıma salabildikleri bildirilmiştir. Ancak bununla birlikte sfingozin 1 fosfat'ın eritrosit fonksiyonlarına katkısı henüz tam olarak bilinmemektedir (323).

Ayrıca, sfingozin 1 fosfat'ın insan umbilikal ven endotel hücrelerinde miyozin hafif zinciri fosforilasyonunu arttırdığı ve bu fosforilasyonun Rho inhibitörü C₃ ekzoenzim ve Rho-kinaz inhibitörü, Y-27632 ile ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir (324). Bu da söz konusu membran lipidinin Rho/Rho-kinaz yolağını aktive ettiğini göstermektedir. Bu ve diğer bulgular dikkate alındığında biz de lizofosfatidik asit dışında bu yolağı stimüle edeceğini düşündüğümüz sfingozin 1 fosfatı deney serilerinde kullanmaya karar verdik. Sfingozin 1 fosfat, reseptörlerinden olan S1P₂ ve S1P₃ reseptörleri aracılığı ile heterotrimerik G proteinlerinden G_{α12/13}'ü aktive eder. Ancak fizyolojik olarak dolaşımda bulunan bu membran lipidi (313) bizim çalışmamızda eritrosit deformabilitesini etkilemedi. Çünkü endotel hücrelerinde etkili olan sfingozin 1 fosfat konsantrasyonu (324) eritrositlerde SS1/2, EI (1,69 Pa) ve EI maks değerlerini değiştirmedir. Bundan dolayı Rho aktivasyon/inhibisyon deneyleri de gerçekleştirilmemiştir.

Eritrositler dolaşım sisteminde buldukları süre içinde istirahat halindeki morfolojilerini belirgin şekilde etkileyecek mekanik deforme edici kuvvetlerin etkisine maruz kalırlar. Ancak genellikle bu mekanik kuvvetler bazı patofizyolojik şartlarda dahi kalıcı hasara yol açacak düzeylere ulaşmaz. Fakat kardiyopulmoner by-pass, yapay kalp ve kalp kapakçıkları, dolaşım desteği ve hemodiyaliz ekipmanları içerisindeki kan bu şekilde bir mekanik stresin etkisine maruz kalır (325, 326). Sub-hemolitik mekanik travma, eritrositlerde hücresel metabolizmada, membran organizasyonunda, membrandan iyon taşınmasında ve hücrenin reolojik özelliklerinde değişime neden olmaktadır. Öte yandan yapılan diğer bazı çalışmalarda da sub-hemolitik travmayı takiben eritrosit deformabilitesinin azaldığı ve agregasyon yeteneğinin arttığı ve

meydana gelen sub-hemolitik hasarın derecesinin ekstrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonundan etkilendiği bildirilmiştir (326, 168).

Bundan dolayı, çalışmamızın başka serilerinde mekanik stres sonrası bozulan deformabiliteye Rho/Rho-kinaz yolağının olası aracılığını test ettik. 120 Pa şiddetinde 30 saniye sub-hemolitik mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerde deformabilite bozukluğu meydana geldi. İlginç olarak, mekanik stres eritrositlerde RhoA protein aktivasyonunu (Rho-GTP bağlanmasını) anlamlı olarak azaltmıştır. Ancak Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 ve fasudil uygulaması mekanik stresin neden olduğu deformabilite bozukluklarını daha fazla arttırmadı. Buna rağmen, bu bulgular Rho/Rho-kinaz yolağı inhibisyonunun deformabiliteyi bozucu yönde etkilediğine işaret edebilir.

Başkurt ve arkadaşları mekanik strese maruz bırakılan eritrositlerde deformabilite özelliklerinin azaldığını bildirmişlerdir. Her ne kadar 3.00 Pa'dan sonra olsa da, bizim bulgularımız bu sonuçlarla paraleldir. Bu şiddetteki mekanik stresin sub-hemolitik bir deformasyona neden olduğu yapılan diğer çalışmalarla da desteklenmektedir (327, 328).

Mekanik stresin RhoA inhibisyonu yapması ve deformabiliteyi bozması bulgusu ile tek başlarına Rho-kinaz inhibitörleri, fasudil ve Y-27632'nin de deformabilitede bozukluk oluşturması, sanki mekanik stresin Rho/Rho-kinaz kaskadını inhibe ederek deformabilite bozukluğu oluşturduğu izlenimini vermektedir. Buna karşılık, mekanik stres ve Rho-kinaz inhibitörleri kombinasyonu ilave bir bozukluk oluşturmamıştır. Bu durum, deformabilite bozukluğunda belli bir tavan değer olduğunu ve bunu takiben eritrositlerin hemolize uğradığını gösterebilir. Ancak Rho-kinaz inhibitörleri ile inkübasyon sonrası mekanik stresin hemolizi arttırıp arttırmadığı bu çalışmada incelenmemiştir. Her ne kadar tek başına Rho-kinaz inhibitörleri ve yalnızca mekanik stres hemolitik olmasa da, bunların kombinasyonu hemolizi tetiklemiş olabilir. Bu açıdan da ilave çalışmalara gerek vardır. Benzer bir durum lizofosfatidik asit serilerinde de görülmüştür. Şöyle ki, lizofosfatidik asit bir taraftan RhoA inhibisyonu yaparken diğer taraftan da deformabiliteyi bozmuştur. Öte yandan “up-stream” sinyal, Rho proteinine geldikten sonra Rho-kinaz dışında başka “down-stream” efektörlere de aktarılmaktadır. Sinyal kaskadının dallanması belki de Rho-kinaz inhibitörlerinin ilave

deformabilite bozukluğu oluşturmasını engellemektedir. şöyle ki, Rho efektörleri de aynı Rho-kinaz gibi deformabiliteye olumlu katkı sağlıyor olabilir. Yine de, bu yolağın katkısının tam anlamıyla ortaya konması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Mekanik stresin neden olduğu deformabilite bozukluğuna Rho/Rho-kinaz yolağının katkısı dışında diğer mekanizmaların neler olabileceği konusunun aydınlığa kavuşturulması gerekmektedir. Bununla uyumlu olarak artmış hücre içi Ca^{2+} düzeyleri, $Na^+-K^+-ATPazı$ inhibe ederek iyonik dengeyi daha da bozabilir. Bu bağlamda, Ca^{2+} konsantrasyonu minimal düzeyde arttığında bile, membran iskelet proteinlerinden, özellikle spektrin ve band 4.1'de geri dönüşümsüz çapraz köprüler oluşturan sitoplazmik transglutaminaz enzimi aktive olur ve bu çapraz köprüler eritrosit deformabilitesinin daha fazla azalmasına sebep olur (329, 330).

Çalışmamızda mekanik stres deneyleri, Ca^{2+} içermeyen fosfat tamponunda yapıldığı için bu katyonun deformabilite üzerine katkısından söz etmek olası görülmemektedir. Zaten mekanik stres ile yapılan çalışmalar, eritrositlerin 20-100 μM aralığında ekstrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonlarından etkilenmediğini göstermiştir (327).

Diğer taraftan mekanik stresin etkisiyle eritrosit membranında meydana gelen K^+ sızıntısı Ca^{2+} 'dan bağımsız olarak hücre içi volüm azalmasına neden olur ki buna bağlı olarak eritrosit deformabilitesi bozulabilir (327).

Eritrositlerde iNOS ve eNOS enzimleri bulunmaktadır. Bundan dolayı NO sentez edip salıverme yeteneklerine sahip oldukları bildirilmiştir (331).

Nitrik oksidin eritrositlerin deformabilitesini ve agregasyonunu etkileyebileceği ve bu etkinin doz bağımlı olduğu rapor edilmiştir. Ancak bu etkinin bifazik olabileceği bildirilmektedir (7).

Böylelikle fizyolojik düzeyde NO, deformabiliteyi olumlu yönde etkilerken, patolojik düzeyde NO artışı tam tersi bir etki yapabilir. Nitekim septik şokta ve

endotoksemik sıçanlarda nitrik oksit sentaz enzim inhibitörlerinin eritrosit deformabilitesi üzerine koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (332, 333).

Ancak bizim deney şartlarımızda ortamda eNOS'u aktive edecek düzeyde Ca^{2+} bulunmamaktadır. Diğer taraftan iNOS ekspresyonu için yeteri kadar uzun bir süre de yoktur. Bu durumda olası NO oluşumu nereden gelmektedir? Endotel hücrelerde "shear stress", protein kinaz B (Akt) aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktive olan Akt, eNOS enzimini fosforile ederek onu aktive etmektedir. Bu sayede Ca^{2+} 'dan bağımsız eNOS aktivasyonu oluşabilmektedir (334).

Bu durum belki de, mekanik stres altındaki eritrositlerde de görülmektedir. Eğer gerçekten böyle bir durum varsa, NO'nun deformabilite üzerindeki bifazik etkisinin detayları araştırılmalıdır, çünkü NO pek çok hücrede RhoA aktivasyonunu inhibe edebilmektedir. Bizim bulgularımıza göre, mekanik stres altındaki eritrositlerde de RhoA aktivasyonu inhibe olmuştur.

Ayrıca nitrik oksidin eritrositlerde membrandan K^+ dışı akımını inhibe ettiği bilinmektedir. Bunun yanısıra NO'nun eritrosit içi konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak hem kendisi hem de metabolitleri olan nitrit ve peroksinitritin, membrandan K^+ çıkışını arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (327, 335, 336).

Diğer taraftan eritrosit hücre membranında RhoA gibi eksprese olduğu gösterilen bir başka Rho proteini ise Rac proteinleridir. Eritrositlerde normal membran stabilitesi ve hücrel deformabilitenin devamlılığında Rac proteinlerinden hem Rac1 hem de Rac2 izoformu rol oynamaktadır. İlginç olarak Rac ve RhoA proteinleri arasında bir negatif düzenleme mekanizmasının olabileceği bildirilmektedir.

Rac proteini, eritrosit membranında spektrin ile etkileşerek membran iskeletinin organizasyonuna katkıda bulunmaktadır. Aynı zamanda genetik olarak Rac1^{-/-} ve Rac2^{-/-} olan farelerde, eritrosit deformabilite indekslerinin, hücre yüzey alanı kaybına bağlı olarak, azaldığı bildirilmiştir (337).

Bunun yanısıra Rac aktivitesinin RhoA aktivasyonunu baskıladığı bildirilmektedir. Rac ve Rho arasındaki inhibitör “crosstalk” Rac aracılığı ile oluşan reaktif oksijen ürünlerinin 190RhoGAP’ı aktive etmesi ve bunu takiben RhoA-GTP düzeylerinin azalması ile açıklanmaktadır (338, 339).

Öte yandan Rho ve Rac arasındaki inhibitör “cross-talk” aynı zamanda lizofosfatidik asitle indüklenen RhoA inhibisyonunun da nedenini ortaya koyabilir. Bilindiği üzere lizofosfatidik asit farklı reseptör G proteini kombinasyonlarının etkileşimi ile hem RhoA ve hem de Rac proteinlerini aktive ederek farklı hücrel etkilere aracılık etmektedir (339).

Ancak sözkonusu inhibitör etkileşimin tam olarak aydınlatılması için eritrosit membranlarındaki lizofosfatidik asit reseptörlerinin hangi tipte olduklarının ve bu reseptörlerin aktivasyonu sonucu gelişen hücre içi sinyalin detaylarının ortaya konulması gerekmektedir.

Buraya kadar değerlendirdiğimiz veriler, gerek fizyolojik koşullarda gerekse sub-hemolitik mekanik travmada, eritrositlerin deformabilite özelliklerine Rho/Rho-kinaz sinyal ileti yolunun kısmen katkısının olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak fizyolojik şartlarda Rho/Rho-kinaz yolağının insan eritrositlerinin deformabilite yeteneğine katkı yaptığı görünmektedir. Yani eritrosit membran şekil değişikliğine bu yolak aracılık etmektedir çünkü tekrarlamak gerekirse, Rho inhibisyonu oluşturan (Rho-GTP aktivasyon deneylerine dayalı olarak) lizofosfatidik asit ve mekanik stres, aynı zamanda eritrosit deformabilitesini bozmuştur (SS1/2 ve EI 1,69 Pa değerlerine bağlı olarak).

Bu durumda deneylerimizin ikinci kısmında eritrosit membran şekil değişikliği ile karakterize bir hastalık olan orak hücre anemisinde söz konusu bu oraklaşmaya Rho/Rho-kinaz yolağının olası katkısını araştırmayı amaçladık. Bu amaçla orak hücre anemili hastalardan elde ettiğimiz eritrositlerde ilk olarak deformabilite deneyleri yaptık. Bunu takiben Rho-kinaz inhibitörü Y-27632’nin Na-metabisülfid ile indüklenen oraklaşma üzerine etkisini test ettik.

Orak hücre anemisi otozomal resesif geçişli, HbS (orak hücre hemoglobini) içeren, orak eritrositlerle karakterize bir hastalık olup eritrositlerdeki şekil bozukluğu HbS'in küçük agregatlar oluşturarak polimerleşmesi ve sonrasında jel haline gelerek yoğunlaşp eritrosit şeklini bozması ile karakterize bir hastalıktır. Ayrıca oraklaşmış eritrositlerin deformabiliteleri de azalmaktadır. HbS içeren eritrositlerde deoksijenizasyonu takiben hemoglobin polimerizasyonu meydana gelmektedir. Bununla beraber orak hücrelerde katyon geçirgenliği bozulmaktadır. Öte yandan bu hücrelerde Ca^{2+} ile aktive K^+ kanallarının (Gardos kanalı) ve K^+-Cl^- ko-transport sistemlerinin aktivasyonuna bağlı K^+ ve suyun kaybı hücrel dehidratasyona neden olmaktadır. Bu olay da orak hücre deformabilitesinin azlığına neden olan bir diğer nedendir (1, 40).

Diğer taraftan orak hücre anemisi ve talasemiler gibi hemoglobinopatilerde eritrositlerin membrandaki lipidlerin dağılımlarının değiştiği ve membran yapısının bozulduğu da bilinmektedir. Bu şekilde membran dış yaprağında bulunan sfingomiyelin ve fosfatidil kolin iç kısımdaki fosfatidil serin ve fosfatidil etanolamin ile yer değiştirir. Bunun sonucunda bir yandan söz konusu membran fosfolipidleri protrombinin trombine dönüşümünü indükleyerek pıhtılaşmayı artırır öbür yandan da eritrositlerin endotele adezyonu artmaktadır (1, 340).

Ayrıca daha önce yapılan bir çalışmada orak hücrelerin endotel hücrelere adezyonunda Rap 1 proteininin (küçük GTPaz reseptörü ile ilişkili protein-1) rol oynadığı gösterilmiştir. Buna ilaveten Rap-GTP proteininin ARAP3 (Arf ve Rho için ikili GTPaz aktive edici protein) aracılığı ile Rho-GTP proteinlerinin inaktive olarak Rho-GDP'ye dönüşümünü arttırdığı da bildirilmiştir (341, 342, 343).

Sonuç olarak Rap-1 proteininin Rho proteinlerin aktivasyonunu engelleyebileceği görülmektedir. Dolayısı ile bu bilgiler ışığında, Rho'nun ve bunu takiben Rho/Rho-kinaz yolağının inhibisyonunun orak hücre adezyonunda rol oynayabileceği düşünülebilir. Ancak orak hücreli eritrositlerde Rho/Rho-kinaz yolağının gerek oraklaşma sürecine gerekse orak hücrelerin endotele adezyonuna olan olası katkısı henüz araştırılmamıştır. Bu nedenle, biz deformabilite deneylerinde Rho-kinaz yolağının inhibitörü olan Y-27632'nin orak hücrelerde etkisini test etmeyi amaçladık.

Öncelikle, sağlıklı donörler ile orak hücre anemili hastalardan alınan eritrosit örneklerinde deformabilite özelliklerini karşılaştırdığımızda, 1.69 Pa kayma kuvvetindeki elongasyon indekslerinde (EI 1.69 Pa) ve maksimum elongasyon indeksi (EI max) değerlerinde istatistiksel olarak azalmalar tespit ettik. Bu bulgu orak hücre anemili hastalarda eritrositlerde deformabilitelerin azaldığını bildiren diğer çalışmalarla uyumludur (344). Öte yandan Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632, geniş bir konsantrasyon (10^{-7} - 10^{-4} M) aralığında orak hücreli eritrositlerin deformabilite değerlerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadı. Bu durum, oraklaşma ile indüklenen deformabilite bozukluğunun belirli bir tavan değerinin olabileceğini ve Y-27632 ile söz konusu konsantrasyon aralığında bu değer üzerinde bir deformabilite bozukluğunun oluşmadığını gösterebilir.

Bir diğer deney serisinde oraklaşma testi yaparak orak hücrelerde Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin hasta eritrositlerinin oraklaşma yüzdelerini etkileyip etkilemediği test ettik. 10^{-7} M konsantrasyonda Y-27632, 30. dakikada eritrositlerin oraklaşma yüzdesini kontrole göre arttırdı. Ancak daha yüksek dozlarda ve farklı sürelerde (15, 60, 90. dakikalarda) sodyum metabisülfid ile indüklenen oraklaşma (345) yüzdelerinde bir değişiklik oluşturmadı. Fakat oraklaşma testi için mikroskopik fotoğrafı yöntemi ile her örnek için randomize üç adet farklı alan fotoğraflanarak direkt gözle hücre sayımı yapıldı ve oraklaşan hücrelerin sağlıklı hücrelere oranı hesaplandı. Ancak hesaplanan yüzdeler tamamen her örnek için çekilen üçer alanla sınırlı olduğundan elde edilen verilerin hazırlanan preperattaki tüm hücrelerin doğru oranlarını tam olarak yansıtmayabileceği ihtimali bulunmaktadır. Bu nedenle olası bir deneysel hatayı ortadan kaldırmak için daha kantitatif bir deney prosedürü oluşturulmalıdır.

Son olarak, gerek deformabilite deneylerinde gerek de oraklaşma testi ile yapılan deney serilerinde Rho/Rho-kinaz yolağının orak hücre deformabilitelerine ve de oraklaşma oranlarına etkisi net olarak gösterilememiştir. Diğer taraftan RhoA aktivasyonu yapan ajanların deformabilite ve oraklaşma oranlarına etkisi incelenememiştir. Çünkü eritrositlerde RhoA aktivasyonu yapan bilinen bir ajan şu an için mevcut değildir. Diğer hücrelerde RhoA aktivasyonu yaptığı bildirilen

lizofosfatidik asit (319, 346) bizim örneklerimizdeki eritrositlerde, beklenilen aksine, RhoA inhibisyonu yapmıştır. Bu nedenle orak hücreli eritrositlerde bu yolağın fonksiyonlarının tam olarak ortaya konabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma 2 ana seri halinde yapılmıştır. Bunlar, fizyolojik olarak eritrosit hücre membran şekil değişikliğinin bir sonucu olarak gelişen deforme olabilme yetenekleri üzerine Rho/Rho-kinaz yolağının etkisinin test edildiği 1. seri deneyler ve orak hücre anemisi gibi patolojik olaylarda bu yolağın olası katkısının araştırıldığı 2. seri deneylerdir. Bu tezin çıktıları şu şekilde özetlenebilir:

İnsan eritrositleri RhoA ve Rho-kinaz (ROCK-2 izoformu) proteinlerini eksprese edebilmektedir. RhoA protein ekspresyonları daha önceki bir çalışmada (38) gösterilmiş olmasına rağmen, Rho-kinaz enziminin ekspresyonu ilk kez bizim tarafımızdan gösterilmiştir.

Bu proteinlerin olası fonksiyonel katkılarının araştırıldığı deneyler, eritrositlerin deformabilitelerine Rho/Rho-kinaz yolağının hiç olmazsa kısmen katkı yaptığını göstermektedir. Şöyle ki, eritrosit deformabilitesini bozan uyarılar (lizofosfatidik asit ve mekanik stres) ilginç olarak aynı zamanda RhoA inhibisyonu oluşturmuşlardır. Esasında biz RhoA aktivasyonu dolayısıyla Rho/Rho-kinaz yolağını stimüle etmek amacıyla literatürde başka hücrelerde bu yolağı aktive ettiği bilinen lizofosfatidik asit ve sfingozin 1 fosfatı kullandık. Bu sayede RhoA aktivasyonu yapıp aynı zamanda eritrositlerin deformabilitelerinin de ne şekilde değişeceğini incelemeyi amaçlamıştık. Ancak, deneyimizin bulguları deformabilite bozulurken RhoA inhibisyonunun da birlikte geliştiğini göstermektedir. Üstelik Rho-kinaz inhibitörleri, Y-27632 ve fasudil tek başlarına deformabiliteyi bozmuşlardır. Dolayısı ile indirek bulgular bize Rho/Rho-kinaz yolağının aktive edilmesinin eritrositlerin deformabilite yeteneklerini arttırabileceğini düşündürmektedir. Buna rağmen, eritrositlerde RhoA aktivasyonu yapan bir ajan varlığında deformabilite deneylerinin tekrarlanmasında yarar vardır.

Son olarak Rho-kinaz inhibitörleri orak hücre anemili hastalardan elde edilen eritrositlerin deformabilitelerinde ilave bir bozukluk oluşturmamıştır. Bu durum belki de sub-hemolitik düzeyde eritrosit deformabilitesinin orak hücrelerde maksimum derecede

bozulduğunu ve bundan dolayı Rho-kinaz inhibisyonunun ilave bir deformabilite bozukluğu yapmadığını gösterebilir. Bu serideki bir eksikliğimiz Rho-kinaz inhibitörleri ile inkübasyonda deformabilite testleri sonrasında eritrositlerin lizise uğrama yatkınlıkları ve oranlarının tespit edilmemesidir.

Sonuç olarak, bulgularımız, indirekt olmakla beraber, Rho/Rho-kinaz yolağının inhibisyonunun insan eritrositlerinde deformabiliteyi bozabileceğine işaret etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Telen MJ, Kaufman R.E.** The Mature Erythrocyte. S: 217-247. Wintrobe's Clinically Hematology. 11.th edition. Edited by Grier J.P. **2004**.
2. **Mohandas N, Gallagher PG.** Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, **2008**; 112(10):3939-48.
3. **Pérez S, Milani A, Acosta L, Rasia RJ.** New evidence of red blood cell rheological disorders in beta-thalassaemia minor. *Clin Hemorheol Microcirc*, **2004**; 31(2):89-96.
4. **Ballas SK, Mohandas N.** Sickle red cell microrheology and sickle blood rheology. *Microcirculation*, **2004**; 11:209-25.
5. **Shin S, Ku Y, Babu N, Singh M.** Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. *Indian J Exp Biol*, **2007**; 45(1):121-8.
6. **Hacioglu G, Yalcin O, Bor-küçükay M, Ozkaya G, Baskurt O.K.** Red cell rheological properties in various rat hypertension models. *Clin Hemorheol Microcir*, **2001**; 24: 25–31.
7. **Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK.** Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2003**; 284:H1577-H1584.
8. **Husain-Chishti A; Faquin W; Wu C C; Branton D.** Purification of erythrocyte dematin (protein 4.9) reveals an endogenous protein kinase that modulates actin-bundling activity. *The Journal of biological chemistry* **1989**; 264(15):8985-91.
9. **Lijnen P, Petrov V.** Cholesterol modulation of transmembrane cation transport systems in human erythrocytes. *Biochem. Mol. Med*, **1995**; 56: 52– 62.
10. **Mohandas N, Shohet SB.** The role membrane associated enzymes in regulation of erythrocyte shape and deformability. *Clin. Hematol*, **1981**; 10: 223–237.
11. **John C, Foreman D, Torben Johansen.** Text book of Receptor Pharmacology.
12. **Hall A.**The cellular fuctions of small GTP binding proteins. *Science*, 1990; 249:635-640.
13. **Bourne HR, Sanders DA, and McCormick F.** The GTP'ase superfamily: a coserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **1990**; 348:125-132.
14. **Takai Y, Kaibuchi K, Kikuchi A, and Kawata M.** Small GTP- binding proteins. *Int Rev Cytol*, **1992**; 133:187-230.

15. **Sorokina EM, Chernoff J.** Rho-GTPases: New members, new pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*, **2005**; 94 (2): 225-231.
16. **Boettner B, Van Aelst L.** The role of Rho GTPases in disease development. *Gene*, 2002; 286, 155-174.
17. **Fukata Y, Amano M Kaubuchi K.** Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*, **2001**; 22(1):32-39.
18. **Takai Y, Sasaki T, Matzaki T.** Small GTP-Binding Proteins. *Physiol Rev*, **2001**; 81:1, 153-208.
19. **Liao JK, Seto M, Noma K.** Rho Kinase (ROCK) Inhibitors. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, **2007**; 50:17-24.
20. **Büyükaşar K, Levent A, Ark M.** Expression of Rho-kinase and its Functional role in the Contractile Activity of the Mouse Vas Deferens. *Br J Pharmacol*, **2003**; 140:743-749.
21. **Büyükaşar K, Levent A.** Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and acetylcholine release in the mouse gastric fundus. *Biochem Biophys Res Commun*, **2003**; 303:777-781.
22. **Levent A, Büyükaşar K.** Expression of Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) and its substantial role in the contractile activity of the sheep ureter. *Br J Pharmacol*, **2004**; 143:431-437.
23. **Şahan-Fırat S, Tiftik RN, Nacak M, Büyükaşar K.** Rho-kinase expression and its central role in ovine gallbladder contractions elicited by a variety of excitatory stimuli. *Eur J Pharmacol*, 2005; 528:169-175.
24. **Büyükaşar K, Akça T, Tiftik RN, Şahan-Fırat S, Aydın S.** Contribution of Rho-kinase in human gallbladder contractions. *Eur J Pharmacol*, **2006**; 540:162-167.
25. **Büyükaşar K, Yalçın İ, Kurt AH.** Rho-kinase inhibitor, Y-27632, has an antinociceptive effect in mice. *Eur J Pharmacol*, **2006**; 541:49-52.
26. **Inan S, Büyükaşar K.** Antiepileptic effects of two Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, in mice. *Br J Pharmacol*. **2008**; 155(1):44-51.

27. **Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S.** Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, **1997**; 389: 990-994.
28. **Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, Kunihiro I, Kawano Y, Fukata Y, Higo T, Egashira K, Takahashi S, Kaibuchi K, Takeshita A.** Inhibition of myosin phosphatase by upregulated Rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1beta. *Circulation*, **2000**; 101:1319-1323.
29. **Takamura M, Sakamoto M, Genda T, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S.** Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology*, 2001; 33:557-581.
30. **Bao W, Hu E, Tao L, Boyce R, Mirabile R, Thudium DT, Ma XL, Willette RN, Yue TL.** Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, **2004**; 61:548-558.
31. **Takeda K, Jin MB, Fujita M, Fukai M, Sakurai T, Nakayama M, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, Furukawa H, Todo S.** A novel inhibitor of Rho-associated protein kinase, Y-27632, ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *Surgery*, **2003**; 133:197-206.
32. **Köksel O, Yildirim C, Tiftik RN, Kubat H, Tamer L, Cinel L, Kaplan MB, Değirmenci U, Ozdülger A, Büyükaşar K.** Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) upregulation in oleic acid-induced lung injury and its restoration by Y-27632. *Eur J Pharmacol*, **2005**; 510:135-142.
33. **Büyükaşar K, Arikan O, Ark M, Seçilmiş A, Un I, Singirik E.** Rho-kinase expression and its contribution to the control of perfusion pressure in the isolated rat mesenteric vascular bed. *Eur J Pharmacol*, **2004**; 6; 485(1-3):263-8.
34. **Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G, Offermans S.** Activation of G_{12/13} results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol*, 1999; 144: 745-754.
35. **Kawaguchi A, Ohmori M, Harada K, Tsuruoka S, Sugimoto K, Fujimura A.** The effect of a Rho-kinase inhibitor Y-27632 on superoxide production, aggregation and adhesion, in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Pharmacol*, 2000; 403: 203-208.

36. **Lou Z, Billadeau DD, Savoy DN, Schoon RA, Leibson PJ.** A role for a RhoA/ROCK/LIM kinase Pathway in the regulation of cytotoxic lymphocytes. *J. Immunol*, **2001**; 167: 5749-5757.
37. **Sullivan R, Prince LS, Koffer A.** Rho controls cortical F-actin disassembly in addition to, but independently of, secretion in mast cells. *J. Biol. Chem*, **1999**; 274: 38140-38146.
38. **Boukharov AA, Cohen CM.** Guanine nucleotide-dependent translocation of RhoA from cytosol to high affinity membrane binding sites in human erythrocytes. *Biochem. J*, **1998**; 330: 1391-1398.
39. **Kern W. F.** PDQ Hematology.2005.BC Decker Inc. Hamilton London 1. Edition
40. **İç Hastalıkları Semiyoloji Editör: Senay Molvalılar**
41. **www.octc.kctcs.edu/.../anat2/notes/Image333**
Copyright 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longma, Inc.
42. **www.academic.marist.edu/.../description7.jpg**
43. **Daleke DL.** Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol*, **2008**; 15:191-195.
44. **Sims PJ, Wiedmer T.** Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost*, **2001**; 86:266-275.
45. **Salzer U, Prohaska R.** Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood*, **2001**; 97:1141-1143.
46. **Murphy SC, Samuel BU, Harrison T, Speicher KD, Speicher DW, Reid ME, Prohaska R, Low PS, Tanner MJ, Mohandas N, Haldar K.** Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood*, **2004**; 103:1920-1928.
47. **Wood BL, Gibson DF, Tait JF.** Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood*, **1996**; 88:1873-1880.
48. **Yasin Z, Witting S, Palascak MB, Joiner CH, Rucknagel DL, Franco RS.** Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell age, density, and hemoglobin F. *Blood*, **2003**; 102:365-370.
49. **Kuypers FA, Yuan J, Lewis RA, Snyder LM, Kiefer CR, Bunyaratvej A, Fucharoen S, Ma L, Styles L, de Jong K, Schrier SL.** Membrane phospholipid asymmetry in human thalassemia. *Blood*, **1998**;91:3044-3051.
50. **Setty BN, Kulkarni S, Stuart MJ.** Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. *Blood*, **2002**; 99:1564-1571.

51. **Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N.** Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**; 99:1943-1948.
52. **An X, Debnath G, Guo X, Liu S, Lux SE, Baines A, Gratzner W, Mohandas N.** Identification and functional characterization of protein 4.1R and actin-binding sites in erythrocyte beta spectrin: regulation of the interactions by phosphatidylinositol- 4, 5-bisphosphate. *Biochemistry*, **2005**; 44: 10681-10688.
53. **An X, Zhang X, Debnath G, Baines AJ, Mohandas N.** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) differentially regulates the interaction of human erythrocyte protein 4.1 (4.1R) with membrane proteins. *Biochemistry*. **2006**; 45: 5725-5732.
54. **Harrison T, Samuel BU, Akompong T, Hamm H, Mohandas N, Lomasney JW, Haldar K.** Erythrocyte G protein-coupled receptor signaling in malarial infection. *Science*, **2003**; 301:1734-1736.
55. **Üyüküklü MM.** Atorvastatin Tedaviyle Plazma Kolesterol Konsantrasyonunun Düşürülmesinin Eritrosit Mekaniğine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Antalya, **2006**.
56. **Chien S, Sung L.P.** Molecular basis of red cell membrane rheology. *Biorheology*, **1990**; 27: 327–344.
57. **Mohandas N, Evans E.** Mechanical properties of red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*, **1994**; 23: 787–818.
58. **Mohandas N.** Molecular basis for red cell membrane viscoelastic properties. *Biochem. Soc. Trans*, **1992**; 20: 776-782.
59. **Bennett V.** The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim Biophys Acta*, **1989**; 988:107-121.
60. **Bennett V, Baines AJ.** Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev*, **2001**; 81:1353-1392.
61. **Mohandas N, An X.** New insights into function of red cell membrane proteins and their interaction with spectrin-based membrane skeleton. *Transfus Clin Biol*. **2006**; 13:29-30.
62. **Speicher DW, Marchesi VT.** Erythrocyte spectrin is comprised of many homologous triple helical segments. *Nature*, **1984**; 311:177-180.
63. **Djinovic-Carugo K, Gautel M, Ylanne J, Young P.** The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies. *FEBS Lett*, **2002**; 513:119-123.
64. **Sheetz M.P.** Membrane skeletal dynamics: Role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape. *Semin Hematol*, **1983**; 20: 175-188.

65. **Baskurt O.K., Yavuzer S.** Some hematological effects of oxidants. In: **Environmental Oxidants Nriagu J.O., Simmons M., (Eds.): Advances in environmental science and technology.** New York-Chichester-Brisbane-Toronto- Singapore: **John Willey & Sons, Inc. 12: 405-423, 1994.**
66. **Mohandas N, Chasis J.A.** Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol*, **1993**; 30: 171-192.
67. **An X, Lecomte MC, Chasis JA, Mohandas N, Gratzer W.** Shear-response of the spectrin dimertetramer equilibrium in the red blood cell membrane. *J Biol Chem.* **2002**; 277:31796-31800.
68. **Ohanian V, Wolfe LC, John KM, Pinder JC, Lux SE, Gratzer WB.** Analysis of the ternary interaction of the red cell membrane skeletal proteins spectrin, actin, and 4.1. *Biochemistry*, **1984**; 23: 4416-4420.
69. **Azim AC, Marfatia SM, Korsgren C, Dotimas E, Cohen CM, Chishti AH.** Human Erythrocyte Dematin and Protein 4.2 (Pallidin) Are ATP Binding Proteins. *Biochemistry*, **1996**; 35 (9), 3001–3006.
70. **Kuhlman PA, Hughes CA, Bennett V, Fowler VM.** A new function for adducin. Calcium/calmodulin regulated capping of the barbed ends of actin filaments. *J Biol Chem*, 1996; 271:7986-7991.
71. **Fischer RS, Fowler VM.** Tropomodulins: life at the slow end. *Trends Cell Biol*, **2003**; 13:593-601.
72. **Siegel DL, Branton D.** Partial purification and characterization of an actin-bundling protein, band 4.9, from human erythrocytes. *J Cell Biol.* **1985**; 100:775-785.
73. **Pasternack GR, Racusen RH.** Erythrocyte protein 4.1 binds and regulates myosin. (Membranes/cytoskeleton). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1989**; 86, 9712-9716.
74. **Fowler VM, Davis JQ, Bennett V.** Human Erythrocyte Myosin: Identification and Purification. *The Journal of Cell Biology*, **1985**; 100, 47-55.
75. **Bennett V.** Proteins involved in membrane–cytoskeleton association in human erythrocytes: spectrin, ankyrin, and band 3. *Methods Enzymol.* **1983**; 96:313-324.
76. **Nicolas V, Le Van Kim C, Gane P, Birkenmeier C, Cartron JP, Colin Y, Mouro-Chanteloup I.** Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation. *J Biol Chem*, **2003**; 278:25526-25533.
77. **Nicolas V, Le Van Kim C, Gane P, Birkenmeier C, Cartron JP, Colin Y, Mouro-Chanteloup I.** Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation. *J Biol Chem*, **2003**; 278:25526-25533.
78. **Marfatia SM, Lue RA, Branton D, Chishti AH.** In vitro binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1, and glycophorin C. *J Biol Chem.* **1994**; 269:8631-8634.

79. **Salomao M, Zhang X, Yang Y, Lee S, Hartwig JH, Chasis JA, Mohandas N, An X.** Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008**; 105:8026-8031.
80. **Khan AA, Hanada T, Mohseni M, Jeong JJ, Zeng L, Gaetani M, Li D, Reed BC, Speicher DW, Chishti AH.** Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1. *J Biol Chem,* **2008**; 283:14600- 14609.
81. **Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, Peters LL, Chasis JA, Delaunay J, Mohandas N, Anstee DJ, Tanner MJ.** A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood,* **2003**; 101: 4180-4188.
82. **Dealunay J.** The enzymes of red blood cell plasma membrane. *Biomedicine,* **1977**; 26: 357- 361.
83. **Mallozzi C, Di Stasi AM, Minetti M.** Free radicals induce reversible membran-cytoplasm translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* **1995**; 321: 345.
84. **Plut D.** Evidence for participation of cytosolic protein kinase in membrane protein phosphorylation in intact erythrocytes. *Eur J Biochem* **1978**; 82:333.
85. **Hoffman J.F.** The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. *Am. J. Med,* **1966**; 41: 666–680.
86. **Wiley JS, Cooper RA.** Inhibition of cation cotransport by cholesterol enrichment of human red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta,* **1975**; 413: 425-431.
87. **Cooper RA, Leslie MH, Kright D, Detweiler DK.** Red cell enrichment and spur cell anemia in dogs fed cholesterol enriched atherogenic diet. *J. Lipid Res,* **1980**; 21: 1082-9.
88. **Cooper RA.** Abnormalities of cell membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N. Engl. J. Med,* **1977**; 297. 371–377.
89. **Gordon LM and Mobley PW. Membrane lipids, membrane fluidity and enzyme activity. In: Membrane fluidity in biology,** L.M. Gordon, Ed. Academic Press, New York, pp. 1-49, **1985.**
90. **Quinn PJ.** The fluidity of cell membranes and its regulation, *Prog. Biophys. Mol. Biol,* **1981**; 38: 1-104.
91. **Noji S, Taniguchi S, Kon H.** An EPR study on erythrocyte deformability. *Prog. Biophys. Molec. Biol,* **1991**; 55: 85–105.
92. **Reid ME, Takakuwa Y, Conboy J, Tchernia G, Mohandas N.** Glycophorin C content of human erythrocyte membrane is regulated by protein 4.1. *Blood,* **1990**; 75:2229-2234.

93. **An X, Guo X, Sum H, Morrow J, Gratzner W, Mohandas N.** Phosphatidylserine binding sites in erythroid spectrin: location and implications for membrane stability. *Biochemistry*. **2004**; 43:310-315.
94. **Lew VL, Bookchin RM.** Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration. *Physiol Rev*, **2005**; 85:179-200.
95. **An X, Guo X, Zhang X, Baines AJ, Debnath G, Moyo D, Salomao M, Bhasin N, Johnson C, Discher D, Gratzner WB, Mohandas N.** Conformational stabilities of the structural repeats of erythroid spectrin and their functional implications. *J Biol Chem*, **2006**; 281:10527-10532.
96. **Johnson CP, Tang HY, Carag C, Speicher DW, Discher DE.** Forced unfolding of proteins within cells. *Science*, **2007**; 317:663-666.
97. **Bookchin RM, Etzion Z, Sorette M, Mohandas N, Skepper JN, Lew VL.** Identification and characterization of a newly recognized population of high-Na⁺, low-K⁺, low-density sickle and normal red cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2000**; 97:8045-8050.
98. **Nadezhda N. Barvitenko, Norma C. Adragna and Roy E. Weber.** Erythrocyte Signal Transduction Pathways, their Oxygenation Dependence and Functional Significance. *Cell Physiol Biochem*, **2005**; 15:1-18.
99. **Kayar E, Mat F, Mieselman HJ, Baskurt OK.** Red blood cell rheological alterations in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Biorheology*, **2001**; 38: 405–414.
100. **Martinez M, Vaya A, Marti R, Gil L, Lluch I, Carmena R. and Aznar J.** Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and hemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. *Thrombosis Research*, **1996**; 83:375–88.
101. **Mokken FC, Kedaria M, Henny CP, Hardeman MR, Gelb AW** The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorheological parameter. *Ann. Hematology*, **1992**; 64: 113-122.
102. **Dormandy J, Boyd M, Ernest F.** Red cell filterability and myocardial infarction. *Scand. J. Clin. Med*, **1981**; 156: 195-198.
103. **Saldanha C, Sargento L, Moterio J, Perdigao C, Riberio C, Martins-Silva J.** Impairment of the erythrocyte membrane fluidity in survivors of acute myocardial infarction. A prospective study. *Clin. Hemorheol. Microcirc*, **1999**; 20: 111–116.
104. **Hardeman MR, Goedhart PT, Breederveld D.** Laserdiffraction Ellipsometry of erythrocytes under shear stress using a rotational viscosimeter. *Clin. Chim. Acta*, **1987**; 165:227-234.
105. **Wijermans PW, Hardeman MR.** Some characteristics of the erythrocytes in hereditary spherocytosis *Clin. Hemorheol*. **1987**; 7:3.

106. **Mokken FC, Henny CP, Gelb AW, Biervliet JD, Hardeman MR, Kedaria M, van Wezel HB.** The effects of propofol compared to high-dose fentanyl anesthesia on rheologic parameters in coronary artery surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, **1993**; 7:10-16.
107. **Hardeman MR, Goedhart PT.** Interrelationship of changes in hemorheological parameters induced by low osmolar radiocontrast media. *Clin. Hemorheol*, **1992**; 12: 381-392.
108. **Schut NH, Bilo HJ, Popp-Snijders C, Goedhart PT, Wilmink JM.** Erythrocyte deformability, endothelin levels, and renal function in cyclosporin-treated renal transplant recipients: effects of intervention with fish oil and corn oil. *Scand J Clin Lab Invest*. **1993**; 53(5):499-506.
109. **Yenerel M.N.** Kalıtsal Eritrosit Membran Anomalileri. *T Klin J Hematol*, **2004**; 2:125-130.
110. **Eber SW, Armbrust R, Schroter W.** Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility, and autohemolysis. *J Pediatr*, **1990**; 117(3):409-16.
111. **Mayman D, Zipursky A.** Hereditary spherocytosis: the metabolism of erythrocytes in the peripheral blood and in the splenic pulp. *Br J Haematol*, **1974**; 27(2):201-17.
112. **Tomaselli MB, John KM, Lux SE.** Elliptical erythrocyte membrane skeletons and heat-sensitive spectrin in hereditary elliptocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1981**; 78(3):1911-5.
113. **Liu SC, Derick LH.** Molecular anatomy of the red blood cell membrane skeleton: structure-function relationships. *Semin Hematol*, **1992**; 29(4):231-43.
114. **Palek J.** Hereditary elliptocytosis, spherocytosis and related disorders: consequences of a deficiency or a mutation of membrane skeletal proteins. *Blood Rev*, **1987**; 1(3):147-68.
115. **Lane PA, Shew RL, Iarocci TA, Mohandas N, Hays T, Mentzer WC.** Unique alpha-spectrin mutant in kindred with common hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest*. **1987**; 79:989-996.
116. **Coetzer T, Lawler J, Prechal JT, Palek J.** Molecular determinants of clinical expression of hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis. *Blood*, **1987**; 70(3):766-72.
117. **İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik bilimler ders kitapları Nobel tıp kitapları 2003**
118. **Dobbe JGG, Hardeman MR, Streckstra GJ, Strackee J, Ince C and Grimbergen CA.** Analyzing red blood cell-deformability distributions. *Blood Cells, Molec and Dis*, **2002**; 28:373-84.
119. **Stuart J, Nash GB.** Red cell deformability and haematological disorders. *Blood Review*, **1990**; 4:141-7.

120. **Hardeman MR, Ince C.** Clinical potential of *in vitro* measured red cell deformability, a myth? *Clin Hemorheol Microcirc*, **1999**; 21:277-84.
121. **Minetti G and Low PS.** Erythrocyte signal transduction pathways and their possible functions. *Current Opinion in Hematology*. **1997**; 4:116-121.
122. **Kelleher RS, Murray EF, Peterson SW.** Insulin causes insulin-receptor internalization in human erythrocyte ghosts. *Biochem J*. **1987**; 241: 93-97.
123. **Paolisso G, Sgambato S, Passariello N, Guigliano D, Scheen A, D'Onofrio F, Lefèbvre PJ.** Insulin induces opposite changes in plasma and erythrocyte magnesium concentrations in normal man. *Diabetologia*, **1986**; 29: 644-647.
124. **Juhan I, Vague P, Buonocore M, Moulin JP, Jouve R, Vialettes V.** Abnormalities of erythrocyte deformability and platelet aggregation in insulin-dependent diabetics corrected by insulin *in vivo* and *in vitro*. *Lancet*, **1982**; i: 535-537.
125. **Polychronakos C, Guyda HJ, Posner BI.** Receptors for the insulin-like growth factors on human erythrocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, **1983**; 57: 436-438.
126. **Sager G, Jacobsen S.** Effect of plasma on human erythrocyte beta-adrenergic receptors. *Biochem Pharmacol*, **1985**; 34:3767-3771.
127. **Huestis WH, Mc Connell HM.** A functional acetylcholine receptor in the erythrocyte receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **1974**; 57:726-732.
128. **Rasmussen H, Lake W, Allen JE.** The effect of catecholamines and prostaglandins upon human and rat erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1975**; 411:63-73.
129. **Nakagawa M, Willner J, Cerri C, Reydel P.** The effect of membrane preparation and cellular maturation on human erythrocyte adenylate cyclase. *Biochim Biophys Acta*, **1984**; 770: 122-126.
130. **Tang LC, Schoemaker E, Wiesmann WP.** Cholinergic agonists stimulate calcium uptake and cAMP formation in human erythrocytes. *Biochem Biophys Acta*, **1984**; 772: 235-238.
131. **Allen JE, Rasmussen H.** Human red blood cells: prostaglandin E₂, epinephrine and isoproterenol alter deformability. *Science*, **1971**; 174:512-514.
132. **Langer R, Rossmann K, Henrich HA.** Hemorheological actions of prostaglandins D₂, E₂, F₁ alfa, F₂ alfa and iloprost®. *Clin Hemorheol*, **1995**; 15:829-839.
133. **Li Q, Jungmann V, Kiyatkin A, Low PS.** Prostaglandin E₂ stimulates a Ca²⁺ dependent K⁺ channel in human erythrocytes and alters cell volume and filterability. *J Biol Chem*, **1996**; 271.18651-18656.

134. **Dutta-Roy AK, Sinha AK.** Binding of Prostaglandin E₁ to human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta*, **1985**; 812:671-678.
135. **Haris RH, Ramwell PW, GilmerPJ.** Cellular mechanisms of prostaglandin action. *Annu Rev*, **1979**; 41:653-778.
136. **McLawhon RW, Marikowsky Y, Thomas NJ, Weinstein RS.** Ethanol induced alterations in human erythrocyte shape and surface properties: modulatory role of prostaglandin E₁. *J Membr Biol*, **1987**; 99: 73-78.
137. **Angel RC, Botta JA, Farias RN.** High affinity L-triiodotironin binding to right-side-out- and inside-out vesicles from rat and human erythrocyte membranes. *J Biol Chem*, **1989**; 264:19143-19146.
138. **Bogin E, Earon Y, Blum M.** Effect of parathyroid hormone and uremia on erythrocyte deformability. *Clin Chim Acta*, 1986; 161:293-299.
139. **Cohen CM, Gascard P.** Regulation and post-translational modification of erythrocyte membrane and membrane-skeletal proteins. *Semin Hematol*, **1992**; 29; 244-292.
140. **Jarnett HW, Penniston JT.** Purification of the Ca²⁺-stimulated ATP-ase activator from human erythrocytes. Its membership in the class of Ca²⁺ binding modulator proteins. *J Biol Chem*, **1978**; 253:4676-4682.
141. **Nelson GA, Andrews ML, Karnowsky MJ.** Control of erythrocyte shape by calmodulin. *J Cell Biol*, **1983**; 96: 730-735.
142. **Anderson JP, Morrow JS.** The interaction of calmodulin with human erythrocyte spectrin. *J Biol Chem*, **1987**; 262: 6365-6372.
143. **Downes CP, Michell RH.** The polyphosphoinositide phosphodiesterase of erythrocyte membranes. *Biochem J*, **1981**; 198(1):133-40.
144. **Ferrell JE Jr, Huestis WH.** Phosphoinositide metabolism and the morphology of human erythrocytes. *J Cell Biol*, **1984**; 98(6):1992-1998.
145. **Ellsworth ML, Forrester T, Ellis CG, Dietrich HH.** The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **1995**; 269:H2155- H2161.
146. **Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Lonigro AJ.** ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **1996**; 271:H2717- H2722.

146. **Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA.** Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* **1997**; 276:2034-2037.
147. **Bonaventura C, Taboy CH, Low PS, Stevens RD, Lafon C, Crumbliss AL.** Heme redox properties of S-nitrosated hemoglobin A(0) and hemoglobin S - Implications for interactions of nitric oxide with normal and sickle red blood cells. *J Biol Chem*, **2002**; 277:14557- 14563.
148. **Petrov V, Lijnen P.** Regulation of human erythrocyte Na⁺/H⁺ exchange by soluble and particulate guanylate cyclase. *Am J Physiol*, **1996**; 271:C1556-C1564.
149. **Adragna NC, White RE, Orlov SN, Lauf PK.** K-Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: possible implication in vasodilation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2000**; 278:C381-C390.
150. **Bateman RM, Jagger JE, Sharpe MD, Ellsworth ML, Mehta S, Ellis CG.** Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2001**; 280:H2848-H2856.
151. **Ko KS, McCulloch CAG: Partners in protection.** Interdependence of cytoskeleton and plasma membrane in adaptations to applied forces. *J Membr Biol*, **2000**; 174:85-95.
152. **Takakuwa Y, Mohandas N.** Modulation of erythrocyte membrane material properties by Ca²⁺ and calmodulin. Implications for their role in regulation of skeletal protein interactions. *J Clin Invest*, **1988**; 82:394-400.
153. **Tanaka T, Kadowaki K, Lazarides E, Sobue K.** Ca²⁺-dependent regulation of the spectrin/actin interaction by calmodulin and protein 4.1. *J Biol Chem*, **1991**; 266:1134-1140.
154. **Nunomura W, Takakuwa Y, Tokimitsu R, Krauss SW, Kawashima M, Mohandas N.** Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca²⁺ and calmodulin. Implications for modulation of CD44- ankyrin interaction. *J Biol Chem*, **1997**; 272:30322-30328.
155. **Romero PJ, Romero EA.** The role of calcium metabolism in human red blood cell ageing: a proposal. *Blood Cells Mol Dis*, **1999**; 25:9-19.
156. **Romero PJ, Romero EA.** Differences in Ca²⁺ pumping activity between subpopulations of human red cells. *Cell Calcium*, **1997**; 21:353-358.
157. **Romero PJ, Romero EA.** Effect of cell ageing on Ca²⁺ influx into human red cells. *Cell Calcium*, **1999**; 26:131-137.
158. **Daugas E, Cande C, Kroemer G.** Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ*, **2001**; 8:1131- 133.

159. **Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S.** Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ*, **2001**; 8:1197-1206.
160. **Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC.** Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ*, **2001**; 8:1143-1156.
161. **Myssina S, Huber SM, Birka C, Lang PA, Lang KS, Friedrich B, Risler T, Wieder T, Lang F.** Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol*, **2003**; 14:2750-2757.
162. **Lang KS, Myssina S, Lang PA, Tanneur V, Kempe DS, Mack AF, Huber SM, Wieder T, Lang F, Duranton C.** Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl⁻. *Am J Physiol Renal Physiol*, **2004**; 286:F1046-F1053.
163. **K.S. Lang, Duranton C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F, Wieder T. and Huber S.M.** Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ*, **2003**; 10: 249-56
164. **Connor J, Pak CC, Schroit AJ.** Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *J Biol Chem*, **1994**; 269:2399-2404.
165. **Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borken C, Prohaska R.** Ca²⁺-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood*, **2002**; 99:2569-2577.
166. **Cibert C, Pruliere G, Lacombe C, Deprette C, Cassoly R.** Calculation of a Gap restoration in the membrane skeleton of the red blood cell: possible role for myosin II in local repair. *Biophys J*, **1999**; 76:1153-1165.
167. **Wallis CJ, Babitch JA, Wenegieme EF.** Divalent cation binding to erythrocyte spectrin. *Biochemistry*, **1993**; 32:5045- 5050.
168. **Oonishi T, Sakashita K, Uyesaka N.** Regulation of red blood cell filterability by Ca²⁺ influx and cAMP-mediated signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, **1997**; 42:C1828-C1834.
169. <http://www.mechatronics.nl/products/lorrca/body.htm> (1 of 4) [20-6-02 10:12:39].
170. **Lowe GDO.** *Clinical Blood Rheology Volume I.* Florida: CRC Press, 1988.
171. **Stoltz JF, Singh M, Riha P.** *Hemorheology in Practice (Biomedical and Health Research, 30).* Amsterdams: IOS Press, 1999.

172. **Shiga T, Maeda N, Kon K.** Erythrocyte rheology. *Crit Rev Oncol Hemato*, **1990**; 10:9-48.
173. **R.D. Page**, TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers, *Comput. Appl. Biosci*, **1996**; 12, 357-358.
174. **Ridley, A.J, and Hall. A.** The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **1992**; 70:389-99.
175. **Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, and Hall A.** Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol*, **1990**; 111:1001-7.
176. **Tominaga, T, Sugie K, Hirata M, Morii N, Fukata J, Uchida A, Imura H, and Narumiya S.** Inhibition of PMA-induced, LFA-1-dependent lymphocyte aggregation by ADP ribosylation of the small molecular weight GTP binding protein, rho. *J Cell Biol*, **1993**; 120:1529-37.
177. **Takaishi K, Sasaki T, Kato M, Yamochi W, Kuroda S, Nakamura T, Takeichi M, and Takai Y.** Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene*, **1994**; 9:273-279.
178. **Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S, Kaibuchi K, Matsuura Y, Seki H, Saida K, and Takai Y.** Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem*, **1992**; 267:8719-22..
179. **Nishiki T, Narumiya S, Morii N, Yamamoto M, Fujiwara M, Kamata Y, Sakaguchi G, and S Kozaki.** ADP-ribosylation of the rho/rac proteins induces growth inhibition, neurite outgrowth and acetylcholine esterase in cultured PC-12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **1990**; 167:265-72.
180. **Mabuchi I, Hamaguchi Y, Fujimoto H, Morii N, Mishima M, and Narumiya S.** A rho-like protein is involved in the organisation of the contractile ring in dividing sand dollar eggs. *Zygote*, **1993**; 1:325-31.
181. **Casey PJ, Seabra MC.** Protein prenyl transferases. *J Biol Chem*, **1996**; 271:5289-5292.
182. **Olofsson B.** Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cell signaling. *Cell Signal*, **1999**; 11:545-554.
183. **Buhl AM, Johnson NL, Dahanasekaran N, Johnson GL.** G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J Biol Chem*, **1995**; 270:24631-24634.
184. **Dhanasekaran N, Dermott JM.** Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal*, **1996**; 8:235-245.
185. **Somlyo AV.** New roads leading to Ca²⁺ sensitization. *Circ Res*, **2002**; 91:83-84.

186. RHO Family GTPases Edited by ED. Manser Principle Investigator, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore
187. **Rikitake Y, Liao JK.** Rho GTPases, Statins, and Nitric Oxide. *Circ. Res.*, 2005; 97; 1232-1235.
188. **Amano M, Fukato Y, Kaibuchi K.** Regulation and function of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res.*, 2000; 261, 44-51.
189. **Takahashi N.** Lokalization of the gene coding for ROCKII/Rhokinase on human chromosome 2p24. *Genomics*, 1999; 55:235-237.
190. **Amano, M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi. K.** Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho- kinase). *J Biol Chem*, 1996; 271:20246-9.
191. **Shimokawa H, Takeshita A.** Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25:1767-1775.
192. **Nobes C, Hall A.** Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1994; 4:77-81.
193. **Oshiro N, Fukata Y, Kaibuchi K.** Phosphorylation of moesin by Rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. *J Biol Chem*, 1998; 273:34663-34666.
194. **Amano M, Mukai H, Ono Y, Chihara K, Matsui T, Hamajima Y, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K.** Identification of a putative target for Rho as a serine-threonine kinase, PKN. *Science*, 1996; 271:648-650.
195. **Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K.** Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 1996; 273:245-248
196. **Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch BM, Narumiya S.** p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J*, 1997; 16:3044-3056.
197. **Madaule P, Furuyashiki T, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Morii N, Narumiya S.** A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Lett*, 1995; 77:243-248.
198. **Madaule P, Eda M, Watanabe N, Fujisawa K, Matsuoka T, Bito H, Ishizaki T, Narumiya S.** Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature*, 1998; 394:491-494.

199. **Watanabe G, Saito Y, Madaule P, Ishizaki T, Fujisawa K, Morii N, Mukai H, Ono Y, Kakizuka A, Narumiya S.** Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhotekin as targets of small GTPase Rho. *Science*, **1996**; 271:645-648.
200. **Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, Watanabe G, Watanabe N, Fujisawa K, Morii N, Madaule P, Narumiya S.** Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhotekin in the rho-binding domain. *J. Biol. Chem.*, **1996**; 271:13556-13560
201. **Singer WD, Brown HA, Sternweis PC.** Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem.*, **1997**; 66:475-509.
202. **Mueller BK, Mack H, Teusch N.** Rho-kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nature reviews Drug Discovery*, **2005**; 4:387-398.
203. **Hartshorne, DJ, Ito M, and Erdodi F.** Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil.* **1998**; 19:325-41.
204. **Mukai H, Ono Y.** A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.* **1994**; 199:897-904.
205. **Vincent S, Settleman J.** The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol Cell Biol.* **1997**; 17:2247-56.
206. **Camera P, da Silva JS, Griffiths G, Giuffrida MG, Ferrara L, Schubert V, Imarisio S, Silengo L, Dotti CG, Di Cunto F.** Citron-N is a neuronal Rho-associated protein involved in Golgi organization through actin cytoskeleton regulation. *Nat Cell Biol*, **2003**; 5:1071-8.
207. **Kohno H, Tanaka K, Mino A, Umikawa M, Imamura H, Fujiwara T, Fujita Y, Hotta K, Qadota H, Watanabe T, Ohya Y, Takai Y.** Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 1996; 15:6060-8.
208. **Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S.** Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*, **1999**; 1:136-43.
209. **Gundersen, GG.** Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2002**; 3:296-304.
210. **Gundersen, GG, Gomes ER, Wen Y.** Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr Opin Cell Biol*, **2004**; 16:106-12.
211. **English D, Cui Y, Siddiqui RA.** Messenger functions of phosphatidic acid. *Chem Phys Lipids*, **1996**; 80:117-32.

212. **Bowman EP, Uhlinger DJ, Lambeth JD.** Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated Rho family small molecular weight GTP-binding protein. *J Biol Chem*, **1993**; 268:21509-12.

213. **Kuribara H, Tago K, Yokozeki T, Sasaki T, Takai Y, Morii N, Narumiya S, Katada T, Kanaho Y.** 1995; Synergistic activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factor and rhoA p21, and its inhibition by *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme. *J Biol Chem*. 270:25667-71.

214. **Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, Schwartz MA.** The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell*, **1994**; 79:507-13.
215. **Janmey P.** Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu Rev Physiol*, **1994**; 56:169-91.

216. **Somlyo AP, Somlyo AV.** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, **1994**; 372: 231-236.

217. **Gong MC, Iizuka K, Nixon G, Browne JP, Hall A, Eccleston JF, Sugai M, Kobayashi S, Somlyo AV, Somlyo AP.** Role of guanine nucleotide-binding proteins--ras-family or trimeric proteins or both--in Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**; 93:1340-1345.

218. **Ridley AJ, Hall A.** The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **1992**; 70:389-99.

219. **Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz A.** Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, **1995**; 7:697-706.

220. **Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K.** Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science*, **1997**; 275:1308-11.

221. **Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K.** Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*, **1996**; 271:20246-9.

222. **Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S.** Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, **1999**; 285:895-8.

223. **Hall A.** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **1998**; 79:509-14.

224. **Mitchison TJ, Cramer LP.** Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, **1996**; 84:371-9.

225. **Wilson AK, Gorgas G, Claypool WD, de Lanerolle P.** An increase or a decrease in myosin II phosphorylation inhibits macrophage motility. *J Cell Biol*, **1991**; 114:277-83.
226. **Fukata Y, Oshiro N, Kinoshita N, Kawano Y, Matsuoka Y, Bennett V, Matsuura Y, Kaibuchi K.** Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. *J Cell Biol*, **1999**; 145:347-61.
227. **Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M.** Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*, **1999**; 68:459-86.
228. **Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Herzmark P, Straight A, Kelly K, Takuwa Y, Sugimoto N, Mitchison T, Bourne HR.** Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell*, **2003**; 114:201-14.
229. **Jalink K, Moolenaar W.H.** Thrombin receptor activation causes rapid neural cell rounding and neurite retraction independent of classic second messengers. *J Cell Biol*, **1992**; 118:411-19.
230. **Koh Cheng-Gee.** Rho GTPases and Their Regulators in Neuronal Functions and Development. *Neurosignals*, **2006-07**; 15:228–237.
231. **Amano M, Chihara K, Nakamura N, Fukata Y, Yano T, Shibata M, Ikebe M, Kaibuchi K.** Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-kinase. *Genes Cells*, **1998**; 3:177-88.
232. **Bito H, Furuyashiki T, Ishihara H, Shibasaki Y, Ohashi K, Mizuno K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S.** A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron*, **2000**; 26:431-41.
233. **Yamaguchi Y, Katoh Hironori, Yasui H, Mori K, Negishi M.** RhoA Inhibits the nerve growth factor-induced Rac 1 Activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **2001**; 276:18977-18983.
234. **Fishkind DJ, Wang YL.** New horizons for cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol*, **1995**; 7:23-31.
235. **Drechsel DN, Hyman AA, Hall A, Glotzer M.** A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in *Xenopus* embryos. *Curr Biol*, **1997**; 7:12-23.
236. **Kosako H, Amano M, Yanagida M, Tanabe K, Nishi Y, Kaibuchi K, Inagaki M.** Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein at the same sites by cleavage furrow kinase and Rho-associated kinase. *J Biol Chem*, **1997**; 272:10333-6.
237. **Yasui Y, Amano M, Nagata K, Inagaki N, Nakamura H, Saya H, Kaibuchi K, Inagaki M.** Roles of Rho-associated kinase in cytokinesis; mutations in Rho-associated kinase phosphorylation sites impair cytokinetic segregation of glial filaments. *J Cell Biol*, **1998**; 143:1249-58.

238. **Goto H, Kosako H, Tanabe K, Yanagida M, Sakurai M, Amano M, Kaibuchi K, Inagaki M.** Phosphorylation of vimentin by rho-associated kinase at a unique aminoterminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis. *J Biol Chem*, **1998**; 273:11728-36.
239. **Di Cunto F, Imarisio S, Hirsch E, Broccoli V, Bulfone A, Migheli A, Atzori C, Turco E, Triolo R, Dotto GP, Silengo L, Altruda F.** Defective neurogenesis in citron kinase knockout mice by altered cytokinesis and massive apoptosis. *Neuron*, **2000**; 28:115-27.
240. **Algrain M, Turunen O, Vaheri A, Louvard D, Arpin M.** Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J Cell Biol*, **1993**; 120:129-39.
241. **Tsukita S, Oishi K, Sato N, Sagara J, Kawai A, Tsukita S.** ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol*, **1994**; 126:391-401.
242. **Mackay DJ, Esch F, Furthmayr H, Hall A.** Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. *J Cell Biol*. **1997**; 138:927-38.
243. **Shaw RJ, Henry M, Solomon F, Jacks T.** RhoA-dependent phosphorylation and relocation of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. *Mol Biol Cell*, **1998**; 9:403-19.
244. **Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K, Takeshita A.** Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res*, **2004**; 94:385-93.
245. **Hattori T, Shimokawa H, Higashi M, Hiroki J, Mukai Y, Kaibuchi K, Takeshita A.** Long-term treatment with a specific Rho-kinase inhibitor suppresses cardiac allograft vasculopathy in mice. *Circ Res*, **2004a**; 94:46-52.
246. **Ito K, Hirooka Y, Sakai K, Kishi T, Kaibuchi K, Shimokawa H, Takeshita A.** Rho/Rho-kinase pathway in brain stem contributes to blood pressure regulation via sympathetic nervous system: possible involvement in neural mechanisms of hypertension. *Circ Res*, **2003**; 92:1337-43.
247. **Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, Kaibuchi K, Takeshita A.** Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease—a novel therapeutic target in hypertension. *The FASEB J*, **2001**; 15(6):1062-4.
248. **Shimokawa H, Morishige K, Miyata K, Kandabashi T, Eto Y, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Takeshita A.** Longterm inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic lesion in a porcine model in vivo. *Cardiovasc. Res*, **2001**; 51: 169-177.
249. **Demiryürek S, Kara AF, Çelik A, Tarakçıoğlu M, Bağcı C, Demiryürek AT.** Effects of Y-27632, a selective Rho-kinase inhibitor, on myocardial preconditioning in anesthetized rats. *Biochem. Pharmacol*, **2005**; 69: 49-58.

250. **Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Sateguchi S, Takeshita A.** Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension*, **2001**; 1338:1307-1310.
251. **Coussin F, Scott RH, Wise A, Nixon GF.** Comparison of sphingosine 1-phosphate-induced intracellular signaling pathways in vascular smooth muscles: differential roles in vasoconstriction. *Circ Res*, **2002**; 91:151-157.
252. **van Nieuw Amerongen GP, van Delft S, Vermeer MA, Collard JG, van Hinsbergh VW** Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability role of Rho kinase and protein tyrosine kinase. *Circ Res*, **2000**; 87:335-340.
253. **Büyükaşar K, Arıkan O, Ark M, Seçilmiş A, Ün İ, Şingirik E.** Rho-kinase expression and its contribution to the control of perfusion pressure in the isolated rat mesenteric vascular bed. *Eur. J. Pharmacol*, **2004**; 485: 263-268.
254. **Büyükaşar K, Arıkan O, Ark M, Kubat H, Ozveren E.** Upregulation of Rho-kinase (ROCK-2) expression and enhanced contraction to endothelin-1 in the mesenteric artery from lipopolysaccharide-treated rats. *Eur J Pharmacol*. **2004**; 498(1-3):211-7.
255. **Ark M, Ozveren E, Yazici G, Korkmaz B, Büyükaşar K, Arıkan O, Kubat H, Songu-Mize E.** Effects of HA-1077 and Y-27632, two Rho-kinase inhibitors, in the human umbilical artery. *Cell Biochem Biophys*. **2004**; 41(3):331-42.
256. **Büyükaşar K, Akça T, Nalan Tiftik R, Sahan-Firat S, Aydın S.** Contribution of Rho-kinase in human gallbladder contractions. *Eur J Pharmacol*. **2006**; 540(1-3):162-7.
257. **Sahan-Firat S, Tiftik RN, Nacak M, Büyükaşar K.** Rho kinase expression and its central role in ovine gallbladder contractions elicited by a variety of excitatory stimuli. *Eur J Pharmacol*, **2005**; 528(1-3):169-75.
258. **Büyükaşar K, Levent A.** Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and acetylcholine release in the mouse gastric fundus. *Biochem Biophys Res Commun*. **2003**; 303(3):777-81.
259. **Thongon N, Nakkrasae LI, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N.** Prolactin stimulates transepithelial calcium transport and modulates paracellular permselectivity in Caco-2 monolayer: mediation by PKC and ROCK pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008 May;294(5):C1158-68. Epub 2008 Mar 19.
260. **Chiba Y, Sato S, Hanazaki M, Sakai H, Misawa M.** Inhibition of Geranylgeranyltransferase Inhibits Bronchial Smooth Muscle Hyperresponsiveness in Mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **2009**; Baskıda.

261. **Iizuka K, Shimizzu Y, Tsukagoshi H, Yoshi A, Harad T, Dobashi K, Murozono T, Nakazawa T, Mori M.** Evaluation of Y-27632, a rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea-pigs. *Eur. J. Pharmacol*, **2000**; 406: 273-279.
262. **Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, Morris KG, Suzuki T, Shimokawa H, McMurtry IF, Oka M.** Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, **2005**; 171: 494-499.
263. **Köksel O, Yildirim C, Tiftik RN, Kubat H, Tamer L, Cinel L, Kaplan MB, Değirmenci U, Ozdülger A, Büyükaşar K.** Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) upregulation in oleic acid-induced lung injury and its restoration by Y-27632. *Eur J Pharmacol*, **2005**; 510(1-2):135-42.
264. **Nikolic M.** The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol*, **2002**; 34:731-745.
265. **Luo L.** Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci*, **2000**; 1:173-180.
266. **Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y.** Fasudil, a Rho-kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directly on neurons. *Brain Research*, **2007**; 1154:215-224.
267. **Sato M, Tani E, Fujikawa H, Kiabuchi K.** Involvement of Rho-kinase mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circ. Res*, **2000**; 87:195-200.
268. **Tachibana E, Harada T, Shibuya M, Saito K, Takayasu M, Suzuki Y, Yoshida J.** Intra-Arterial Infusion of Fasudil Hydrochloride for Treating Vasospasm Following Subarachnoid Haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*, **1999**; 141: 13-19.
269. **Tsushima H, Mori M, Fujiwara N, Moriyama A.** Pharmacological characteristics of bombesin receptor mediating hypothermia in the central nervous system of rats. *Brain Res*, **2003**; 18; 969 (1-2):88-94.
270. **Sasaki Y.** New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: Rho-kinase-dependent myristoylated alanine-rich C-kinase substrate phosphorylation and regulation of neurofilament structure in neuronal cells. *J Pharmacol Sci*, **2003**; 93(1):35-40.
271. **Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic AV.** Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. *J Cell Sci*, **2003**; 116:4615-28.
272. **Zou Y, Su Y, Li B, Liu F, Ryder JW, Wu X, Gonzalez-DeWhitt PA, Gelfona V, Hale JE, May PC, Paul SM, Ni B.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic Abeta42 by inhibiting Rho. *Science*, **2003**; 302: 1215-1217.

273. **Büyükafşar K, Yalçın I, Kurt AH, Tiftik RN, Sahan-Firat S, Aksu F.** Rho-kinase inhibitor, Y-27632, has an antinociceptive effect in mice. *Eur J Pharmacol*, **2006**; 541(1-2):49-52.
274. **Inan S, Büyükafşar K.** Antiepileptic effects of two Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, in mice. *Br J Pharmacol*, **2008**; 155(1):44-51.
275. **Rees RW, Ziessen T, Ralph DJ, Kell P, Moncada S, Cellek S.** Human and Rabbit Cavernosal Smooth Muscle Cells Express Rho-kinase. *Int J Impot Res*, **2002**; 14:1-7.
276. **Wang H, Eto M, Steers WD, Somlyo AP, Somlyo AV.** RhoA-mediated Ca^{2+} sensitization in erectile function. *J Biol Chem*, **2002**; 277:30614-30621.
277. **Chitaley K, Wingard CJ, Clinton Webb R, Branam H, Stopper VS, Lewis RW, Mills TM.** Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nature Med*, **2001**; 7:119-122.
278. **Büyükafşar K, Un I.** Effects of the Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, on the corpus cavernosum from diabetic mice. *Eur J Pharmacol*, 2003; Jul 11; 472(3):235-8
279. **Turna B, Cinar MG, Canda AE, Orhan EC, Tiftik NR, Nazli O, Buyukafsar K.** Role of Rho-kinase in contractions of ureters from rabbits with unilateral ureteric obstruction. *BJU Int*, **2007**; 100(5):1166-71.
280. **Wibberley A, Chen Z, Hu E, Hieble JP, Westfall TD.** Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br. J. Pharmacol*, **2003**; 138: 757-766.
281. **Tahara M, Morishige K, Sawada K, Ikebushi Y, Kawagishi R, Tasaka K, Murata Y.** Rho/Rho-kinase cascade is involved in oxytocin-induced rat uterine contraction. *Endocrinology*, **2002**; 143: 920-929.
282. **Rees RW, Foxwell NA, Ralph DJ, Kell PD, Moncada S, Cellek S.** Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, inhibits proliferation and adrenergic contraction of prostatic smooth muscle cells. *J. Uro.*, 2003; 170: 2517- 2522,
283. **Honjo M, Tanihara H, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BY, Narumiya S, Honda Y.** Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, **2001**; 42: 137-144.
284. **Maddala R, Reddy VN, Epstein DL, Rao V.** Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells. *Mol Vis*, **2003**; 9:329-36.

285. **Thumkeo D, Shimizu Y, Sakamoto S, Yamada S, Narumiya S.** ROCK-I and ROCK-II cooperatively regulate closure of eyelid and ventral body wall in mouse embryo. *Genes Cells.* **2005**; 10(8):825-34.
286. **Imamura F, Mukai M, Ayaki M, Akedo H.** Y-27632, an inhibitor of rho-associated protein kinase, suppresses tumor cell invasion via regulation of focal adhesion and focal adhesion kinase. *Jpn. Cancer Res,* 91: 811-816, 2000.
287. **Ying H, Biroc SL, Li WW, Alicke B, Xuan JA, Pagila R, Ohashi Y, Okada T, Kamata Y, Dinter H.** The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Mol Cancer Ther,* 5: 2158-2164, 2006.
288. **Fritz G, Kaina B.** Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs, *Curr Cancer Drug Targets,* **2006**; 6(1):1-14.
289. **Funakoshi Y, Ichiki T, Shimokawa H, Egashira K, Takeda K, Kaibuchi K, Takeya M, Yoshimura T, Takeshita A.** Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension,* **2001**; 38(1):100-4.
290. **Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Fujii S, Kitabatake A, Shimokawa H, Takeshita A.** Critical role of Rho-kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* **2001**; 21(5):868-73.
291. **Kawamura H, Yokote K, Asaumi S, Kobayashi K, Fujimoto M, Maezawa Y, Saito Y, Mori S.** High glucose-induced upregulation of osteopontin is mediated via Rho/Rho kinase pathway in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol,* **2004**; 24:276-281.
292. **Hiroki J, Shimokawa H, Higashi M, Morikawa K, Kandabashi T, Kawamura N, Kubota T, Ichiki T, Amano M, Kaibuchi K, Takeshita A.** Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase in human coronary vascular smooth muscle cells. *J. Mol. Cell Cardiol,* **2004**; 37:537-546.
293. **Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M.** Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem,* **1999**; 68:459-86.
294. **Bogatcheva NV, Garcia JGN, Varin AD.** Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Moscow),* **2002**; 67: 75-84.
295. **Breslin JW, Yuan SY.** Involvement of Rho A and Rho kinase in neutropil-stimulated endothelial hyperpermeability. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol,* 2004; 286: H1057-1062.

296. **Kawaguchi A, Ohmori M, Fujimura A.** Partial protective effect of Y-27632, a Rho kinase inhibitor, against hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *European Journal of Pharmacology*, **2004**; 493; 167-171.
297. **Cummings RJ, Parinandi NL, Zaiman A, Wang L, Usatyuk PV, Garcia JG, Natarjan V.** Phospholipase D activation by sphingosine 1-phosphate regulates interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **277**: 30227-30235, 2002.
298. **Chang Y, Auradé F, Larbret F, Zhang Y, Le Couedic JP, Momeux L, Larghero J, Bertoglio J, Louache F, Cramer E, Vainchenker W, Debili N.** Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood*, **2007**; 109(10):4229-36.
299. **Hardy AR, Hill DJ, Poole AW.** Evidence that the purinergic receptor P2Y12 potentiates platelet shape change by a Rho kinase-dependent mechanism. *Platelets*, **2005**; 16(7):415-29.
300. **Tamaru S, Fukuta T, Kaibuchi K, Matsuoka Y, Shiku H, Nishikawa M.** Rho-kinase induces association of adducin with the cytoskeleton in platelet activation. *Biochem Biophys Res Commun*, **2005**; **1**; 332(2):347-51.
301. **Moers A, Wettschureck N, Offermanns S.** G13-mediated signaling as a potential target for antiplatelet drugs. *Drug News Perspect*, **2004**; 17(8):493-8.
302. **Feske SK, Sorond FA, Henderson GV, Seto M, Hitomi A, Kawasaki K, Sasaki Y, Asano T, Liao JK.** Increased leukocyte ROCK activity in patients after acute ischemic stroke. *Brain Res*, **2009**; 27; 1257:89-93.
303. **Noma K, Rikitake Y, Oyama N, Yan G, Alcaide P, Liu PY, Wang H, Ahl D, Sawada N, Okamoto R, Hiroi Y, Shimizu K, Lusinskas FW, Sun J, Liao JK.** ROCK1 mediates leukocyte recruitment and neointima formation following vascular injury. *J Clin Invest*, **2008**; 118(5):1632-44.
304. **Zhu Y, Stolz DB, Guo F, Ross MA, Watkins SC, Tan BJ, Qi RZ, Manser E, Li QT, Bay BH, Teo TS, Duan W.** Signaling via a novel integral plasma membrane pool of a serine/threonine protein kinase PRK1 in mammalian cells. *FASEB J*, **2004**; 18(14):1722-4.
305. **Govekar RB, Zingde SM.** Protein kinase C isoforms in human erythrocytes. *Ann Hematol*, **2001**; 80(9):531-4
306. http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/BioRad_proteinassay
307. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html>
308. **Coşkun FF.** Western-Blotlama yöntemi ile protein tespiti Hücre Kültüründe Temel İlkeler Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı-1, **2003**; 189-198.

- 309. LORCA Laser assisted optical rotational cell analyser Version 2.1: User Manual. Academic Medical Center Pres, 2004, Amsterdam.**
- 310. Somlyo AP, Somlyo AV.** Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, **2000**; 15:177-185.
- 311. Lai JM, Hsieh CL, Chang ZF.** Caspase activation during phorbol ester-induced apoptosis requires ROCK-dependent myosin mediated contraction. *Journal of Cell Science*, **2003**; 116, 3491-3501.
- 312. Contos J J A, Ishu I, Chun J.** Lysophosphatidic Acid Receptors. *Mol Pharmacol*, **2000**; 58:1188–1196.
- 313. Goetzel EJ, An S.** Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J*, **1998**; 12, 1589–1598.
- 314. Postma FR, Jalink K, Hengeveld T, Moolenaar WH.** Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor. *The EMBO Journal*, **1996**; 15 2388-2395.
- 315. Yang L, Andrews DA, Low PS.** Lysophosphatidic acid opens a Ca²⁺ channel in human erythrocytes. *Blood*. **2000**; 95: 2420-2425.
- 316. Sawada N, Itoh H, Yamashita J, Doi K, Inoue M, Masatsugu K, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Sone M, Yamahara K, Yurugi T, Nakao K.** cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 280:798-805.
- 317. Kou R, Igarashi J, Michel T.** Lysophosphatidic acid and receptor-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase *Biochemistry*, **2002**; 16; 41(15):4982-4988.
- 318. Cui YY, Zhang LK, Wu QZ, Jiang HF, Tang CS, Geng B.** Lysophosphatidic acid activates L-arginine/nitric oxide pathway of platelets in rats. *Beijing Da Xue Xue Bao*, **2005**; 18; 37(6):603-7.
- 319. Radeff-Huang J, Seasholtz TM, Matteo RG, Brown JH.** G Protein Mediated Signaling Pathways in Lysophospholipid Induced Cell Proliferation and Survival. *Journal of Cellular Biochemistry*, **2004**; 92:949–966.
- 320. Barvitenko NN, Adragna NC, Weber RE.** Erythrocyte Signal Transduction Pathways, their Oxygenation Dependence and Functional Significance. *Cell Physiol Biochem*, **2005**; 15:1-18.
- 321. Neidlinger NA, Larkin SK, Bhagat A, Victorino GP, Kuypers FA.** Hydrolysis of Phosphatidylserine-Exposing Red Blood Cells by Secretory Phospholipase A₂ Generates Lysophosphatidic Acid and Results in Vascular Dysfunction. *The Journal of Biological Chemistry*, **2006**; 281- 2, 775–781.

322. **Young N, Van Brocklyn JR.** Signal transduction of sphingosine-1-phosphate G protein-coupled receptors. *Scientific-World Journal*, **2006**; 6: 946-966.
323. **Hänel P, Andrèani P, Gräler MH.** Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *The FASEB Journal*, **2007**; 21: 1202–1209
324. **Essler M, Retzera M, Ilchmannb H, Lindera S, Weber PC.** Sphingosine 1-phosphate dynamically regulates myosin light chain phosphatase activity in human endothelial cells. *Cellular Signalling*, **2002**; 14: 607– 613.
325. **Hirayama T, Roberts D and William-Olson G.** Mechanical trauma to red blood cells caused by Bjork–Shiley and Carpentí-Edwards heart valves. *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg*, **1985**; 19, 253–256.
326. **Kameneva MV, Antaki JF, Borovetz HS, Griffith BP, Butler KC, Yeleswarapu KK, Watach MJ and Kormos RL.** Mechanisms of red blood cell trauma in assisted circulation. Rheologic similarities of red blood cell transformations due to natural aging and mechanical stress, *ASAIO J*, **1995**; 41: 457-460.
327. **Baskurt OK, Uyuklu M, Meiselman HJ.** Protection of erythrocytes from sub-hemolytic mechanical damage by nitric oxide mediated inhibition of potassium leakage. *Biorheology*, **2004**, 41:79-89.
328. **Nevaril C.G, Lynch E.C, Alfrey C.P, Hellums J.D.** Erythrocyte damage and destruction induced by shear stress, *J. Lab. Clin. Med.* **1968**; 71: 784-790.
329. **Mohandas N., Shohet S.B.** The role membrane associated enzymes in regulation of erythrocyte shape and deformability. *Clin. Hematol.* **10: 223–237, 1981.**
330. **Noji S., Taniguchi S., Kon H.** An EPR study on erythrocyte deformability. *Prog. Biophys. Molec. Biol*, **1991**; 55: 85-105.
331. **Jubelin BC and Gierman JL.** Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *Am. J. Hypertens*, **1996**; 9: 1214–1219.
332. **Korbut R and Gryglewski RJ.** Nitric oxide from polymorphonuclear leukocytes modulates red blood cell deformability in vitro. *Eur. J. Pharmacol*, **1993**; 234: 17–22.
333. **Korbut R and Gryglewski RJ.** The effect of prostacyclin and nitric oxide on deformability of red blood cells in septic shock in rats. *J Physiol Pharmacol*, **1996**; 47: 591–599.
334. **Liu S, Premont RT, Kontos CD, Huang J, Rockey DC.** Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt. *J Biol Chem*, **2003**; 278(50):49929-49935.

335. **Adragna NC and Lauf PK.** Role of nitrite, a nitric oxide derivative, in K-Cl cotransport activation of low-potassium sheep red blood cells. *J Membr Biol*, **1998**; 166: 157–167.
336. **Grzelak A, Mazur J, and Bartosz G.** Peroxynitrate activates K-Cl cotransport in human erythrocytes. *Cell Biol Int*, **2001**; 25: 1163–1165.
337. **Kalfa TA, Pushkaran S, Mohandas N, Hartwig JH, Fowler VM, Johnson JF, Joiner CH, Williams DA, Zheng Y.** Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton *Blood*, **2006**; 108:3637-3645.
338. **Van Leeuwen FN, Olivo C, Grivell S, Giepmans BN, Collard JG, Moolenaar WH.** Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J Biol Chem*, **2003**; 278:400-406.
339. **Nimnual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D.** Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol*, **2003**; 5:236–241.
340. **Kuypers FA.** Red cell membrane lipids in hemoglobinopathies. *Curr Mol Med*. **2008**; 8(7):633-638.
341. **www.babraham.ac.uk/.../krugmann/research.html**
342. **Krugmann S, Williams R, Stephens LR, Hawkins PT.** ARAP3 is a PI3K- and Rap-regulated GAP for RhoA. *Current Biology*, **2004**; 14, 1380-1384
343. **<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.058>**
344. **Martorana MC, Mojoli G, Cianciulli P, Tarzia A, Mannella E, Caprari P.** Sick cell anemia: haemorheological aspects. *Ann Ist Super Sanità*, **2007**; 43, 2: 164-170.
345. **Asakura T, Mayberry J.** Relationship between morphologic characteristics of sickle cells and method of deoxygenation. *J Lab Clin Med*, **1984**; 104(6):987-94.
346. **Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN.** The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*, **2004**; 26(8):870-81.

ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Almanya'da doğdum. İlkokul, orta ve lise öğrenimimi Mersin'de tamamladım. 1995 yılında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. 1995-2003 yılları arasında Diyarbakır Merkez Ben-u Sen ve Mersin Merkez 11 Nolu Sağlık Ocaklarında pratisyen hekim olarak görev yaptım. 2003 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Farmakoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım. 2004 yılından itibaren Sağlık Bilimleri Enstitüsünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. 2005 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamladıktan sonra aynı yıl doktora eğitimime başladım. Yabancı dilim İngilizcedir. Evli ve bir çocuk annesiyim.