

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

**SIÇAN KORONER MİKROVASKÜLER ENDOTEL
HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ANDROJENİK VE ESTROJENİK
HORMONLARIN RHO-KİNAZ ENZİM EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

A. Hakan KURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAŞAR

MERSİN – 2008

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

**SIÇAN KORONER MİKROVASKÜLER ENDOTEL
HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ANDROJENİK VE ESTROJENİK
HORMONLARIN RHO-KİNAZ ENZİM EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

A. Hakan KURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR

MERSİN – 2008

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

**SIÇAN KORONER MİKROVASKÜLER ENDOTEL
HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ANDROJENİK VE ESTROJENİK
HORMONLARIN RHO-KİNAZ ENZİM EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

A. Hakan KURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR

Bu Çalışma; Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından desteklenmiştir.

Tez No:

MERSİN – 2008

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

“Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans (Tezli) Program” çerçevesinde yürütülmüş olan “Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültüründe Androjenik ve Estrojenik Hormonların Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonuna Etkisi” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 23/09/2008

Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. İsmail ÜN
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

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

Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Eğitimim süresince engin bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan ve zorlu tez dönemimde yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız ve danışman hocam Sn. Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAŞAR'a en içten şükranlarımı sunarım.

Tezime katkılarından dolayı Anabilim Dalımız öğretim üyesi Sn. Yrd. Doç. İsmail ÜN'e teşekkür ederim.

Her türlü desteğinden dolayı çalışma arkadaşlarım başta Arş. Gör. Nalan TİFTİK, Arş. Gör. Mehtap PEKTAŞ, Arş. Gör. Sencer YURTSEVER'e ve diğer anabilim dallarındaki çalışma arkadaşlarım ile teknik ve idari personele teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü fedakarlığı ve destekleri için eşim GÜL ve oğlum BERKE'ye teşekkür ederim. Kendi ailem ve eşimin ailesine tezim boyunca sabır ve destekleri için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLO DİZİNİ	x
KISALTMALAR	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Endotel.....	5
2.1.1 Damar Tonusunun Ayarlanması.....	5
2.1.1.1 Nitrik Oksit (NO).....	6
2.1.1.2 Prostaglandin.....	9
2.1.1.3 Anjiyotensinler ve Kininler.....	9
2.1.1.4 Endotelin	10
2.1.1.5 Endotel Kökenli Hiperpolarize Edici Faktör.....	10
2.1.2 Dolaşımdaki Hücre Fonksiyonunun Düzenlenmesi.....	11
2.1.3 Koagülasyon ve Fibrinolizisin Düzenlenmesi.....	12
2.2 Seks Hormonları.....	14
2.2.1 Estrojenler.....	14
2.2.1.1 Estrojenin Etkileri.....	15
2.2.1.1.1 Estrojenlerin Seks Karakterleri ve Genital Kanal Üzerine Etkisi.....	16
2.2.1.1.2 Estrojenlerin Kemik ve Metabolizması Üzerine Etkileri.....	17
2.2.1.1.3 Estrojenlerin Damar Fonksiyonları Üzerine Etkileri.....	17
2.2.1.1.4 Endotel Üzerine Estrojenin Etkileri.....	18
2.2.1.2 Postmenapozal Hormon Tedavisinde Kullanılan Ajanlar.....	19
2.2.1.2.1 Oral Estrojenler.....	20

2.2.1.2.2 Transdermal Estrojenler.....	20
2.2.1.2.3 Transvajinal Estrojenler.....	20
2.2.1.2.4 Perkutanöz Estrojenler.....	21
2.2.1.2.5 Subkutaneal Estrojen preparatları.....	21
2.2.1.2.6 İntranazal Sprey Estrojenler.....	21
2.2.2. Progesteron.....	21
2.2.2.1 Progesteronun Etkileri.....	23
2.2.2.1.1 Progesteronun Overler ve Uterus Üzerine Etkileri.....	23
2.2.2.1.2 Progesteronun Metabolik Terojenik Etkileri.....	23
2.2.2.1.3 Progesteronun Kardiyovasküler Etkileri.....	24
2.2.2.2 Progesteron Preparatları.....	25
2.2.2.2.1 Progesteron ve Türevleri.....	25
2.2.2.2.2 Testosteron Türevleri Sentetik Projestinler.....	25
2.2.3 Androjenler.....	26
2.2.3.1 Genel Özellikler.....	26
2.2.3.2 Testosteronun Etkileri.....	29
2.2.3.2.1 Testosteronun Androjenik Etkileri.....	29
2.2.3.2.2 Anabolik ve Metabolik Etkileri.....	30
2.2.3.2.3 Testosteronun Kan Yağları ve Kardiyovasküler Sistem Üzerine Olan Etkileri.....	30
2.2.3.2.4 Testosteronun Hematolojik Etkileri.....	30
2.2.3.3 Testosteron Preparatları.....	31
2.2.3.3.1 Enjektabl Testosteron Preparatları.....	31
2.2.3.3.2 Oral Testosteron Preparatları.....	31
2.2.3.3.3 Transdermal Testosteron Preparatları.....	32
2.3 G Proteinleri	33
2.3.1 Heterotrimerik G Proteinleri.....	33
2.3.2 Küçük G Proteinleri.....	33
2.3.2.1 Rho.....	34
2.3.2.2 Rho/Rho-Kinaz Yolağı.....	34
2.3.2.3 Rho/Rho-Kinazın Düzenlenmesi	37
2.3.2.4 Rho/Rho-kinaz Yolağının Vasküler Dokudaki Fonksiyonu.....	39

3. GEREÇ ve YÖNTEM	41
3.1 Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültürü.....	41
3.1.1 Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre İzolasyonu ve Ekimi.....	41
3.1.2 Tripsinizasyon ve Pasajlama İşlemi.....	43
3.2 Deney Gruplarının Hazırlanması.....	44
3.3 Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar.....	45
3.4 Protein Miktar Tayini.....	45
3.5 Western-Blot Analizi	45
3.6 Nitrit-Nitrat Tayini.....	45
3.7 Bulguların Değerlendirilmesi.....	47
4. BULGULAR	48
4.1 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültüründe Total Protein Miktarı	48
4.2 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücrelerinin Kültürü.....	49
4.2.1 17- β Estradiol ve ICI 182,780'nin Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	50
4.2.2 Testosteronun Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	51
4.2.3 Progesteronun Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	52
4.2.4 17- β Estradiol ve Testosteronun Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	53
4.2.5 17- β Estradiol ve Progesteronun Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	54
4.3 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültüründe RhoA Protein Ekspresyonları.....	55
4.3.1 17- β Estradiol ve ICI 182,780'nin RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	55
4.3.2 RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Testosteronun Etkileri	56
4.3.3 RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Progesteronun Etkileri	57
4.3.4 17- β Estradiol ve Testosteronun RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	58
4.3.5 17- β Estradiol ve Progesteronun RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	59

4.4 17- β Estradiol, ICI 182,780 ve Progesteronun MYPT Fosforilasyonu Üzerine Etkileri.....	60
4.5 17- β Estradiolün Nitrik Oksit Üzerine Etkisi.....	61
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
7. KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Endotelden Salıverilen Gevşetici Faktörler.....	5
Şekil 2 Nitrik Oksit Sentezi.....	7
Şekil 3 Klinik Olarak Önemli Olan Koagülasyon Reaksiyonları.....	12
Şekil 4 Estrojen Sentezi.....	15
Şekil 5 Estrojenin Endotel Hücresi Üzerindeki Etkisi.....	17
Şekil 6 Progesteron Sentezi.....	21
Şekil 7 Testosteron Sentezi.....	26
Şekil 8 Rho/Rho-kinaz Yolağı.....	36
Şekil 9 Rho Aktivitesinin Düzenlenmesi.....	37
Şekil 10 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücrelerinin Kültür Ortamında Konfluent Olduğunu Gösteren Bir Fotoğraf.....	49
Şekil 11 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında 17- β Estradiol İle Birlikte ICI 182,780'nin Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin Western Blot Tekniğı İle Gösterilmesi.....	50
Şekil 12 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Testosteron İnkübasyonu Takiben ROCK-2 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniğı İle Gösterilmesi.....	51

Şekil 13 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Progesteron İnkübasyonunu Takiben ROCK-2 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi	52
Şekil 14 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında 17-β Estradiol İle Birlikte Testosteronun Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.....	53
Şekil 15 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında 17-β Estradiol İle Birlikte Progesteronun Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.....	54
Şekil 16 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında 17-β Estradiol İle Birlikte ICI 182,780'nın RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.....	55
Şekil 17 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Testosteron İnkübasyonunu Takiben RhoA Protein Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi	56
Şekil 18 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Progesteron İnkübasyonunu Takiben RhoA Protein Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.....	57
Şekil 19 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında 17-β Estradiol İle Birlikte Testosteronun RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.....	58
Şekil 20 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında 17-β Estradiol İle Birlikte Progesteronun RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.....	59

Şekil 21 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında 17- β Estradiol İle Birlikte ICI 182,780'nın ve 17- β Estradiol İle Birlikte Progesteronun MYPT Fosforilasyonu Üzerine Etkilerinin Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.....60

Şekil 22. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde 17- β estradiol inkübasyonunu takiben NO miktarlarının amperometrik yöntem ile gösterilmesi.....61

TABLO DİZİNİ

Tablo 1 Seks Hormonu Miktarları.....	13
Tablo 2 Serbest Testosteron Miktarları.....	28
Tablo 3 17- β Estradiol, Testosteron, Progesteron Uygulanan Hücrelerin Total Protein Miktarları.....	48

KISALTMALAR DİZİNİ

A-II	- Anjiyotensin II
ADE	- Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
BSA	- Bovin Serum Albumin
cGMP	- Siklik 3,5-guanosin monofosfat
CMVE	- Koroner mikrovasküler endotel hücresi
CPI-17	- Protein kinaz C ile aktive edilen fosfataz inhibitörü
DDL	- Düşük Dansiteli Lipoprotein
DHT	- Dihidrotestosteron
DHEA	- Dehidroepiandrosteron
DMSO	- Dimetilsülfoksit
EDHF	- Endotel Kaynaklı Hiperpolarize Edici Faktör
EDTA	- Etilendiamintetraasetikasit
EGTA	- Diaminoetoksietan tetraasetik Asit
ecSOD	- Endotele Bağlı Süperoksit Dismutaz
eNOS	- Endotelyal Nitrik oksit Sentaz
ET	- Endotelin
ET-1	- Endotelin-1
GAPs	- Guanin trifosfat az aktif edici proteinler
GDI	- Guanin trifosfat az ayırıcı inhibitörler
GnRH	- Gonadotropin Salıverici Hormon
HERS	- Estrogen/Progestin Replacement Study
H₂O₂	- Hidrojen Peroksit
HUVEC	- Umbilikal Ven Endotel Hücre Kültürü
ICAM-1	- İnterselüler Adezyon Molekülü-1
L-NMMA	- N-monometil-L-arginin
LPA	- Lizofosfatidik Asit
KAH	- Koroner Arter Hastalığı
MI	- Myokard İnfarktüsü

NO	- Nitrik Oksit
O₂⁻	- Süper Oksit
ONOO⁻	- Peroksinitrit
RAS	- Renin Anjiyotensin Sistemi
Rho GEFs	- Rho spesifik guanin nükleotid değişim faktörleri
ROCK	- Rho-kinaz
SDS-PAGE	- Sodium dodecyl sulfate-polycrilamide gel
SHBG	- Seks Hormonu Bağlayan Globulin
SMPP-IM	- Düz kas miyozin hafif zincir fosfatazı
SOD	- Süperoksit Dismutaz
PAI-1	- Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
PECAM	- Platelet-Endotelyal Hücre Adezyon Molekülünden
PHASE	- Papworth HT Atherosclerosis Study Enquiry
PG	- Prostaglandin
PGI₂	- Prostatiklin
tPA	- Doku plazminojen aktivatörü
TXA₂	- Tromboksan A ₂
YDL	- Yüksek Dansiteli Lipoprotein
VCAM-1	- Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
VEGF	- Vasküler Endotel Büyüme faktörü
vWf	- Van willebrand faktörü

ÖZET

Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültüründe Androjenik ve Estrojenik Hormonların Rho-kinaz Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Bu çalışmada sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde androjenik ve estrojenik hormonların RhoA ve ROCK-2 enzim ekspresyonu üzerine etkileri araştırıldı. Bu amaçla sıçan koroner mikrovasküler endotel hücreleri kültüre edildi.

Kültüre edilen sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde androjenik hormon olarak testosteron (10^{-8} M - 10^{-7} M), estrojenik hormon olarak 17- β estradiol (10^{-8} M - 10^{-7} M) ve progesteron (10^{-8} M - 10^{-7} M) 24 saat uygulandı, ROCK-2 ve RhoA enzimlerinin ekspresyonları üzerine etkisi araştırıldı.

Çalışmada Wistar türü sıçanlar kullanıldı. Kalpler Langendorff kalp perfüzyon sistemine asılarak koroner mikrovasküler endotel hücreleri elde edildi. Hücreler kültür flasklarına ekilerek 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Konfluent olan flasklar pasajlanarak çoğaltıldı. 3. pasaj koroner mikrovasküler endotel hücreleri, deneylerden 24 saat önce bölünmeleri durdurulup testosteron, 17- β estradiol, progesteron ile 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası flasklardaki hücreler ise homojenize edilerek Western-Blot yöntemi ile RhoA protein ve ROCK-2 enzim ekspresyon düzeyleri ölçüldü.

Sonuç olarak, 17 β -estradiol sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde ROCK-2 ve RhoA enzimlerinin ekspresyonunu anlamlı bir şekilde artırırken, testosteron ve progesteron ROCK-2 ve RhoA enzimlerinin ekspresyonunu etkilemedi. Bu bulgu, 17 β -estradiol'un kardiyovasküler hastalık oluşumuna katkıda bulunabileceğini, testosteron ve progesteronun kardiyovasküler etkilerini Rho/Rho-kinaz sinyal yolağı üzerinden göstermediğine işaret edebilir.

Anahtar kelimeler; Rho-kinaz, Testosteron, 17 β -estradiol, Progesteron, koroner mikrovasküler endotel hücreleri.

ABSTRACT

The effect of androgenic and estrogenic hormones on the Rho-kinase expressions in rat coronary microvascular endothelium cell culture

In this study, we aimed to investigate the possible effect of androgenic and estrogenic hormones on the RhoA and Rho-kinase expressions in rat coronary microvascular endothelium cell culture. Therefore, we cultured rat coronary microvascular endothelial cells.

The effect of testosterone (10^{-8} M - 10^{-7} M), 17- β estradiol (10^{-8} M - 10^{-7} M) and progesterone (10^{-8} M - 10^{-7} M) hormones on the expression of ROCK-2 and RhoA protein was investigated.

Wistar rats were used in the study. Coronary microvascular endothelial cells were obtained by the mounted rat hearts on a constant-flow Langendorff system. The cell suspensions were plated and incubated at 37 °C under 5 % CO₂. The third passage coronary microvascular endothelial cells was made quiescent 24 hours before experimentation and then incubated with testosterone, 17- β estradiol and progesterone. After the incubation, the cells were homogenized for measuring RhoA protein and ROCK-2 enzyme expression levels by Western-Blotting technique.

As a result, 17- β estradiol upregulated the RhoA and ROCK-2 protein expressions significantly but testosterone and progesterone did not change the levels of these proteins.

This finding indicates that 17- β estradiol may effect the cardiovascular system via Rho/Rho-kinase pathway however this pathway does not play a role on the testosterone and progesterone's cardiovascular effects.

Key Words: Rho-kinase, Testosterone, 17- β estradiol, Progesterone, coroner microvascular endothelial cells

1.GİRİŞ

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kardiyovasküler hastalıklar ve komplikasyonları en başta gelen ölüm nedenlerindedir. 30-50 yaş arası erkeklerde kardiyovasküler hastalık insidansı aynı yaştaki kadınlara göre daha fazladır. Kardiyovasküler hastalık sıklığının aynı yaş grubundaki kadın ve erkeklerde belirgin farklılık göstermesi, seks hormonlarının hastalık gelişiminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (1). Bununla uyumlu bir şekilde koroner arter hastalıkları, kadınlarda erkekler ile karşılaştırıldığında ortalama 10 yıl sonra geliştiği bildirilmiştir. Bu gecikmenin nedeni menopoz öncesinde özellikle estrogen olmak üzere kadın seks hormonlarının koruyucu etkisine bağlı olabilir (2). Menopozla beraber kadınlarda kardiyovasküler hastalıklarda artma ve endotel fonksiyonlarında bozulma olmaktadır. Bu artmış risk estrogen tedavisi ile önlenabilir gibi görünmektedir (3). Başlangıçta, hayvan çalışmaları ve gözlemsel çalışmalarda menopoz sonrası hormon tedavisinin kardiyovasküler koruyucu etkisini kuvvetle desteklemiştir. Ancak estrogenlerin bu kardiyovasküler koruyucu etkilerinin yanı sıra hormon replasman tedavi süresince zararlı kardiyovasküler etkilerinin de ortaya çıktığı bildirilmiştir (1). Örneğin Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) çalışmasında ilk bir yıl içinde hormon replasman tedavisi alan grupta kontrol grubuna göre daha sık kardiyovasküler problemler gözlenmiştir (4). Plasebo kontrollü Papworth HT Atherosclerosis Study Enquiry (PHASE) çalışmasında 4. yılın sonunda estrogen tedavisi alan grupta koroner olaylar % 23 oranında daha sık görülmüştür (5).

Progesteronlar, estrogen tedavisinin artırdığı endometrial malignite riskini azaltmak için sıklıkla eklenmektedir. Ayrıca progesteron, estrogenlerin vasküler etkisini değiştirebilmektedir. Progesteron anti-aterosklerotik etkilerini yüksek dansiteli lipoprotein (YDL) düzeyini, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ekspresyonunu ve prostaglandin üretimini artırarak, buna karşılık düşük dansiteli lipoprotein (DDL) düzeyini azaltarak oluşturmaktadır. Diğer taraftan istenmeyen kardiyovasküler etkilerini ise estrogenlerin antioksidan etkilerini azaltarak göstermektedir (6).

Başlıca erkek seks hormonu olan testosteron YDL'nin azalmasına ve trigliseritlerin artmasına yol açar (7). Lipoprotein düzeylerindeki bu değişiklik kardiyovasküler hastalıklar açısından bir risk faktörü gibi görülmesine rağmen, koroner arter hastalığı (KAH) olan erkeklerde düşük testosteron düzeylerinin saptanması, ve ayrıca myokard infarktüsü (MI) geçiren erkeklerde endojen testosteron düzeylerinin düşük olduğunun gösterilmesi, testosteronun koroner arter hastalığına karşı koruyucu bir rolü olabileceğini akla getirmiştir (8). Testosteron direkt androjenik etkilerinin yanı sıra estrojene dönüşerek ateroskleroz gelişimini etkileyebilir (8).

Ateroskleroz gelişiminin ilk basamağının endotelial disfonksiyon olduğu düşünülmektedir (9). Sağlıklı bir endotel kan ve damar duvarı arasında sadece fizyolojik bir bariyer olmanın dışında aynı zamanda çoklu endokrin ve parakrin fonksiyonları olan bir organ olarak tanımlanmaktadır. İlaveten hemodinamik değişiklikleri ve dolaşım kaynaklı sinyalleri algılayabilir ve vazoaaktif maddeler salarak bunlara cevap verebilir. Fizyolojik şartlarda endotelial vasküler kontraksiyon, lökosit adezyonu, vasküler düz kas hücre büyümesi ve trombosit agregasyonu üzerinde bir dizi biyolojik molekülün üretimi yoluyla inhibitör bir regülatör olarak rol oynar (10).

Damar endotel hücreleri, aynı düz kas hücresi gibi kontraktıl elementlere sahiptir. Dolayısıyla bu hücreler çeşitli stimuluslara yanıt olarak kontraktılite şeklinde yanıt verebilir. Rho benzeri küçük GTPaz olan RhoA, aktomyozin kasılmasını artırır ve bu şekilde intrasellüler kavşak bütünlüğünü bozarak endotelial bariyer disfonksiyonuna neden olur (11). Elde edilen bir çok veri göstermektedir ki Rho'nun alt efektörlerinden Rho-kinaz (ROCK), okside DDL, bakteriyel toksinler ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi çeşitli vazoaaktif ajanlar tarafından indüklenen endotelial hiperpermeabilitede rol oynar (12). Küçük molekül ağırlıklı (yaklaşık 20 kDa) bir G proteini olan Rho, bir çok dokuda Ca^{2+} duyarlaşmasına aracılık eder. Bu fenomen, myozin hafif zincir fosforilasyonunun ve bunu takiben oluşan kasılma gücünün, intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonundan bağımsız olması olarak tanımlanır. Diğer bir ifadeyle, hücre içi Ca^{2+} düzeyleri sabit olduğu zaman bile, agonistle indüklenen kasılmanın yeterli bir şekilde sürdürülmesi, esasen Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağı ile sürdürülür (13). Heterotrimerik G proteinleri ile kenetli çeşitli reseptörlerin aktive

edilmesi, hücre içi Ca^{2+} düzeylerini artırabilir. Kalsiyum, kalmoduline bağlanarak myozin hafif zincirini fosforile etmek için myozin hafif zincir kinazı stimüle eder (14,15). Bu enzim myozini fosforile ederek kasılma olayını başlatır. Diğer taraftan myozin fosfataz denen bir enzim de, myozini defosforile ederek kasılma olayını tersine çevirir. Ca^{2+} duyarlaşmasındaki esas mekanizmanın myozin hafif zincir kinazın stimülasyonundan ziyade, myozin fosfotazın Rho-kinaz tarafından fosforile edilerek inhibe edilmesi olduğu iddia edilmektedir (16,17).

Estrojenin in vivo olarak dişi sıçanların serebral dolaşımında vasküler Rho-kinaz fonksiyonlarını baskıladığını göstermiş olmalarına rağmen, tavşan mesane düz kasında estrojenlerin ROCK ekspresyonunu ve aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (18,19). Ayrıca insan umbilikal ven endotel hücre kültüründe estrojenin ve progesteronun, Rho-kinazın alt efektörü olan moezinin fosforilasyonunu artırdığı gösterilmiştir (20,21). Bunun yanı sıra androjenlerin sıçan renal damarında ROCK ekspresyonunu ve aktivitesini artırdığını bildirilmiştir (22). Rho/Rho-kinaz yolağı aktivitesinin artmasının sadece damar düz kas kasılmasına katkı sağlamadığı aynı zamanda inflamatuvar aterosklerotik lezyonların oluşmasına da neden olduğu ve ROCK inhibitörü fasudilin bu lezyonların gelişmesini önlediği bildirilmiştir (23). Ayrıca hidroksifasudil, köpek efor anjinasındaki myokardial iskemiye önlemiştir (24). Bu çalışmalar ışığında gelişen pek çok kardiyovasküler komplikasyonların Rho/Rho-kinaz yolağının aktivasyonundaki artış ile ilgili olabileceği ileri sürülebilir. Rho/Rho-kinaz yolağının aktivasyonu spesifik olarak inhibe eden ajanların kullanılması bu patolojik durumların tedavisinde yararlı olabilir.

Estrojenik hormonların kardiyovasküler koruyucu etkileri bildirilmiştir (3). Bu etkiye aracılık eden mekanizmalar şöyle sıralanabilir ;

1. Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzim ekspresyonunu artırır.
2. NADPH oksidaz ekspresyonunu inhibe ederek, süperoksit ve peroksinitrit üretimini azaltarak antioksidan etki gösterir.
3. Lipoprotein oksidasyonunu inhibe eder, aterosklerotik lezyon oluşumunu azaltır, damar içersinde kollajen birikimini inhibe eder.
4. Renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) salınımını inhibe eder.

5. Endotelyal hücrelerden vazokonstriktör bir madde olan endotelin 1 (ET-1) salınımını inhibe eder (1).

Buna karşılık androjenik hormonların tam tersi kardiyovasküler komplikasyonlara aracılık ettiği genellikle rapor edilmiştir (7). Diğer taraftan son zamanlarda androjenik hormonların bir takım yararlı etkileri de bildirilmiştir (8). Ancak, koroner endotel hücrelerinde estrojenik ve androjenik hormonların moleküler düzeydeki etkileri çok iyi anlaşılmamıştır. Bu nedenle sıçan koroner mikrovasküler endotel hücresi kullanmak suretiyle kadın ve erkek seks hormonlarının (estradiol, progesteron ve testosteron) özellikle Rho/Rho-kinaz yolağı üzerindeki etkilerini inceledik. Bu amaçla estradiol, progesteron, testosteron ve estrojen reseptör blokörü ICI 182,780'ın ve onların kombinasyonlarının Rho ve ROCK ekspresyonu ve ROCK aktivitesi üzerine etkileri Western blot analizi ile değerlendirildi.

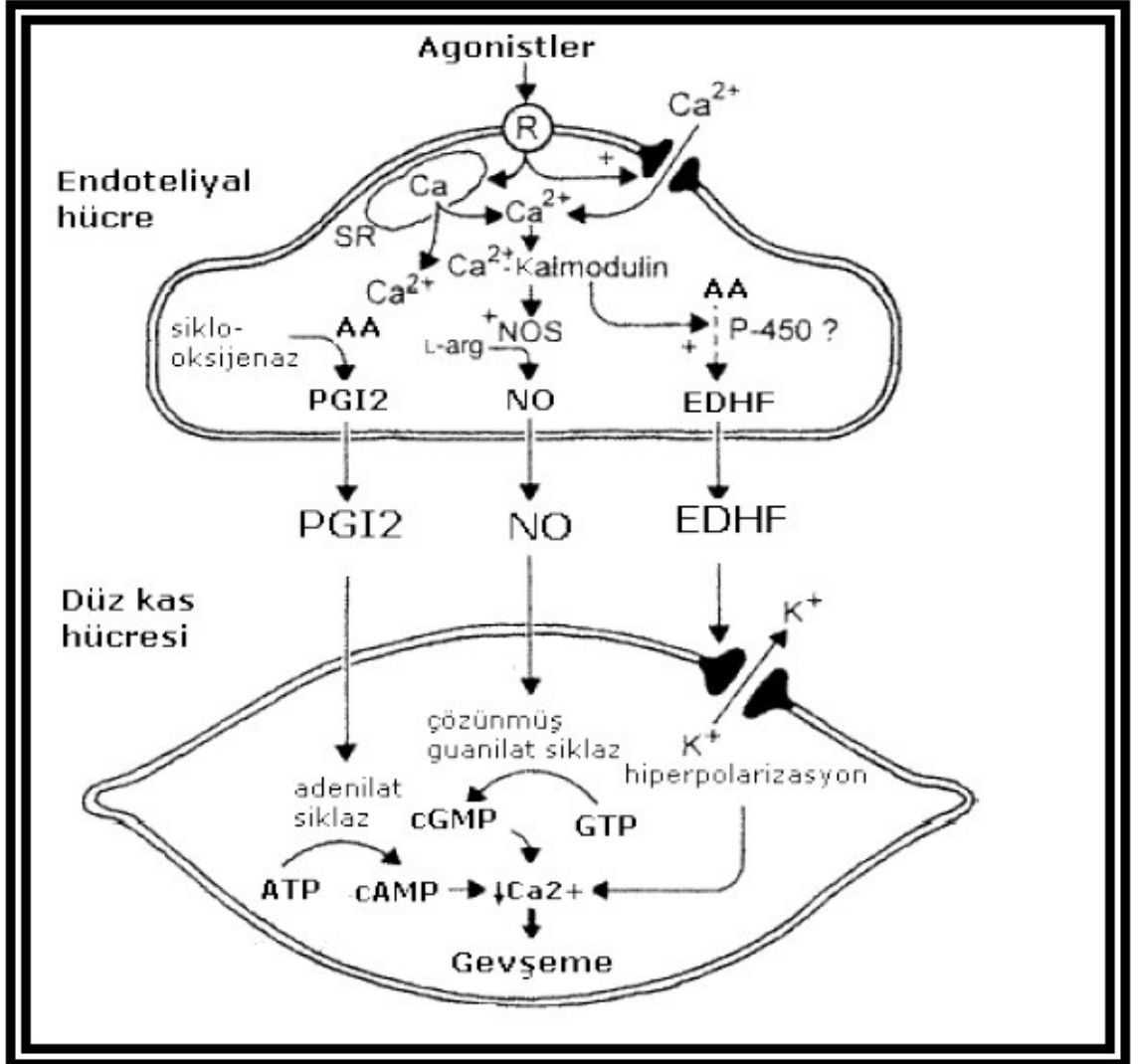
2.GENEL BİLGİLER

2.1 Endotel

Endotel, kan damarlarının lümen yüzeyini döşeyen tek sıralı hücrelerdir. Bu yapı, ortalama 1 kg ağırlığındadır ve $1-6 \times 10^{13}$ hücreden oluşmaktadır (25). Endotel terimi ilk defa 1865 yılında His tarafından tanımlanmıştır. Geçen 25 yıla kadar önemi pek bilinmeyen endotel, prostasiklin, nitrik oksit (NO) gibi türevlerinin otokrin etkilerinin bulunmasından sonra önem kazanmıştır (26). Endotel lokal doku ile kan dolaşımındaki komponentler arasındaki direk temasta çok önemli bir rol oynar. Ayrıca endotel, damar tonusu, hücresel adezyon, koagülasyon, inflamasyon ve geçirgenlik gibi bir çok lokal kan damarı fonksiyonlarını düzenler (27).

2.1.1 Damar Tonusunun Ayarlanması

Dokularda kapiller düzeyinde kan akımının sabit tutulması arteriyol ve postkapiller venüllerin tonusundaki değişimler ile sağlanır. Burada akımın düzenlenmesi, vasküler yataktaki direnç değişikliğinin oluşabilmesine bağlıdır (28,29). Endotel bir çok güçlü lokal aktif mediyatörleri üretebilir ve tepki verebilir. Bu mediyatörlerden en önemli olanları; NO, prostasiklin, anjiyotensin II (A-II), endotelin ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktördür (EDHF) (30). Normalde sabit doku perfüzyonunun sürdürülmesi, vazodilatatör ve vazokonstrüktör etkilere sahip bu mediyatörlerin vasküler yataktaki direnci düzenlemesi ile sağlanır. Bu mediyatörler, hücre-hücre adezyonu, trombozis ve fibrinolizis gibi diğer endotel fonksiyonlarına da etkilidirler (30). Endotelden salınan bazı gevşetici faktörler ve etki mekanizması Şekil 1'de gösterilmiştir.



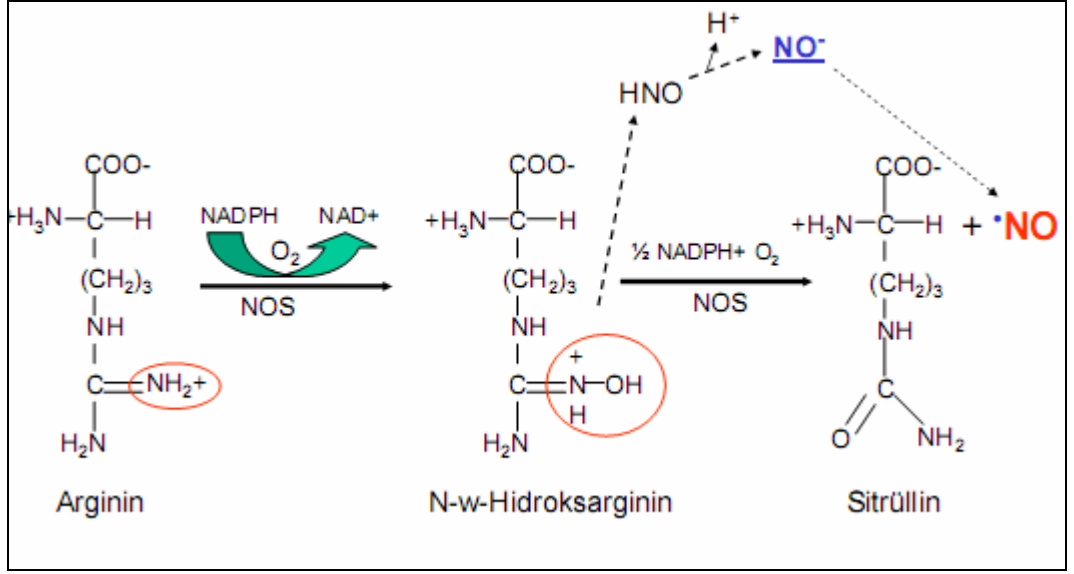
Şekil 1. Endotelden salınan gevşetici faktörler ve etki mekanizmaları (31).

2.1.1.1 Nitrik Oksit (NO)

NO, aminoasit L-argininden endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aracılığı ile endotel hücre yüzeyine uyarıya yanıt olarak üretilir (32). Bu enzim plazma membranında kaveoline tutunmuş şekilde kaveol içinde yerleşmiştir. İnaktif olan bu form, hücre içi kalsiyumun artışı sonucunda oluşan kalmodulinin kaveolinden ayrılarak aktif formuna dönüşür (33). Kalsiyumun artışı için uyarı, reseptör aracılı agonistler ile olur. Bu agonistlere örnek, asetilkolin, substans P maddesi ile “shear stress” gibi fiziksel uyarılardır. NO kolayca diffüze olabilen bir gazdır. NO hem damar lümenine hem de

çevredeki düz kas hücrelerine ve dokularına etkilidir. Çevredeki düz kas hücrelerine diffüze olan NO, guanilat siklaz aktivitesini arttırır ve sonucunda büyük miktarda siklik 3,5-guanosin monofosfat (cGMP) oluşur. Artan cGMP miktarı düz kas hücrelerinde, hücre içi kalsiyum düzeylerini azaltarak düz kas gevşemesini sağlar (34). N-monometil-L-arginin (L-NMMA) gibi arginin analogları NO üretimini yarışmalı olarak engelleyebilir. Bu madde insanlarda NO'nun fonksiyonlarının anlaşılabilmesi için çalışmalara olanak sağlamıştır. Örneğin, sağlıklı gönüllülerde brakiyal artere L-NMMA infüzyonu yapılarak önkolun kan akımında azalma görülmesi, bazal vasküler tonusun ayarlanmasında temel rol oynadığını göstermiştir (35). Ayrıca, benzer çalışmalar koroner ve pulmoner dolaşım ile ilgili olarak da yapılmış ve insanlarda kan akımının düzenlenmesinde endotelial NO üretiminin önemi gösterilmiştir (36,37).

NO biyoyararlanımında sentezini etkileyen faktörlerin yanında, yıkımı etkileyen faktörlerinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (38). eNOS aktivitesindeki değişiklik için temel kofaktör tetrahidrobiopterindir. Sağlıklı insanlarda, bu kofaktörün uygulanması NO üzerinde bir etki oluşturmazken, sigara içenlerde ve hiperkolesterolemisi olan insanlarda bu bileşiğin bozulmuş NO aktivitesini düzelttiği gösterilmiştir (39). NO aktivitesinin düzenlenmesinde potansiyel olarak önemli ve en ilgi çekici bileşik süper oksit (O_2^-) anyonudur.



Şekil 2. Nitrik oksidin NOS enzimi etkisiyle L-arginin aminoasidinden sentezlenmesi (40).

Süperoksit anyonları bazı reaksiyonlar sonucunda normal metabolizma ürünü olarak ortaya çıkabilir ve bu molekül diğer serbest radikallerle reaksiyona girebilir veya süperoksit dismutaz (SOD) tarafından hidrojen peroksit (H₂O₂) ve oksijene parçalanabilir. Stabil olmayan O₂⁻ ve NO molekülleri reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO⁻) bileşiğini oluşturur ve bu da diğer oksijen radikallerini meydana getirebilir. Bu bileşiğin yarı ömrünün kısa süreli olması nedeniyle bu yolun çalışılması güçtür ve farmakolojik olarak modüle etmek yetersizdir. Bazı araştırmacılar, SOD infüzyonu yaparak lokal yıkımını arttırıp, O₂⁻ düzeylerini düşermeye çalışmışlardır. Ancak bu yaklaşım sağlıklı koşullarda dirençli damarlarda NO aktivitesini düzenliyor gibi görünmemiştir. Son yapılan çalışmalarda; endotele bağlı süperoksit dismutaz (ecSOD) enzim aktivitesinin damarlarda NO bağımlı endotel fonksiyonu ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir. NO aktivitesinin azalması ve oksidatif stresin artması ile ilişkili hastalık durumlarında, SOD infüzyonu NO aktivitesini düzeltmez. Ancak böyle durumlarda bazı antioksidan tedaviler NO aktivitesini düzeltebildiğinden, bazı araştırmacılar çalışmacılar NO'yu reaktif oksijen radikallerinin inaktive ettiğini ileri sürmüşlerdir (41,42). NO'nun bu vasküler etkilerine ek olarak, ayrıca güçlü bir lökosit adezyonu ve trombosit aktivasyonunda bir inhibisyon yapmasıdır.

2.1.1.2 Prostaglandinler

Endotel hücreleri çeşitli prostaglandin (PG) moleküllerini üretebilir. Bu moleküllerin üretimi ve metabolizması, bulunduğu doku ile ilişkili olarak değişir. Prostaglandin (PGI₂) ve tromboksan A₂ (TXA₂) endotelin ürettiği başlıca prostaglandinlerdir. Hedef hücre yüzeyindeki spesifik reseptörüne bağlanan PGI₂, cAMP düzeylerini arttırarak vazodilatasyona yol açar. Ayrıca, PGI₂ güçlü bir trombosit agregasyon inhibitörüdür. TXA₂ ise vazokonstriktör ve trombosit agregasyonu yapıcı özelliği taşır. Normal fizyolojik koşullarda PGI₂'nin etkisi baskındır. Ancak bu fizyolojik durum bozulduğunda vazokonstriktör prostanooidlerin daha ön plana geçmesi olasıdır (43,44).

2.1.1.3 Anjiyotensinler ve Kininler

Renin-anjiyotensin sistemi (RAS), sistemik vasküler etkilerin yanında lokal vasküler kontrolün sağlanmasını da sağlar. Anjiyotensin II (A-II), damar duvarında anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) tarafından oluşturulur ve vazokonstriktör, protrombotik, oksidan ve aterojenik etkileri vardır. A-II aynı zamanda etki ettiği reseptör tipine göre tam tersi etkiler göstererek kendi etkisini dengeleyici özelliğe de sahiptir. Örneğin AT₁ reseptörünün uyarılması, endotel hücrelerinde NO ve vazodilatatör PG'nin salınımına yol açar. Buna karşın düz kas hücrelerinde ise vazokonstriksiyon, NADP/NADPH oksidaz sisteminin uyarılması ile O₂⁻ oluşumuna ve endotelin-1 salınımına yol açar. Ayrıca AT₁ reseptörleri, büyüme faktörlerinin salınımını arttırarak düz kas hücrelerinde hipertrofi ve proliferasyonu destekler. Bu durumda, fonksiyonel sağlıklı bir endotel anjiyotensinin fizyolojik etkilerini düzenlemektedir.

Bradikininin fizyolojik etkilerinin önemi, doku ADE konusundaki bilgiler arttıkça daha iyi anlaşılmıştır. Bradikinin; endotelden de salınan kininojenler üzerinden endotelial kallikrainden üretilir. İnsanlarda bradikinin endotel hücrelerindeki B₂ kinin reseptörlerine bağlanır ve vazodilatatör maddelerin salınımını sağlar. Bradikinin ADE tarafından metabolize edilir. ADE inhibisyonun, radyal arterde NO bağımlı

vazodilatasyonu arttırdığı çalışmalarda gösterilmiştir (45). Bu çalışmalar, ADE inhibitörlerinin bazı yararlı etkilerinin bradikinin üzerine olan etkilerinden dolayı olduğunu düşündürmektedir (45,46).

2.1.1.4 Endotelinler

Endotelinler (ET), parakrin aktivite ve güçlü vazokonstrüktör etkiye sahip üç peptid hormondan oluşmaktadır. İnsan endotel hücreleri endotelin-1 (ET-1) sekresyonu yaparlar. Sağlıklı insanlarda endotelin antagonistlerinin bazal düzeyde salınımı ile ön kol kan akımı artar (47). Sistemik düzeyleri kalp yetmezliğinde, hipertansiyon ve akut renal yetmezlikte artar. Selektif iki ET reseptörü alt tipi belirlenebilmiştir (ET_A ve ET_B). Endojen ET-1, ET_A aracılığı ile bazal koroner arter tonusunun sürdürülmesine katkıda bulunur ve ayrıca insanlarda koroner kollateral kan akımının düzenlenmesinde de önemli role sahiptir (48).

2.1.1.5 Endotel Kökenli Hiperpolarize Edici Faktör (EDHF)

Bu tanımlanamayan bileşiklerin temel özelliği düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyona yol açmalarıdır. Endotelyal düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyona yol açan, ancak arginin analogları veya siklooksijenaz inhibitörleri tarafından etkilenmeyen çeşitli maddelerin salındığı gösterilmiştir (49). Düz kas hücrelerinde kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarının inhibisyonu bu hiperpolarizasyonu ortadan kaldırır.

Sonuç olarak endotel bir çok sayıda güçlü lokal maddeleri üretebilmekte ve lokal kan akımını düzenleyebilmektedir. Dahası, bu faktörler direk olarak vasküler lümenin içinden salınır ve çevredeki lokal dokunun yanı sıra dolaşımdaki hücreleri de etkilerler.

2.1.2 Dolaşımdaki Hücre Fonksiyonunun Düzenlenmesi

Endotel, kan dolaşımındaki hücreler ile çevre dokular arasında ayırıcı bir yüzeydir. Yarı geçirgen olan membran, lokal aktif moleküller sentezleyerek veya dolaşımındaki hücrelere uygun tamamlayıcı yüzey reseptörleri sentezleyerek dolaşımındaki hücrelerin fonksiyonlarını düzenlemesine izin verir. Sağlıklı bir arterde lökositler, eritrositler ve trombositler endotele yapışmaz veya lokal dokulara göç etmez. Normal fonksiyon gören bir endotel, inflamatuvar hücrelerin doku hasarının olduğu bölgelere göçünü düzenler. Fakat bu mekanizmanın anormal çalışması, aterosklerozun erken lezyonlarının oluşumuna katkıda bulunabilir (Lefer 1996). Hücre-hücre adezyonu 3 ana hücre adezyon molekül ailesi arasındaki ilişkilere bağlıdır.

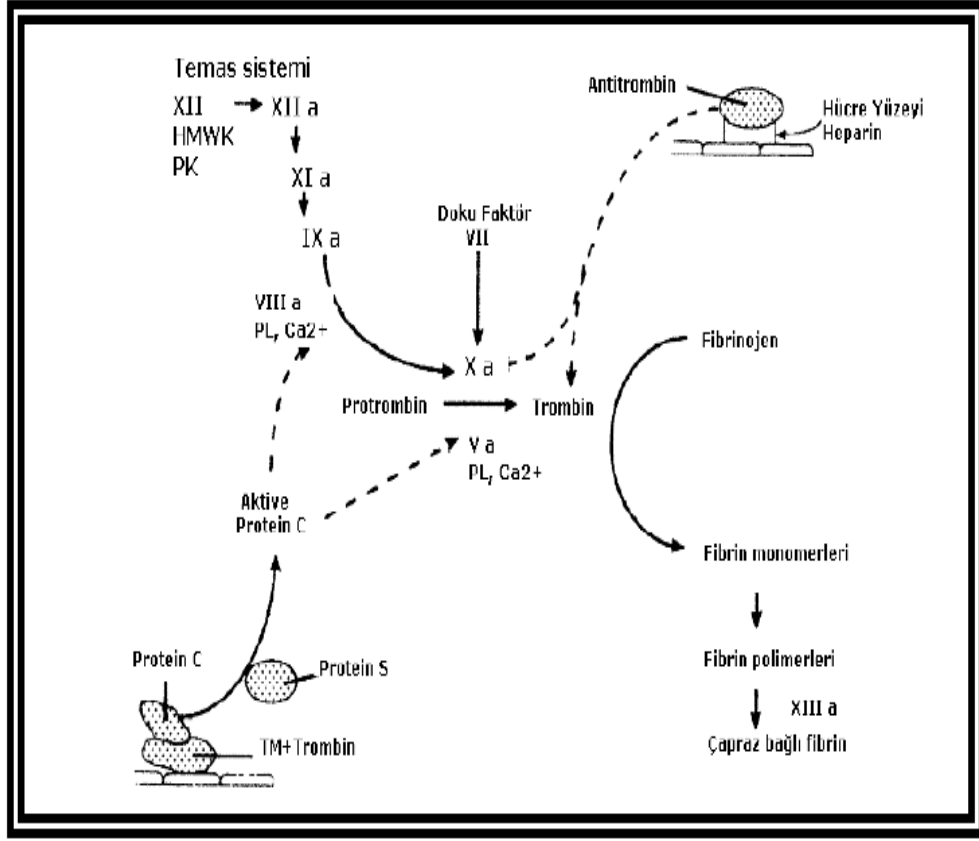
Selektinler; glikoproteinlerdir ve hücreler arasındaki etkileşimin erken döneminde rol alırlar. P-selektin muhtemelen en önemlisidir. P selektin, trombositlerin α - granüllerinde ve endotel hücrelerinin Weibel-Palade cisimciklerinin içinde bulunur. Endotel aktivasyonu ile hücre yüzeyinde hemen eksprese olur ve dolaşımındaki nötrofil ve trombositlere karşı reseptör olarak bağlanır. Bu bağlanma zayıf bir reaksiyondur ve hücre yuvarlanmasına yol açar. Dolaşımındaki hücrelerin yüzeyinde bulunan β 2-integrinler, endotel hücre yüzeyindeki immunoglobülin süper ailesi grubundaki adezyon moleküllerine bağlanarak daha güçlü bir bağlantı meydana getirir. İmmunoglobülin süper aile adezyon molekülleri (ICAM-1 ve PECAM-1) endotel hücre yüzeyinde artar ve lokal kemotaktik faktörler endotele doğru hücre göçünü kolaylaştırır. Tümör nekrotizan faktör (TNF α ve TNF γ), IL-1 ve IL-4 gibi sitokinler endotel hücreleri üzerine etki eder ve onları proadheziv hale getirirler. Böylece endotel; trombosit, lökosit ve monosit gibi dolaşımındaki hücrelerin göçünü düzenler. NO'nun da in vitro olarak endotel hücre yüzeyindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (50). Bu adezyon molekülleri kan dolaşımına salınır ve sistemik lupus eritematozus ve akut sepsis gibi endotel hücre hasarı ile ilişkili hastalıklarda serumdaki düzeyleri artar ve genellikle kandaki düzeyleri hastalık sonuçları ile ilişkilidir. Gerçekte giderek artan epidemiyolojik veriler; bazı adezyon moleküllerinin veya bunların ekspresyonunu uyaran sitokinlerin sağlıklı insanların serumunda artmış olarak saptanmasının kardiyovasküler riskin belirlenmesinde yardımcı olabileceğini göstermiştir (51).

Endotel ile dolaşımındaki hücreler arasında adezyonun düzenlenmesinde endotelin

yanı sıra dolaşımdaki hücreler tarafından salınan araçlar da rol oynar. Trombosit agregasyonu sırasında trombositler ET-1, von Willebrand faktörü (vWf) gibi prokoagülan ve vazokonstrüktör maddelerin salınımı için endoteli uyarırlar. NO, trombosit aktivasyonu ve agregasyonunu inhibe edebilir. Trombosit yüzeyindeki P-selektin ekspresyonunu azaltabilir ve fibrinojenin çapraz bağlanması için gerekli olan $\beta 2$ integrin proteini glikoprotein IIb-IIIa'nın yapısal değişimini inhibe edebilir (52). Sağlıklı endotelde hem NO hem de PGI₂ trombosit aktivasyonunu inhibe edebilir ve bu özellik endotelin NO üretimini azaldığı durumlarda değişebilir (53).

2.1.3 Koagülasyon ve Fibrinolizisin Düzenlenmesi

Trombüs oluşum süreci dolaşımdaki trombotik ve fibrinolitik faktörler arasındaki dengeye bağlıdır (54). Aterosklerozun ilerlemesinde tromboz oluşumu temel rol oynamaktadır. Tromboz akut arteriyal tıkanma neticesinde akut koroner sendrom oluşumuna neden olur. Trombüs oluşum süreci birden çok reaksiyonu içerir. Primer hemostazda, ilk önce platelet agregasyonu oluşur ve daha sonra trombin üretimi ve fibrin oluşumuna neden olan koagülasyon basamaklarının aktivasyonu ile sonuçlanan bir dizi reaksiyonlar başlar (Şekil 3). Bu süreçte endotel birçok bölümde düzenleyici rol oynar.



Şekil 3. Klinik olarak önemli koagülasyon reaksiyonlarının bazılarının özeti (31).

Endotel hücreleri vWf, fibronektin ve trombospondin gibi molekülleri sentezler. vWf, trombositleri subendotelyal matrikse ve diğer trombositlere bağlayan yapıştırıcı görevi görür. Fibronektin, fibrin monomerlerini çapraz bağlar ve trombospondin ise lokal fibrinolizisi azaltarak platelet agregasyonunu destekler. Bu form primer hemostatik cevabın oluşturulmasında önemli bir paya sahiptir.

Sağlıklı endotel antikoagülan bir membran görevi görür. Trombin, fibrinojenin fibrine dönüşümünde temel moleküldür. Koagülasyon kaskadındaki diğer enzimlerin aktivasyonunda olduğu gibi trombinin aktive edilmesinde de endotel en önemli düzenleyicidir (55). Bu enzimlerin birçoğu serin proteazlardır ve endotel de bir serin proteaz olan antitrombin üretir. Bu rölatif olarak zayıf bir moleküldür, ancak endotel yüzeyine eksprese olan heparin benzeri moleküllerle aktivitesi artar. İkinci endotelyal

antikoagulan yolu da protein C sistemidir. Endotel hücreleri trombomodulin reseptörü ile trombine bağlanır. Sadece endotel hücrelerinde bulunan reseptöre trombin bağlanınca, protein C aktivasyonu ile koagülasyon kofaktörleri parçalanır ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) inaktive olur. Endotel hücreleri ayrıca, doku faktörü yolu inhibitörleri aracılığı ile ekstrensek yolu da inhibe ederler.

Fibrinolitik yol, fibrini yıkar ve pıhtı oluşumunu azaltır. Dolaşımdaki kanın fibrinolitik aktivitesini doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve PAI-1 arasındaki denge belirler. tPA, plazminojeni plazmine dönüştürür ancak PAI-1, tPA aktivasyonunu inhibe eder. tPA endotelden devamlı bazal düzeyde salgılır ve hızlıca aktive olan sekretuar depoları da vardır. Normal şartlar altında endotel çok az miktarda PAI-1 üretir.

Son çalışmalar, fibrinolitik aktivitenin ve lokal koagülasyon düzenlenmesinde bradikinin ve NO gibi endotel kaynaklı mediyatörlerin rolü olduğunu göstermiştir (56,57).

2.2 Seks Hormonları

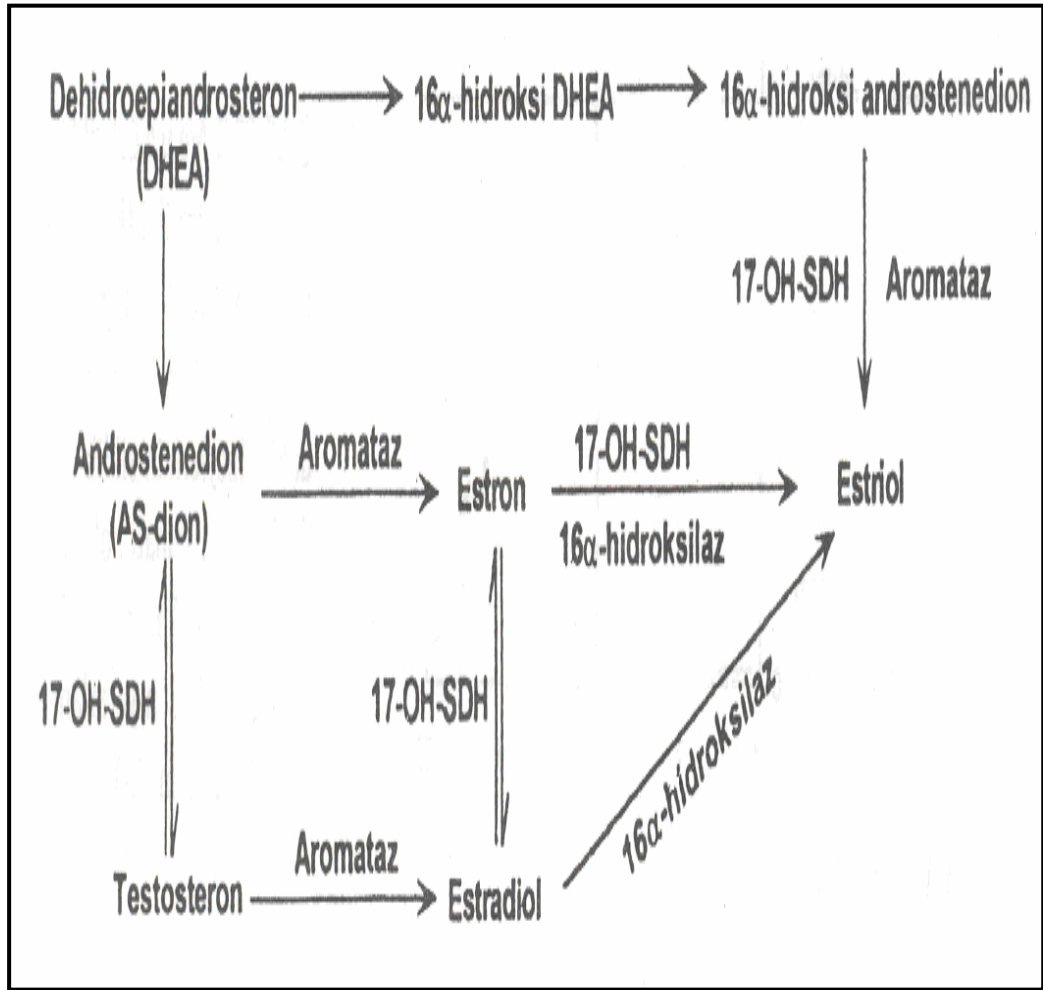
2.2.1 Estrojen

Doğal estrojenler estradiol, estron ve estriol'dur. Estradiol kadınlarda estrojenik etkiden sorumlu ana hormondur. Estradiol etki gücü en yüksek olan doğal estrojendir. Vücutta kısmen estrona dönüşür. Dönüşüm iki yönlüdür; bu nedenle estron aynı zamanda estradiolün ana prekürsörüdür. Bunlardan oluşan estriol'ün estrojenik etkinliği daha zayıftır. Estrojenler diğer steroid hormonlara oranla daha küçük dozlarla etki oluştururlar. Tablo 1'de kadınlarda günlük üretilen seks hormon miktarı verilmiştir.

	Reprodüktif mg/gün	Postmenopozal mg/gün	Ovaryunları Alınarlarda mg/gün
Estrojen	0.350	0.045	0.045
Dehidroepiandrosteron	6-8	1.5-4	1.5-4
DHEA-S	8-16	4-9	4-9
Androstenedion	2-3	0.5-1.5	0.4-1.2
Testosteron	0.2-0.25	0.05-0.18	0.02-0.12

Tablo 1. Seks hormon miktarları

Seks hormonları plazmada albümine ve seks hormon bağlayan globuline (SHBG) bağlanarak taşınırlar. SHBG karaciğerde yapılır ve sentezi estrojenler tarafından arttırılır, artma sentez yapan enzimlerin indüksiyonu sonucu meydana gelir. Estrojenler, SHBG'e yüksek afiniteli bir şekilde bağlandıkları halde, albümine gevşek bir şekilde bağlanırlar. Ancak albümin SHBG'e göre çok daha yüksek kapasiteli bağlanma yeridir. Estradiol ve estron karaciğer hücrelerinde iki yönlü bir reaksiyon ile birbirlerine dönüştürülür. Estradiol'ün estrona dönüşümünü sağlayan enzim 17- β hidroksteroid dehidrogenazdır. Estradiol ve estronun karaciğer ve bazı diğer dokularda oluşan en önemli metaboliti estriol'dür. Bu dönüşüm 16- α hidrosilaz enzimi ile 16-hidroksiestron üzerinden olur. estradiol ve estronun estriole dönüşümü bunların estrojenik etkinliğini önemli ölçüde azaltır. Estradiol, estron ve bunlardan oluşan estriol, karaciğerde sülfirik asit ve glukronik asitle konjuge edilerek inaktif duruma getirilir. Bu konjugatların bir kısmı safra içinde itrah edilir, fakat safra içinde ince barsağa giden konjugatlar enterohepatik sıklusa girerler. Konjugatların kalan kısmı böbreklerden idrar içinde atılır (58). Estrojen sentezi şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. Estrojen Sentezi (59)

2.2.1.1 Estrojenin Etkileri

2.2.1.1.1 Estrojenin Seks Karakteristikleri ve Genital Kanal Üzerine Etkileri

Estrojen kadınlarda memelerin büyümesi, kalça ve uyluklarda yağ toplanması ve kadımsal davranışların ve libido artışını sağlar (58). Estrojen pubertede uterusun büyümesini, menstrüel siklusun ilk yarısında endometriyum hücrelerinde proliferasyonu ve uterus kontraktilesini artırır, vajinada epitelin kalınlaşmasını ve keratinizasyonunu sağlarlar, hücrelerin glikojen içeriğini ve vajina ortamını asitleştirir, vaskülaritesini

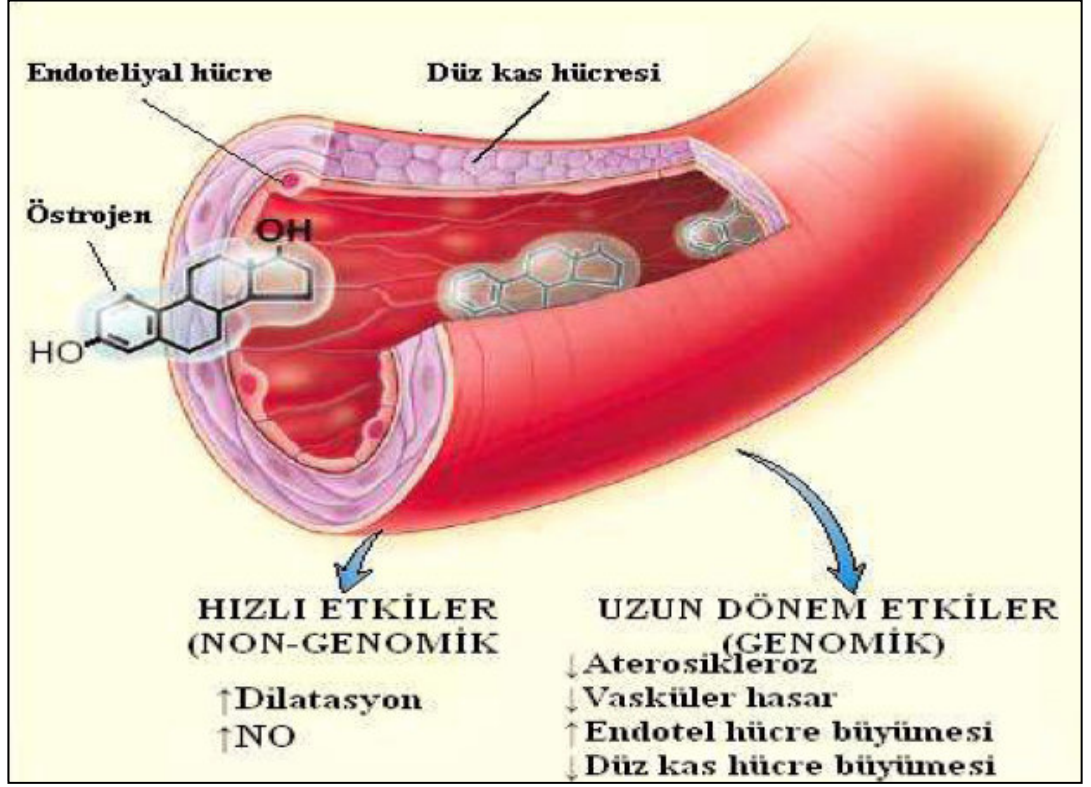
arttırır (58).

2.2.1.1.2 Estrojenin Kemik ve Metabolizma Üzerine Etkileri

Estrojenler, kemik matriksinin normal şekilde sürdürülebilmesi ve matrikste Ca^{2+} çökmesi için gereklidirler ve kemikte Ca^{2+} rezorbsiyonunu inhibe ederler. Östrojenler HDL ve VLDL sentezini artırırken LDL sentezini inhibe eder, total kolesterol düzeyini düşürür, safranin kolesterol içeriğini, protein sentezini, koagülasyon faktörlerinin sentezini artırır (II, VII, IX, X). Ayrıca su ve tuz emilimini artırır. Estrojenler Antitrombin III sentezini azaltırlar (58).

2.2.1.1.3 Estrojenin Damar Fonksiyonları Üzerine Etkileri

Klinik ve deneysel çalışmalar estrojenlerin YDL'yi arttırdığını ve DDL'yi azaltarak lipoprotein profilini iyileştirdiğini göstermiştir. Bununla beraber deneysel aterosklerozda, damar duvarında yağ çizgisi birikimi dolaşımdaki kolesteroldeki bu değişiklikler olmasa bile önlenebilmektedir. Estrojenlerin dolaşımdaki lipoproteinlere yararlı etkileri aracılığıyla vasküler koruyucu etkisi, damar üzerine etkinin küçük bir kısmını oluşturur. Buna göre son çalışmalar östrojenin damar duvarındaki direk etkisini göstermektedir (60) (Şekil 5).



Şekil 5. Estrojenin endotel hücresi üzerinde genomik ve non-genomik etkileri (61).

Estrojenin damar düz kas hücresinde alfa ve beta reseptörü vardır. Estrojen reseptörleri klasik olarak hücre nükleusu içinde bulunan ligand aktive edici transkripsiyon faktörleri olarak düşünülür ve hormon bağlanmasına yanıt olarak oluşan gen ekspresyonunu düzenler. Bu mekanizma genomik etki olarak adlandırılır ve dolaşımdaki lipidler ve koagülasyon faktörlerinin düzeyleri gibi estrojenin uzun dönem etkinin oluşmasında rol oynar. Estrojen reseptörlerinin ayrıca hızlı oluşan etkileride vardır (62). Bu etki gen ekspresyonu değişikliklerine bağlı olmaması nedeniyle non-genomik etki olarak adlandırılır. Estrojenin bu hızlı etkileri kaveola denilen hücre membran iletiminde yerleşen estrojen reseptörlerinin aracılığıyla olur.

2.2.1.1.4 Estrojenin Endotel Üzerine Etkileri

Endotelin koruyucu rolü NO salınımına bağlıdır. NO, trombosit agregasyonunu önler ve damar düz kas hücrelerini gevşetir. 1980'lerin sonlarında Gisclard ve

arkadaşları östradiolün, tavşan arterinde endotelden kaynaklanan NO'nun etkisini güçlendirdiğini göstermiştir (63). Bununla beraber endotel hücrelerine estradiolün uzun süre maruziyeti sonucunda NO'nun yarı ömrü uzamıştır. Bunun nedeni endotelial süperoksit anyonunun azalmasıdır. Çünkü bu reaktif oksijen radikali, NO'nun temel inaktivatörüdür. Estradiol süperoksit anyonunu azaltarak, NO yıkımını azaltır (64). Endotelial bütünlüğün önemi hiperkolesterolemik hayvan modellerinde endotelin soyulmasını takiben aterosklerotik lezyonların hızlanması ile gösterilmiştir (65). Bunun yanında tekrarlayan mekanik ve/veya immünolojik hasarlara endotelin morfolojik ve fonksiyonel değişiklikleri katkıda bulunmaktadır.

Estrojenlerin, tüm hayvan modellerinde yağ çizgisi oluşumunu önlediği gösterilmiştir. Yağ çizgisi estradiol ile tedavi edilen farelerde 3-4 kat daha azdır. Estrojenler endotel disfonksiyonunu önleyebilir hatta geriye döndürebilir. Yağ çizgisinin ilerlemesinde ve yapımında immüno-inflamatuar sistemin rolü incelenmektedir. Bunun için monosit-makrofaj birikimi kesinlikle gereklidir ve immün sistem bu süreci hızlandırır. Estrojenlerin yararlı etkisi T ve B lenfositleri eksik olan farelerde gösterilememiştir, bu da immün sistemin önemli etkisini göstermektedir (66).

Aterosklerotik süreç üzerine estrojenin etkisi, büyük oranda bulunan vasküler patolojinin durumuna bağlıdır. Aterosklerozun olmadığı veya erken belirtilerinin olduğu damarlarda, estrojen aterosklerotik lezyonların ilerlemesini ve gelişmesini önler gibi görünmektedir. Estrojenin total kolesterol ve LDL kolesterolü düşürerek, antioksidan ve vazodilatatör etki aracılığı ile kardiyovasküler sistemde geniş çaplı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Estrojenin ayrıca transkripsiyonel endotelial NO sentaz düzenlemesi ve NO salınımını uyarması aracılığı ile direk ateroprotektif etkisi vardır. Bu endotelial fonksiyonu iyileştirir, vazodilatasyonu artırır ve hasara karşı kan damarlarının yanıtını önler. Bundan başka, estrojen aterosklerozun erken evrelerinde rol oynayan birkaç proinflamatuar molekülü azaltır (67).

2.2.1.2 Postmenopozal Hormon Tedavisinde Kullanılan Ajanlar

2.2.1.2.1 Oral Estrojenler

Gastrointestinal sistemde hızlı inaktive olduğu için kullanılmayan doğal östradiolün, 17. karbonuna etinil grubu eklenerek elde edilen formu 17-beta estradiol suda çözünmekte ve emilimi artmaktadır. Oral alımı takiben portal sistemdeki estrogen konsantrasyonu periferdekinden dört-beş kat daha yüksektir. İlk geçiş etkisi nedeniyle karaciğerde yüksek seviyelere ulaşan estrogenler karaciğerdeki protein bağlayan globülinler, pıhtılaşma faktörleri, renin substrat ve trigliserid artışı gibi bazı proteinlerin sentezinde artış meydana getirir. İlkgeçiş etkisi nedeniyle karaciğerde yüksek konsantrasyonları lipid profili üzerine olan olumlu etkilerini sağlar (hepatik lipazı azaltarak). Oral uygulamanın lipid profiline olumlu etkisi, geniş seçeneklerin bulunması, maliyet ve kullanım kolaylığı gibi avantajları vardır. Bunun yanında ilaçların emilimlerinin farklı olması, yüksek doz ilaca ihtiyaç, karaciğerde bazı proteinlerin sentezini değiştirmesi, safra taşı oluşumunu arttırması gibi dezavantajları da mevcuttur. Sentetik estrogenler metabolik yan etkileri ve uzun yarılanma ömürlerinden dolayı postmenopozal hormon replasman tedavisinde kullanılmamaktadır.

2.2.1.2.2 Transdermal Estrojenler

17-β estradiol'ün etanoldeki çözünmüş solüsyonunu içeren rezervuar sistemidir. Bu sistem daha stabil bir serum düzeyi sağlar. Direk dolaşıma karışarak karaciğerden ilk geçiş metabolizması olmaması nedeniyle pıhtılaşma faktörlerini arttırmaz. Vazomotor semptomlar, kardiyovasküler semptomlar ve kemik metabolizması üzerine oral kullanım kadar etkindir.

2.2.1.2.3 Transvajinal Estrojenler

Temel kullanım amacı ürogenital atrofidir. Sistemik etki göstermeyebilir. Bir miktar vajen epitelinden emilerek sistemik dolaşıma ulaşır. 0.625 mg/gr konjuge estrogen ya da 0.1 mg/gr 17-beta estradiol içeren preparatler mevcuttur.

2.2.1.2.4 Perkutanöz Estrojenler

Perkutaneal estrojen uygulamalarında hidroalkalik jel yapıları içinde günlük ortalama 1,5- 3 mg dozlarında 17-beta estradiol kullanılmaktadır. Perkutaneal östrojen alt abdomen, kol ya da omuz sahalarına sürülerek uygulanmaktadır.

2.2.1.2.5 Subkutaneal Estrojen Preparatları

Cerrahi işlem ile cilt altına yerleştirilen implantlardır. Yüksek serum düzeyinin sağlanmasına olanak verir. 25, 50 veya 100 mg 17-beta estradiol içeren preparatlar mevcuttur. Karaciğerden ilk geçiş etkisi göstermeden sistemik dolaşıma geçerler.

2.2.1.2.6 İntranazal Sprey Estrojenler

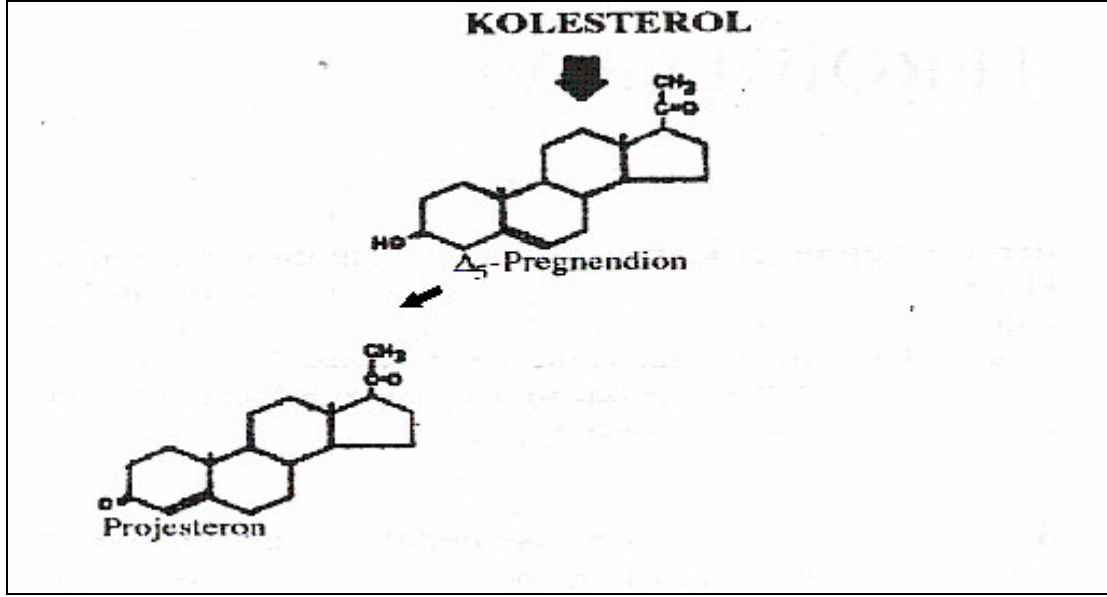
Nazal östrojen uygulamaları günde bir-iki doz olarak 200-300 mg'lık 17-beta estradiol içeren spreyleyler kullanılmaktadır. Uygulamadan sonra serum estradiol düzeyleri hızla yükselip kısa sürede değerler normale düşmektedir.

2.2.2 Progesteron

Progesteron ve onun gibi etki yapan ilaçlara progestinler veya progestagenler adı verilir. Günümüzde progestin, progesteron benzeri etki yapan sentetik steroidal ilaçlar için genel ad olarak kullanılır.

Bütün steroidlerin öncülü olan kolesterol dolaşımdaki lipoproteinlerden sağlanabileceği gibi endojen olarak asetattan da sentezlenebilir. Tüm steroidlerin sentezi için ön madde asetattır (68). Kolesterolde yan zincirin kırılması ve oksidasyonu sonucu pregnenolon oluşur. Pregnenolondan da diğer steroidler üretilir. Steroid hormonların biyosentezinde kolesterolün pregnenolona dönüşmesi hız kısıtlayıcı basamağı oluşturur.

Kolesterolün steroid hormonlara dönüşebilmesi için mitokondri ve endoplazmik retikulumda bir dizi enzimatik modifikasyondan geçmesi gerekir. Bu enzimlerin çoğu sitokrom P-450 oksidazlar grubundandır. Steroid hormon sentezi için en az 6 ayrı P-450 enzimi gerekmektedir (69).



Şekil 6. Progesteron Sentezi (59)

Progesteron plasmada bir transport proteini olan transkortine kısmen bağlanmış olarak bulunur, transkortin plasmada kortikosteroid hormonları da bağlar. Progesteron karaciğerde ve ince barsak mukozasında hızlı bir şekilde metabolize edilir. Oral biyoyararlanımı yaklaşık % 25 dir. Eliminasyon yarılanma ömrü bireysel farklılık göstermesine karşılık 19-95 dakika arasındadır. Karaciğerdeki metabolizması A halkasının indirgenmesi, hidrosilasyon ve konjügasyon suretiyle olur. Başlıca metaboliti pregnandioldür. Diğer metabolitleri 5α -pregnandion ve 20α -dihidroprogesterondur, bunlar zayıf progesteron benzeri etki gösterir. Pregnandiol başlıca glukronik asitle konjüge edilir ve bu şekilde böbrekten idrara atılır. Progesteron fazla lipofilik hormon olduğundan kısmen yağ dokusunda depo edilir (70).

İnsanda PrA ve PrB adlı tanımlanan 2 reseptörü mevcuttur. Progesteron spesifik

olarak bu reseptörlere bağlanır. Yeni sentezlenen progesteronun selektif etki profili oldukça değişkendir. Progesteron androjen, östrojen ve mineralokortikoid gibi diğer steroid reseptörlerle de etkileşir. Diğer reseptörlerle etkileşim selektif progesteron yanıt profilini oluşturur (70). Progesteronlar çeşitli reseptörlere bağlanırlar. Bu bağlanma güçleri birbirinden farklıdır. Östrojenik androjenik güçleri ile reseptörlere bağlanma afinitesi arasında her zaman korelasyon yoktur.

2.2.2.1 Progesteron Etkileri

2.2.2.1.1 Progesteronun Over ve Uterus Üzerine Etkileri

Ovülasyondan sonra oluşan korpus luteuma paralel olarak progesteron salgılanması artar. Siklusun ikinci yarısında salgılanan progesteron, endometriyumda mitotik etkinliği süprese eder, kalınlaşmayı durdurur. Zigot oluşmuşsa; progesteron T lenfositlerini inhibe ederek implantasyon yerinde zigota ve ileride ondan oluşan embriyoya karşı immünolojik red reaksiyonunu önler. Vajinada epitelin kalınlaşmasını ve keratinizasyonunu sağlarlar. Uterus düz kas hücrelerini inhibe ederek gevşetir. Gebeliği sürdürülmesinde bu yüzden çok önemlidir (58).

2.2.2.1.2 Progesteronun Metabolik Termojenik Etkileri

Böbrek tubuluslarında aldosteronu kısmen antagonize etmesine bağlı olarak natriüretik ve diüretik etki yapar. DDL'yi, iştahı ve insülin salgısını artırır. lipoprotein lipaz aktivitesini artırır. Zayıf katabolik etki yapabilirler. Hipotalamusta termoregülatör merkezi etkiler, menstrüel siklusun ikinci yarısında sıcaklığın 0.5 °C yükselmesine neden olur (58).

2.2.2.1.2 Progesteronun Kardiyovasküler Etkileri

Progesteronlar postmenopozal dönemde tek başlarına kullanılmamaktadır.

Progesteronların kullanım amacı estrojenin özellikle endometriumdaki etkilerini karşılamaktır. Estrojen, progesteron ile birlikte kullanılmadığı takdirde %20-30 oranında hiperplaziye neden olur ve endometrium kanseri riskini yaklaşık 2,8-8 kat artırır. Ancak progesteron ilave edildiği zaman bu risk, replasman kullanmayan kadınlarla aynı düzeye ve hatta daha alt seviyelere düşer (71,72). Progesteronun endometriumdaki antiestrojenik etkisinin şu mekanizmalarla gerçekleştiği öne sürülmüştür (71). Hücrelerdeki estrojen reseptör sayılarını azaltır, hücre içinde 17-hidroksisteroid dehidrogenaz ve sülfotransferaz enzimlerini aktive ederek estradiol'ün estrona dönüşümünü artırır, bu etkilerle birlikte hücrenin mitotik aktivitesini azaltır.

Estrojen-progesteron kombinasyonu, estrojenin kardiyovasküler hastalıklar üzerine varsayılan olumlu etkilerini, olumsuz yönde etkilediği konusunda sorunlar doğurmuştur. Gerçekte, birkaç çalışmada progesteronların estrojenlerin faydalı etkisini önlediği gösterilmiştir. Özellikle YDL lipoproteinlerdeki artışı etkilediği PEPI (Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions) çalışmasında gösterilmiştir (73). Adams ve arkadaşları (74), ooforektomili maymunlarda ateroskleroz üzerine farklı progesteron türleri ile kombine estrojenlerin etkilerini araştırmıştır. Koroner plak boyutunun sonlanım noktası olan çalışmada, tedavi edilmeyen grup ile karşılaştırıldığında, 17-beta estradiol veya konjüge estrojenler tek başına ateroskleroza azaltmaktadır. Eklenen progesteronun çeşidine göre estrojenlerin faydaları korunmakta veya ortadan kalkmaktadır. Clarkson ve arkadaşlarının (75), endotel fonksiyonunu asetil koline koroner arter cevabı olarak değerlendirdikleri çalışmalarında, aterosklerotik ooforektomili maymunlarda, tek başına konjüge estrojen uygulamasının, estrojen-progesteron kombinasyonuna göre üstün bulmuşlardır. Diğer bir deyişle, konjüge estrojenin iyileştirme özelliğini estrojen-progesteron uygulaması kısmen önlemektedir.

2.2.2.2 Progesteron preparatları

2.2.2.2.1 Progesteron ve türevleri preparatları

- Progesteron: Ağızdan alındığında sistemik biyoyararlanımı karaciğerde ilk-geçiş

eliminasyonuna uğraması nedeniyle düşüktür. Bundan dolayı mikronize şekildeki projesteron, ağızdan parenteral dozuna göre yüksek miktarda kullanılabilir.

- Hidroksiprojesteron kaproat (heksanoat): Haftada bir veya iki haftada bir, 125-250 mg dozunda i.m injekte edilir.

- Medroksipojesteron asetat: Projesteronun metilasetoksi türevidir. Karaciğerde yavaş inaktive edildiği için ağız yolundan etkilidir. Yerine koyma tedavisi için ağızdan günde 2.5 mg dozunda verilir. Günde 5-10 mg veya daha fazlası suprafizyolojik doz sayılır ve bu dozlarda MPA plazmada LH, estradiol ve projesteron düzeyini doza bağımlı bir şekilde düşürür.

- Jestonon kaproat: Endometriyum, prostat ve ilerlemiş meme kanserine ve prostat adenomuna karşı haftada bir i.m injeksiyon suretiyle kullanılabilir (58).

2.2.2.2.2 Testosteron türevi sentetik projestiner

- Noretindron (noretisteron): 19-Nortestosteron türevi olan bir projestindir. Zayıf androjenik, anabolik ve estrojenik etkisi vardır. Ağızdan günde 5-40 mg dozunda kullanılır.

- Didrojenteron: Projesteronun bir izomerinin dehidro şeklidir. Dismenore ve premenstrüel gerginlik tedavisinde kullanılır. Mestranol, etinil östradiol'ün 3-metil türevidir. Oral kontrasepsiyon için kullanılır.

- Alilestrenol: 19-Nortestosteron türevi bir projestindir. Ağızdan günde 5-20 mg dozunda kullanılır.

- Norjestrel: Rasemik şekli ve levonorjestrel izomeri ilaç olarak kullanılır. Oral kontraseptif müstahzarlarına katılırlar.

- Dezojestrel: Gravimetrik etki gücü çok yüksek olan norjestrel türevi projestindir. Ovulasyonu stabil bir şekilde suprese etmek için gereken en düşük günlük dozu sadece 60 µg'dır.

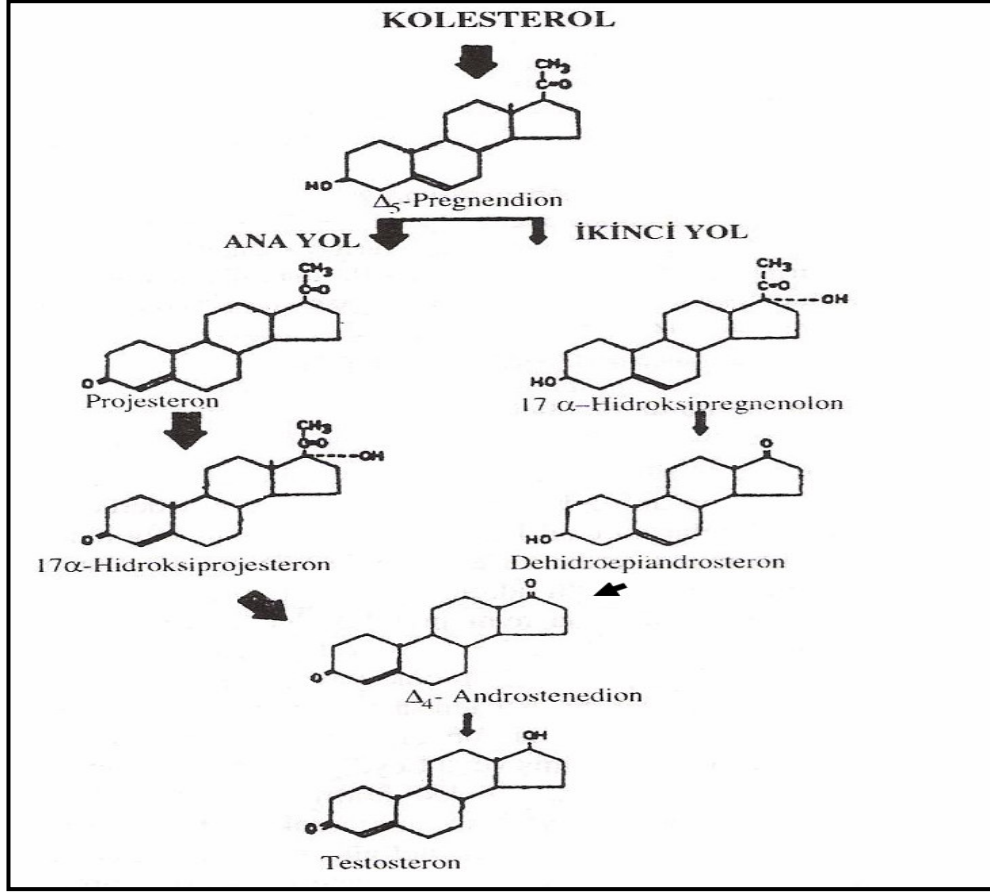
- Jeston: Gravimetrik olarak en güçlü sentetik projestindir. Kombine oral kontraseptif haplar içinde günde 75 µg dozunda kullanılır (58).

2.2.3 Androjenler

2.2.3.1 Genel Özellikler

Testosteron, androstenedion, dihidrotestosteron (DHT), dehidroepiandrosteron (DHEA) gibi erkek cinsiyet hormonlarını içeren hormon topluluğuna androjenler denir. Erkeklerde androjenler testisler ve adrenal korteks hücrelerinde sentezlenir (58). Erkeklerde testosteron başlıca testisin Leyding hücrelerinde sentezlenir. Testosteron erkekte birincil ve ikincil seks özelliklerinin gelişmesinden sorumludur. Diğer steroid hormonlar gibi testosteron da sentezlendiğinde hemen plazmaya salınır ve salgılandıktan sonra hemen tamamı taşıyıcı proteinlere bağlanır, az bir kısmı ise serbest olarak kalır. Birçok biyokimyasal parametrede olduğu gibi testosteronun biyolojik aktif olan kısmı serbest olanıdır. Testosteron bağlayan üç proteinden biri; ona sıkı bir şekilde bağlanan, karaciğerde sentezlenen ve bir glikoprotein olan seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG), diğerleri daha zayıf bağlanan albumin ve kortizol bağlayıcı globulindir (Bond 1987). SHBG'e sıkı bir şekilde bağlanan testosteron kanda 30 dakika ile bir saat kadar taşınır. Bu geçen süreden sonra ya hedef dokuya girer, ya da yıkım ürünlerine parçalanarak metabolize edilir (58).

Androjenler, kolesterolden sentezlenirler. Kolesterolden ilk pregnenolon meydana gelerek sentezleme zinciri başlar. Direk olarak asetil Ko-A'dan da sentez edilebilirler (77). Androjenler 19 karbon atomlu steroid yapıda olan bileşiklerdir. Testosteron bu topluluk içinde miktar olarak en fazla olanıdır. En etkili olanı ise hedef dokularda testosterondan dönüşümü yapılan DHT'dur. Etkileri azdan çoğa doğru DHEA, androstenedion, testosteron ve DHT'dur (78). Testosteronun DHT'a dönüşümü, hücre sitoplazmasında ve nükleus membranında bulunan NADPH bağımlı 5 α -redüktaz tarafından gerçekleştirilir. Bu dönüşüm sonucu testosteronların % 4'ü DHT'a dönüşür. Testosteron çizgili kaslar, merkezi sinir sistemi ve kemikler gibi bazı hedef hücrelerde değişimsizlik etkinlik gösterebilmektedir (58).



Şekil 7. Testosteron Sentezi (59)

Testosteron, leydin (interstisyel) hücrelerinde sentezlenir. Bu oluşum ön hipofiz hormonu luteinleyici hormon (LH)'un etkisi altındadır. Testosteron, Santral Sinir Sistemine girebilir ve orada negatif "feed-back" etkisi ile hipotalamustan gonadotropin salıverici hormon (GnRH) salınımını baskılayabilir. Testosteronun ayrıca LH üzerinde de negatif feed-back yapabilme etkisi vardır (77). DHEA ve androstenedion, adrenal korteksten en fazla salınan androjenik maddelerdir. Androjenlerin bir kısmı hedef hücrelerde ve yağ dokusunda aromataz enzimi tarafından östrojenlere çevrilir. Testosteron'dan östradiol ve androstenedion'dan östron oluşur.

Dolaşımdaki testosteron üç fraksiyon halinde bulunur: serbest testosteron (totalin % 2'sini oluşturur), albumine bağlı testosteron (totalin yaklaşık % 40-60'ı) ve SHBG'e bağlı testosteron (totalin yaklaşık % 40-60'ı). Testosteron albumine çok gevşek bağlandığı için kolayca ayrılıp biyolojik olarak aktif işlevlerde görev alabilir (58). Bu

nedenle, albumine bağlı testosteron ile serbest testosteron birlikte biyolojik olarak aktif testosteronu oluştururlar. Öte yandan testosteron SHBG ile çok sıkı bağ oluşturduğu için bu şekli ile biyolojik bir aktivite gösteremez (79).

Erkek (pg/mL)	Yaş	Kadın (pg/mL)
8,8-27	20-39	0.06-2,57
7.2-23	40-59	0.04-2.03
5.6-19	60-80	0.03-1.55

Tablo 2. Serbest Testosteron Düzeyleri

Androjenlerin aromataz ile aromatzasyonu sonucu östrojenler oluşur. Erkeklerde östrojenin ana kaynağı adipoz dokudaki aromataz aktivitesidir (80). Dolaşımdaki östronun % 5'inden azı ve östradiolün % 15'i testislerden direkt olarak sentezlenmektedir. Geri kalan östradiol testosterondan, östron ise adrenal androjenlerin (androstenodion) ekstraglandüler periferik aromatzasyonu ile sentezlenmektedir. Aromataz aktivesi olan dokular, meme dokusunu oluşturan stromal hücreler, plasenta, over, testis, beyin, deri fibroblastları ve yağ dokusudur. Erkeklerde testisten sentezlenen testosteronun aromatzasyonu ile östradiol sentezlenirken yağ dokusundaki aromataz aktivitesi ile androstenodiondan östron sentezlenmektedir (80).

Seks hormon bağlayan globülin (SHBG), steroid hormonları bağlayan bir plazma glikoproteinidir ve bu hormonların taşınmasından sorumludur. SHBG iki monomerden oluşmuş olmasına karşın androjenler ve östrojenler için tek bir bağlantı noktası içeren bir glikoproteindir. Daha çok karaciğerde hepatositler tarafından sentezlenen SHBG meme, endometrium ve prostat gibi dokularda da sentezlenerek plazmaya salınır. SHBG plazmada seks hormonlarından özellikle de testosteron, dehidrotestosteron ve östradiol transportundan sorumludur. Testosterona karşı yüksek affinitesi varken, östradiole karşı affinitesi düşüktür. Bundan dolayı SHBG konsantrasyonlarındaki değişiklikler serbest testosteron miktarını serbest östrojenden daha fazla etkiler.

Serbest Testosteron, pasif ya da kolaylaştırılmış difüzyona uğrayarak hücre zarını geçerek sitoplazmaya girer. Hedef hücre içinde hücre içi reseptöre bağlanır. Birçok hücre sitoplazması testosteronu DHT'na çeviren 5 α -redüktaz içerir. DHT ve testosteron için tek reseptör vardır; fakat DHT'un reseptöre bağlanma ilgisi daha fazladır. Androjen

etkisinin meydana gelebilmesi için reseptör-hormon kompleksinin hücre çekirdeğine giderek ilgili kromatine bağlanıp, hormon cevabını ortaya çıkaracak protein sentezini başlatması gerekir. DHT-reseptör kompleksi, testosteron reseptör kompleksinden daha yüksek afiniteyle kromatine bağlanır. Bu DHT'nun niçin daha güçlü bir androjen olduğunun bir izahıdır.

Testosteronun en önemli metabolik ürünü DHT'dur. DHT plazma testosteronun yaklaşık onda biridir. Daha aktif bir metabolite döndüğünden dolayı testosteron bir ön hormondur. Küçük bir kısmı aromatisasyon ile östradiole dönüşür. Androstanediol testosterondan yapılan diğer etkili bir androjendir. Başlıca önemli 17-ketosteroid metabolitleri, androsteron ve etiokolanondur. Bunlar karaciğerde glukuronid ve sülfatla konjuge edilerek suda çözülebilen maddelere dönüştürülürler. Yıkım ürünleri ya safra ile bağırsağa, yada böbrekten idrara atılırlar (58).

2.2.3.2 Testosteronun Etkileri

2.2.3.2.1 Testosteronun Androjenik Etkileri

Testosteron fetusta erkekleşme ve pubertal gelişmenin sürdürülmesini sağlar. Ayrıca ergenlik dönemindeki erkeklerde kıllanma, ses kalınlaşması, karşı cinse karşı ilgi, aşırı yağ salgısı, cilt kalınlaşması, seksüel performans gibi etkileri artırır (58).

2.2.3.2.2 Anabolik ve Metabolik Etkileri

Testosteron protein sentezini su ve tuz tutulumunu artırır. Azotlu maddeler yanında Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- ve fosfat retansiyonuna neden olur. SHBG ve HDL düzeyini azaltırken LDL düzeyini artırır (58).

2.2.3.2.3 Testosteronun Kan Yağları ve Kardiyovasküler Sistem Üzerine Olan Etkileri

Testosteron eksikliğinde lipid profilinin olumsuz etkilendiği ve HDL oranları

düŖerken trigliserid oranının yükseldiği bilinmektedir. Tromboksan A₂ ve trombosit agregasyonunda artış da oluşabilir (81). Bunun yanında androjen yerine koyma tedavisi ile fizyolojik testosteron seviyelerinin sağlanması lipid profili üzerine olumlu etkisi gösterilmiştir. Kardiyovasküler sistem hakkında ise özellikle son dönemde yayınlanan araştırmalarda androjenlerin koroner arter hastalığı üzerine olumlu etkileri ve androjen yetmezliğinin damar hastalıkları üzerine olumsuz etkileri bildirilmesine rağmen testosteron yerine koyma tedavisinin sonuçları ve mekanizması net olarak aydınlatılamamıştır ve bu konuda çelişkili yayınlar mevcuttur. Androjen tedavisi ile oluşabilecek sıvı retansiyonun kardiyovasküler sistem üzerine olası olumsuz etkisi nedeniyle özellikle kardiyak açıdan risk taşıyan hastalarda testosteron yerine koyma tedavisinde dikkatli davranılması gerekmektedir (82).

2.2.3.2.4 Testosteronun hematolojik etkileri

Testosteron hem kemik iliğine direkt etkisi hem de böbreklerden eritropoetin salgılanmasını arttırması nedeniyle eritrositoz ve hemoglobin artışına neden olur. Morley ve ark., 3 aylık tedavinin sonunda ortalama hematokrit değerinin % 42'den % 49'a yükseldiğini bildirmişlerdir (83). Eritrosit kitlesindeki artış, özellikle yaşı hastalarda kardiyovasküler riskleri artırabilir (84).

2.2.3.3 Testosteron Preparatları

2.2.3.3.1 Enjektabl Testosteron Preparatları

En yaygın kullanılan farmakolojik formülasyonlar intramüsküler olarak verilen uzun zincirli yağlı depo formundaki testosteron esterleridir(testosteron enanthate ve testosteron cypionate). Enjektabl formların temel dezavantajları enjeksiyondan sonra gelişen, 48-72 saat sonra en üst düzeyine ulaşan suprafizyolojik testosteron seviyelerine neden olmalarıdır. Bunu takip eden 10-14 gün içinde hastaların testosteron seviyeleri sürekli düşer ve normalin alt sınırına veya subfizyolojik seviyelere kadar geriler. Suprafizyolojik seviyeler LH ve FSH süpresyonuna yol açarken, takip eden

testosterondaki düşüş hastaların duygu durumlarında iniş çıkışlara ve genel iyilik hissinde kötüleşmeye yol açmaktadır. Enjeksiyon formları sirkadiyen ritmi taklit etmez. Bunun yanında her 2 ila 4 haftada bir yapılan derin kas enjeksiyonları bu uygulama yolunun diğer bir dezavantajıdır. Uzun etkili testosteron esterleri(testosteron busilat) 4-6 ay aralıklarla yapılabilir, ancak özellikle yaşlı hastalarda kullanımı, ciddi yan etki durumunda ilacın hemen kesilmesinin mümkün olmaması nedeniyle önerilmemektedir(58).

2.2.3.3.2 Oral Testosteron Preparatları

Oral formlarında ise en büyük problem bu preparatların büyük oranda karaciğerde ilk geçiş yıkımına uğramalarıdır. Moleküler olarak değişime uğramamış testosteron preparatları kullanıldığında karaciğerde gerçekleşen ilk yıkım etkisini aşip anlamlı serum testosteron seviyelerine ulaşılabilmesi için 200 mg gibi yüksek dozlara çıkılması gerekmektedir ki bu karaciğer üzerine toksiktir. İlk yıkım etkisini azaltmak amacıyla geliştirilmiş olan alkillenmiş formlar ise karaciğer üzerine karsinojenik etkiye sahiptirler. Oral alınan testosteronun karaciğer tarafından yıkımını engellemek için yağda eriyebilen testosteron undekanoat üretilmiştir. Yağda eriyebilmesi nedeniyle bu preparat barsak lenfatik yolu ile dolaşıma ulaşmakta ve böylece hem ilk geçiş metabolizmasından kurtulmakta hem de karaciğer toksisitesi az olmaktadır. Emiliminin yağa bağlı olması nedeniyle yemek ile beraber alınması gerekmektedir ve yemeklerin içerdikleri yağ miktarına bağlı olarak emilimi değişmektedir. Testosteronun maksimum plazma konsantrasyonuna genelde 2-3 saatte ulaşılır. Fakat 6-8 saat sonra plazma düzeyleri tedavi öncesi düzeylere iner. Bundan dolayı günde 2-3 defa verilmelidirler. Diğer bir oral preparat olan dihidrotestosteron derivesi mesterolone, aromatize olup östradiole dönüşmemektedir ve bu nedenle suboptimal tedavi olarak kabul edilmektedir. Biyokimyasal yapılarında alkil grubu nedeniyle hepatotoksiktirler. Hiçbir oral preparat sirkadiyen testosteron ritmini taklit edememektedir fakat dikkatli bir zamanlama ve dozlama ile bu sorun aşılabilir. İmplant formlarının hem çok uzun süreli etkileri ile gerektiğinde tedavinin hemen sonlandırılmamasına neden olduklarından hem de uygulama için kalın bir trokar gerektirdiklerinden yaygınlık kazanmamıştır(58).

2.2.3.3.3 Transdermal Testosteron Preparatları

Skrotal testosteron yapışan bantları ise sürekli skrotal bakım gerektirmektedir ve yapılması genellikle problemlidir. Bunun yanında skrotal ciltteki yüksek 5 α -redüktaz aktivitesi nedeniyle testosteron konsantrasyonuna orantısız şekilde çok yüksek dihidrotestosteron seviyelerine neden olmaktadır. Non-skrotal testosteron yapışan bantları hem sirkadiyen ritmi taklit ederler, hem kolay kullanılabilirler, hem de fizyolojik sınırlar içerisinde kalan testosteron seviyeleri ile virilizasyonu sağlarlar ve kemik dansitesini arttırırlar. Emilim eğrisinin belirgin bir şekilde sadık kalması avantajları olarak görülmektedir. İçeriklerindeki emilimi arttırıcı ajanlar nedeniyle % 60'lara varan sıklıkta ve % 9 hastanın tedaviyi bırakmasına neden olacak kadar şiddetli cilt reaksiyonlarına yol açmaktadırlar. Uygulama bölgesinin triamsinolon içeren kremlerle korunması alerji oranını azaltmaktadır. Testosteron jelleri non-skrotal yapışan bantlara benzer şekilde sirkadiyen ritmi taklit ederler, kolay uygulanırlar ve güvenlidirler. Bunun yanında özellikle daha seyrek cilt reaksiyonuna neden olduklarından daha düşük yan etki oranlarına sahiptirler. Enjeksiyon formlarına göre gonadotropinleri daha az ve normal değerlere düşecek kadar baskırlar. Sadece 100 mg dozunda kullanıldıklarında SHBG seviyesini düzeyinde düşüşe neden olurlar. Jeller hakkındaki en ciddi şüphe kullanan kişinin çevresindekilere kontaminasyon olasılığıdır. Bu konuda literatürde birçok sporadik bildiri bulunsa da yapılmış tek kontrollü çalışmada içeriklerinde bulunan alkol buharlaşıp testosteron jeli kuruduktan sonra temas eden kişilerde anlamlı serum seviyelerine ulaşacak bulaşmanın mümkün olmadığı görülmektedir (58).

2.3 G Proteinleri

Sinyal ileten G proteinleri "GTPaz"lar kabaca iki sınıfa ayrılır.

-Heterotrimerik G proteinleri

-Tek bir α subunit içeren küçük G proteinleri (p21-ras gibi) (85)

2.3.1 Heterotrimerik G Proteinleri

Heterotrimerik G proteinleri hücre membranından içeriye sinyal ileten moleküler anahtarlardır. Hücre membran reseptörü bir agonist tarafından işgal edildiği zaman, reseptör aktivitesinde uygun değişiklikler oluşturulur ve bu sinyal ilgili G proteinini aktive eder. Bu da daha sonra efektörü aktive eder. G protein aracılı sinyal iletim sistemi sinyalin amplifikasyonunu içerir (85).

2.3.2 Küçük G Proteinleri

Küçük GTP bağlayıcı proteinler (G proteinleri) molekül ağırlıkları 20-40 kDa olan monomerik G proteinleridir. Mayalardan insanlara tüm ökaryotlarda bulunur ve 100'den fazla üyesi olan bir superfamilya oluşturur (86,87,88).

Bu superfamilya yapısal olarak 5 familyaya ayrılır.

-Ras

-Rho/Rac/Cdc 42

-Rab

-Sar1/Arf

-Ran

Birçok hücresel fonksiyonu regüle ederler ;

-Ras familyası gen ekspresyonunu,

-Rho familyası (Rho/Rac/Cdc42) hücre iskeleti reorganizasyonunu ve gen ekspresyonunu,

-Rab ve Sar1/Arf familyası intrasellüler vezikül trafiğini,

-Ran familyası G₁, S ve G₂ fazlarında nükleostoplazmik transportu ve M fazındaki mikrotübül organizasyonunu düzenler (88).

2.3.2.1 Rho

Rho geni ilk olarak 1985'de Aplysia'dan bir Ras homoloğu olarak klonlanmış ve

bunu kısa süre sonra üç insan homologu RhoA, RhoB, RhoC izlemiştir (89). RhoA, Ras superfamilyasının küçük bir G proteindir. Aktif bir GTP bağlı form ile inaktif GDP bağlı form arasında gider gelir. RhoA hücre iskeleti organizasyon, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve gen regülasyonu gibi farklı hücrel fonksiyonlar için gerekmektedir. RhoA ve onun “downstream” efektörü Rho-kinaz (ROCK) vasküler endotel disfonksiyonuna aracılık eden önemli sinyal transdüksiyon mekanizmalarıdır (90).

Rho'nun aktive olabilmesi için geranilgeranile olmuş C-terminal ucu ile membrana tutunması gerekir. Guanin nükleotid değişiminden sonra, Rho, Rho-kinaz, protein kinaz N, rhophilin, rhotekin, sitron, p140 mDia ve fosfolipaz D gibi efektörler ile etkileşime girer (91).

2.3.2.2 Rho/Rho-Kinaz Yolağı

En iyi tanımlanmış Rho efektörü olan Rho-kinazın iki izoformu vardır;

-ROK α (ROCK-2)

- ROK β (ROCK-1 veya p160 ROCK)

Rho-kinazlar serin/treonin protein kinazlardır. Bir amino-terminal katalitik kinaz bölgesi, Rho-GTP bağlanan bir kıvrılmış sarmal bölgesi ve sisteinden zengin bir parça ile ayrılmış C-terminal plekstrin homoloji bölgesi içerirler (92).

Kas hücresi kontraksiyonunda ve kas olmayan hücrelerde hücre iskeletinin organizasyonunda moleküler motor miyozin-II'nin fosforilasyonu önemlidir. Miyozin-II'nin serin 19'daki düzenleyici hafif zincirinin fosforilasyonu miyozinin intrinsik ATP'az aktivitesini arttırarak aktomiyozin bağlanma hızını ve gücünü arttırır (13,14).

Düz kas miyozin hafif zincir fosfatazı (SMPP-IM) tip-I serin treonin fosfatazdır. 110-130 kDa'luk miyozin bağlayan altünite, 37 kDa'luk katalitik alt ünite ve 20 kDa ağırlığında fonksiyonu bilinmeyen bir alt ünite içerir. Düz kas miyozin hafif zincir fosfatazı (SMPP-IM) miyozin bağlayıcı bölgesi aracılığı ile fosforile miyozin hafif zinciri bağlar ve onu defosforile eder (Mac 2001). Protein kinaz C ile aktive edilen

fosfataz inhibitörü, CPI-17 indirekt olarak SMPP-IM'i inhibe eder. CPI-17 miyozin fosfatazın katalitik subunitinin fosforilasyon bağımlı bir inhibitörüdür (14).

Miyozin hafif zincirin fosforilasyon basamağı fosforilasyonu arttıran serin-treonin protein kinazlar ve fosforilasyonu azaltan miyozin fosfataz tarafından çift taraflı olarak düzenlenir.

Protein kinazlardan miyozin hafif zincir kinazı 10^{-6} M sitozolik kalsiyum düzeyleri ile aktive olur. Miyozin hafif zincir fosforilasyonu kalsiyum artışı olmadan da meydana gelmektedir. Bunun bazal bir miyozin hafif zincir kinaz aktivitesine mi yoksa diğer kinazlara bağımlı mı olduğu tartışma konusudur (93).

Şimdilerde integrin bağımlı kinazın kalsiyumdan bağımsız bir şekilde miyozin hafif zincirini fosforile ettiği gösterilmiştir (92,94). Kalsiyum aracılı bu yolak uzun zamandır miyozin hafif zincir fosforilasyonunun düzenlenmesinde ana mekanizma gibi görünse de, düz kas hücrelerinde kalsiyuma duyarsız bir mekanizma ile miyozin hafif zincir fosforilasyonunun düzenlendiği ikinci bir yolak bulunmuştur. Çeşitli fizyolojik stimulusların serbest sitozolik kalsiyum konsantrasyonlarında bir artma olmaksızın da düz kas kontraksiyonunu indükleyebileceği gösterilmiştir (92,95). Daha sonra yapılan çalışmalar kalsiyumdan bağımsız bu düzenlemenin miyozin fosfatazın inhibisyonu yolu ile olduğunu ve monomerik GTP bağlayıcı protein Rho'yu da içerdiğini göstermiştir (92,13).

RhoA'nın aktivasyonu Rho-kinazın aktivitesine öncülük eder. Rho-kinaz daha sonra enzimin inhibisyonu ile sonuçlanan miyozin fosfatazın düzenleyici miyozin bağlayıcı subunitinin fosforilasyonuna neden olur (Nina 2002). Böylece artmış aktomiyozin etkileşmesi kalsiyum aracılı miyozin hafif zincir kinaz aktivasyonu ve Rho-bağımlı miyozin hafif zincir kinaz defosforilasyonunun inhibisyonu yolu ile gerçekleştirilebilir. Her ikisi de miyozin hafif zincir fosforilasyonunu artırır (Nina 2002).

Rho/Rho-kinaz yolağı, myozin II'nin myozin hafif zincirinin (MHZ) fosforilasyon düzeylerini modüle eder, bunu myozin fosfatazın inhibisyonu ile

ve bu da, ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıklara eğilimi artırır (90). Ca^{2+} duyarlaştırıcı bir mekanizma olan Rho/Rho-kinaz sinyalizasyonu, vasküler düz kas tonusunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu yolağın inhibisyonu, hipertansiyon tedavisinde yeni bir terapötik hedef olabilir (103). Şimdilerde insan endotel hücrelerinde trombinin eNOS gen ekspresyonunu ve RhoA/ROCK yolağı üzerinden bu enzimin aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (104).

2.3.2.3 Rho Rho-kinazın düzenlenmesi

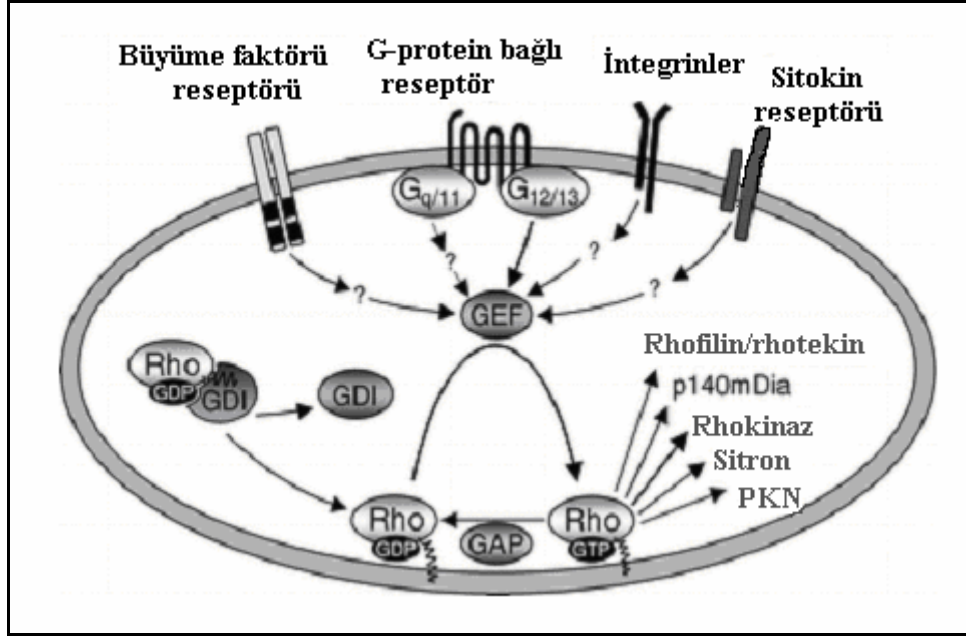
Rho'nun kendi aktivitesi üç grup protein tarafından düzenlenir.

-GTPaz aktive edici proteinler (GAPs): Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini arttırarak GTP bağlı Rho'nun inaktivasyonunu kolaylaştırır.

-GTPaz ayırıcı inhibitörler (GDIs): Bazı Rho ailesi GTPaz'larının membrana bağlanmalarını inhibe eder. Nükleotid ayrılmasını ve aktivasyonunu önler (Olofsson 1999).

-Rho spesifik guanin nükleotid değişim faktörleri (Rho GEFs): GDP'nin ayrılıp GTP'nin bağlanması ile Rho aktivasyonuna öncülük eder.

Son zamanlarda Rho GEF proteinleri Rho aktivitesinin ana regülatörü olarak görülmektedir. GEF aktivitesinin protein kinazlar, fosfatidil inozitol kinazlar gibi çeşitli sinyal ileten moleküller tarafından veya sadece dimerizasyon yolu ile düzenlendiği ileri sürülmektedir (105). Rho aktivitesi aynı zamanda çok sayıda G proteini bağlı reseptörler tarafından da düzenlenebilir (106).



Şekil 9. Rho aktivitesinin düzenlenmesi (92).

2.3.2.4 Rho/Rho-kinaz Yolağının Vasküler Dokudaki Fonksiyonu

Rho/Rho-kinaz aracılı hücre içi sinyal yolağı noradrenalin, trombin, anjiyotensin II, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve serotonin gibi çeşitli vazoaaktif ajanlar tarafından aktive edilir. Bu bakımdan Rho kinaz yolağının vasküler lezyonların gelişiminde önemli rol oynadığı önerilmiştir. Rho-kinaz inhibitörleri ile uzun süre tedavi sonucunda vasküler düz kas hücresi ve fibroblast proliferasyon ve migrasyonu ve inflamatuvar hücrelerin vasküler duvarlara göçü gibi kritik basamakları inhibe edebileceği büyük bir olasılıktır. Rho-kinaz sinyal yolağı sadece hipertansif vaskülopatide değil, aynı zamanda vasküler hastalıkların diğer formlarında da yer alır (103). NO, sGMP bağımlı protein kinaz aracılığıyla damar gevşemesi oluşturur. Bir çalışmada rekombinat sGMP ile, sGMP-bağımlı protein kinazın RhoA'yı fosforilleyebileceği ve böylece RhoA'yı inhibe edebileceği gösterilmiştir. Endoteli sağlam sıçan aortunda bir ROCK inhibitörü olan Y-27632 fenilefrine karşı oluşan maksimal kasılmaları azaltmıştır. Oysa endoteli soyulmuş ringlerde Y-27632 fenilefrine karşı oluşan kasılmaları inhibe etmekte yetersiz kalmıştır. Bunun yanında sodyum nitroprusiyatın fenilefrinle indüklenen RhoA translokasyonunu geri çevirdiği bulunmuştur. Endoteli sağlam damar ringlerde nitrik

oksid sentaz inhibitörleri ve guanilil siklaz inhibitörleri varlığında Y-27632, fenilefrinle indüklenen kasılmaları inhibe etmekte belirgin olarak daha az etkili olmuştur. Bütün bu bulgular, sağlam sıçan aortunda NO'nun Rho-kinazın kastırıcı aktivitesini inhibe ederek gevşeme oluşturduğunu göstermektedir (100). Sıcaklık düşürülerek oluşturulan mikrotübül depolimerizasyonunun, Rho-kinaz aktivasyonu aracılığıyla sıçan aortunda kasılmaları artırdığı bildirilmiştir. Hücresel mikrotübül ağının veziküler transport, sinyal iletimi ve hücre bölünmesi gibi çeşitli hücresel olaylarda görev aldığı bilinmektedir (100). RhoA ve mitojenle-aktive olan kinaz gibi birkaç intrasellüler sinyal yolağının, sfingozin 1-fosfat (SIP) ile aktive edildiği bulunmuştur. SIP, aktive olmuş trombositlerden salıverilen bir lipiddir. Vasküler düz kas hücre kültürlerinde SIP sinyalinin, proliferatif cevapları uyardığı gösterilmiştir (107). Diğer taraftan Rho-kinaz ile aracılık edilen Ca^{2+} duyarlaşmasında sfingozil fosforilkolinin yeni bir ikincil ulak olduğu bulunmuştur (108).

Rho-kinaz inhibitörü olan Y-27632 tavşan baziller arterinde endotelin-1 ile indüklenen kasılmaları inhibe etmiştir (109). Ek olarak Rho/Rho-kinaz yolağı sığır serebral arterindeki Ca^{2+} duyarlılığından da sorumludur (108). Rho-kinaz ve bu arada kısmen protein kinazı da inhibe eden fasudil in vivo olarak hayvanlara verildiğinde vazodilatör etki oluşturduğu gösterilmiştir ve güncel olarak serebral vazospazmın tedavisinde denenmektedir. Bu bileşik aynı zamanda agonistle olan kasılmaları izole vasküler düz kaslarda inhibe eder. Naguma ve arkadaşları, in vivo olarak uygulanan fasudilin Rho-kinazı inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aynı ekip yaptıkları çalışmada fasudilin saflaştırılmış Rho-kinaz için güçlü bir in vitro inhibitör olduğunu göstermiştir (110). Aortokoroner ya da infrainguinal “bypass” yapılacak olan hastalardan alınan safen veni in vitro ortamda arteryel basınç koşullarında perfüze edildiğinde fenilefrin ve serotonine duyarlılığının arttığı görülmüştür. Bu duyarlık Y-27632 ile önlenbilmiştir. Trombinin insan umbilikal veninde hızlı ve geçici bir RhoA aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Buna artmış myozin hafif zincir fosforilasyonu, F-aktin stres lifleri oluşumu ve uzamış olan artmış permeabilite eşlik etmiştir. Y-27632 ile Rho-kinazın inhibisyonu, bütün bu etkileri belirgin olarak azaltmıştır (111). Koroner “bypass” ameliyatı yapılan 15 hastadan izole edilen deendotelize internal torasik arterlerde serotonin ve histamin, hidroksifasudil ile belirgin olarak inhibe edilen kasılmalar

oluşturmuştur. Vasküler düz kas hücrelerinin medyadan subendotelyal bölgeye göçü, balon anjiyoplasti ve ateroskleroz sonucu gelişen intimal kalınlaşmada önemli rol oynar. Aktive olmuş trombosit ve hücrelerin bir ürünü olan lizofosfatidik asid (LPA), düz kas hücre büyümesine ve çeşitli hücrelerin göçüne neden olur. LPA ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü aracılığıyla oluşan düz kas göçü Rho/Rho-kinaz aracılığıyla olmaktadır. Bununla birlikte söz konusu göçte Rho/Rho-kinazın farklı alt inisiyasyon yolları yer almaktadır. LPA aracılı düz kas göçü MLC fosforilasyonu ile bağlantılı iken trombosit kaynaklı düz kas göçü MLC fosforilasyonundan bağımsız olarak bulunmuştur (112). Rho-kinaz aktivitesini spesifik olarak inhibe eden problemlerin kullanılmasıyla hayvan modellerinde Rho/Rho-kinaz yolağı bozukluklarının sıklıkla ölüme neden olan hipertansiyon, vasküler spazm ve arteriyosklerozun ana nedeni olduğu gösterilmiştir (16).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültürü

3.1.1 Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre İzolasyonu ve Ekimi

Çalışmada Wistar türü 250-300 gram ağırlığında sıçanlar kullanıldı. Endotel hücre izolasyonu ve kültürü Ülker ve arkadaşları tarafından daha önce uygulanan yöntemlere göre hazırlandı (113).

Sıçanlar dekapite edilerek toraksları açıldı. Aortaları mediastinal dokudan ayrılarak görünür hale getirildikten sonra kalpleri çıkarıldı. Perfüzyon işlemi için izole Langendorff kalp perfüzyon sistemi kullanıldı. 40 ml oksijenlenmiş (%95 O₂ +%5 CO₂ ile) Ca²⁺'suz Krebs (NaCl 6.9 g/lt, KCl 0.35g/lt, Na₂HPO₄-7H₂O 0.32 g/lt, MgSO₄ - 7H₂O 0.3 g/lt, NaHCO₃ 2.1 g/lt, Glukoz 2g/lt, içerir ve pH 7.4'e ayarlanır) sisteme kondu. Daha önce tartılıp bir tübe konulan 40 mg kollagenaz üzerine 10 ml Krebs ve 25 µl (10 mM) Ca²⁺ stok solüsyonu kondu.

Sistem içine koyduğumuz Krebs 10 ml/dk olacak şekilde ayarlandı. Kalpler aortalarından asıldıktan sonra kandan temizlenene kadar Krebs geçirilerek yıkandı. Daha sonra kanlı perfüzyon atıldı. Hazırlanan 10 ml Ca²⁺ ile aktive kollagenaz solüsyonu 5'er ml her iki rezervuara eklendi. Bundan sonra kalpler kollagenaz ile 30 dakika resirküle edilerek sindirildi. 30 dk sonra kalpler aortalarından kesildi. Reperfüzyon borularının içinden enfluent alındı. Daha önce tartılan 200 mg sığır serum albümini (Bovine Serum Albumin, BSA), resirküle olan kollagenazlı krebs 10 ml konup sığır serum albümini (BSA) eritildi. Kalplerin atriumları ve yağ dokuları ayrılarak ventriküllerin içleri temizlendi. Ventrikül dokusu parçalandı. Parçalanmış ventrikül miyosit hücreleri sığır serum albümini (BSA)+kollagenazlı tüp içine kondu. Bu tüp 37 °C'de 15 dakika oksijenlendirildi. Bu süre içinde ortama sığır serum albümininin eklenmesinin sebebi kollagenazı inaktive etmektir. Diğer yandan elde edilen koroner perfüzyon 1200 rpm'de, 10

dakika santrifüj edildi (1. santrifüj).

İlk santrifüjden sonra süpernatant döküldü. Pellet üzerine 2-3 ml oksijenli Krebs kondu pellet çözündürülerek toplandı ve bu toplanan hücre süspansiyonu 100 mg sığır serum albümini+5mg tripsin bulunan tüp içine kondu. Bu sırada sığır serum albümini endotelden gelen kollajenaz ile karıştırılmış oldu. Diğer yandan homojenize edilen kalp 500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek miyositleri çöktürüldü. Üstteki kısım miyositlere dokunmadan alındı ve hücre süspansiyonuna eklendi. Elde edilen 15 ml endotel hücreli karışım içine 15 µl Ca^{2+} stok solüsyonu eklendi. Bu solüsyon 15 dakika gazlandırılarak bekletildi. Ca^{2+} tripsini aktive etmek için kondu. Tripsin ise bu karışım içindeki endotel hücrelerinin kullanılacak olan kültür plağına yapışmasını kolaylaştırmak içindi. Gazlandırılan karışım yüksek devirde 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi (2. santrifüj) .

Santrifüj sonrası supernatant döküldü ve pellet üzerine 20 ml Ca^{2+} suz Krebs kondu. Pellet çözündürüldükten sonra üzerine 50µl Ca^{2+} stok ilave edildi. Böylece hücreler Ca^{2+} ile aktive edilmiş oldu. Elde edilen karışım tekrar 1200 rpm de 10 dakika santrifüj edildi (3. santrifüj).

Santrifüj sonrası pellet kalana kadar döküldü ve üzerine 20 ml oksijenlenmiş Krebs+100 ml Ca^{2+} stok solusyonu eklendi. 1200 rpm de 10 dakika tekrar santrifüj edildikten sonra kalan pellet Kültür ortamı-1 (Medium 199, %10 Fetal buzağı serum, %10 yenidoğan buzağı serum, penisilin (250 IU/ml), streptomisin (250 µg/ml), amfoterisin B (12.5 µg/ml), gentamisin (50µg/ml), L-glutamin (200 mM)) ile karıştırılarak kültür flasklarına ekildi.

Ekim yapılan flasklar, 37°C'de %5 CO_2 'li ortamda 1 saat inkübe edildi. Bu inkübasyon sonunda flasklar 1-2 ml serum fizyolojik ile iki kez yıkandıktan sonra tekrar Kültür ortamı-1 ilave edilerek 24 saat beklendi. Bu 24 saatin sonunda flasklardaki Kültür ortamı-1 yenisi ile değiştirildi. 48 saatin sonunda ise flasklar tekrar serum fizyolojik ile yıkandı ve bu kez hücrelerin üzerine Kültür ortamı-2 (medium 199, % 10 fetal buzağı serum, % 10 yenidoğan buzağı serum, penisilin (100 IU/ml), streptomisin (100 µg/ml),

amfoterisin B (5 µg/ml), L-glutamin (200 mM)) ilave edildi. Bundan sonra flaskların mediumları günaşırı değiştirilerek konfluent olana kadar Kültür ortamı-2'de bekletildi. Daha sonra konfluent olan flasklar tripsinizasyon işleminden sonra pasajlanarak çoğaltıldı ve 3.pasajdaki hücreler deneyler için kullanıldı.

3.1.1 Tripsinizasyon ve pasajlama işlemi

Endotel hücre izolasyonu sonrası primer kültürü yapılan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinin (CMVE) konfluent olup olmadığı invert mikroskopta kontrol edildi. % 80 ve üzerinde konfluent olduğuna karar verilen flasklardaki hücreler üreyen hücre sayısını daha da arttırmak amacıyla tripsinizasyon işlemi sonrası uygun sayıda flaska pasajlanarak yeniden ekildi.

Tripsinizasyon işlemi için seçilen flaskların kültür ortamları uzaklaştırılarak flasklar serum fizyolojik ile yıkandı. Bu yıkama işlemi sonrasında hücreler Tropsin+etilendiamintetraasetikasit (EDTA) solüsyonu ile muamele edilerek tutundukları yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmaları sağlanmış oldu.

Tripsin, proteolitik bir enzimdir ve hücreler arası protein-protein bağlarını koparır. Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları hücre dışı matriksin stabilitesini arttırır. Hücreler arası tutunmada rol oynayan hücre yüzey glikoproteinleri Ca^{2+} varlığında etkindir. EDTA, Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarını etkiler (114). Bu nedenle tripsin ile birlikte, hücre dışı Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının uzaklaştırılması için EDTA kullanıldı. Bu sayede hücrelerin tek tek ayrılması sağlanmış oldu. Bunun için hücreler Tropsin-EDTA ilavesinden sonra karbondioksitsiz 37  C ortamda yaklaşık 10-15 dakika kadar bekletildi. Bu bekletme işleminden sonra tripsin+hücre olan flasklar medium ile (Kültür ortamı-2, düşük antibiyotikli) iyice yıkanarak elde edilen süspansiyon tripsin+EDTA'lı mediumun uzaklaştırılması amacıyla 1200 rpm'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen pellet (ki bu CMVE'dir) oluşturulmak istenen flask sayısı ile orantılı olarak Kültür ortamı-2 ile resüspande edildi. Elde edilen suspansiyon daha önce ilerine Kültür ortamı-2 konmuş flasklara eşit miktarlarda ekilerek pasajlama işlemi

tamamlandı.

İlaç inkübasyonu yapılacak flasklara bir gece önceden üremelerini durdurmak amacıyla DMEM'li (DMEM, Fetal buzağı serum, yenidoğan buzağı serum olmaksızın, penisilin 100 IU/ml, streptomisin 100 µg/ml, amfoterisin B 5µg/ml ve 200mM L-Glutamin) renksiz ve serum içermeyen besiyeri ilave edildi. Deney grupları şu şekilde idi;

- 1. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra bazal şartlarda bırakılmış hücreler.
- 2. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra 10^{-9} , 10^{-8} M ve 10^{-7} M 17-βestrodiole ile 1 gün (24 saat) inkübe edilmiş hücreler.
- 3. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra 10^{-8} M ve 10^{-7} M testosteron ile 1 gün (24 saat) inkübe edilmiş hücreler.
- 4. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra 10^{-8} M ve 10^{-7} M progesteron ile 1 gün (24 saat) inkübe edilmiş hücreler.
- 5. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra 10^{-5} M ICI 182,780 ile birlikte 10^{-9} M 17-β estrodiole ile 1 gün (24 saat) inkübe edilmiş hücreler.
- 6. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra 10^{-5} M ICI 182,780 ile birlikte 10^{-8} M 17-β estrodiole ile 1 gün (24 saat) inkübe edilmiş hücreler.
- 7. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra 10^{-5} M ICI 182,780 ile birlikte 10^{-7} M 17-β estrodiole ile 1 gün (24 saat) inkübe edilmiş hücreler.
- 8. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra 10^{-8} M testosteron ile birlikte 10^{-9} M 17-β estrodiole ile 1 gün (24 saat) inkübe edilmiş hücreler.
- 9. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra 10^{-7} M testosteron ile birlikte 10^{-8} M 17-β estrodiole ile 1 gün (24 saat) inkübe edilmiş hücreler.
- 10. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra 10^{-8} M progesteron ile birlikte 10^{-9} M 17-β estrodiole ile 1 gün (24 saat) inkübe edilmiş hücreler.
- 11. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra 10^{-7} M progesteron ile birlikte 10^{-8} M 17-β estrodiole ile 1 gün (24 saat) inkübe edilmiş hücreler.

Bu gruplarda 24 saatin sonunda flaskların mediumları alındı. Daha sonra flasklar hücre sıyrıcı (cell scraper) ile sıyrılıp hücrelerin mekanik olarak zeminden ayrılması

sağlanmış oldu. Flasklardan elde edilen hücreler eppendorflarda toplandı. Bu eppendorflar 1200 rpm'de 10 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. İlk santrifüjden sonra supernatant atıldı. Pelletlerin üzerine 150 µl'te homojenizasyon buffer [lizis tampon: TrisHCl (pH 7.4) 50 mM, NaCl 400 mM, EGTA 2 mM, EDTA 1 mM, ditiotritol (DDT) 1 mM, fenilmetilsülfonil florür (PMSF) 10 µM, löpeptin 10 µg/ml, pepstatin 1 µg/ml, benzamidine 1 mM] konuldu ve hücreler homojenizatör yardımı ile homojenize edildi. Homojenizasyon işleminden sonra hücreler 13.000 rpm'de 5 dk +4 °C 'de santrifüj edildi. Supernatantın 10'ar µl'si Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanıldı. Kalan proteinler ise Western-blot yöntemi için kullanıldı.

3.3 Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar

Kollajenaz, L-glutamin, tripsin-EDTA, penisilin/streptomisin, amfoterisin, fetal sığır serumu, yenidoğan buzağı serumu, medium 199 Earle, Dulbecco's MEM (Biochrom) (Leonorenstr., Berlin), ECL (Enhanced chemiluminescence) Plus Kit (Amersham Biosciences, Freiburg Germany), RhoA antikoru Santa Cruz Biotechnonolgy Inc,CA, (A.B.D), ROCa/ROCK-II antikorları BD Transduction Lab., Anti-actin Sigma Aldrich, Sekonder antikor olarak anti-mouse antikoru Santa Cruz Biotechnonolgy Inc,CA, (A.B.D), Testosteron, β-Estradiol-water soluble, Progesteron-water soluble Sigma Aldrich firmalarından alındı. Testosteron, estradiol, progesteron, Dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözüldü, DMSO Sigma Aldrich firmasından alındı.

3.4 Protein Miktar Tayini

Asidik coomassie brillant mavisi G-250 boya çözeltisinin proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek mavi renk oluşturması esasına dayanan Bradford yöntemi ile protein miktar tayini yapıldı. Sığır serum albumini (1 µg/ml) kullanılarak 3, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 (µg/ml) konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. 10 µl örneklerden (supernatantlar) alınarak distile su ile 100 µl'ye tamamlandı. Standart ve örneklerin üzerine 1 ml Bradford solüsyonu eklendi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra absorbans miktarları spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda manuel olarak ölçüldü. Prism

programında çizilen standart eğriye göre protein miktar tayini $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ cinsinden yapıldı.

3.5 Western-Blot Analizi.

Koroner mikrovasküler endotel hücrelerinden elde edilen protein karışımında hedef protein olan Rho-kinazın (ROCK-2) ve RhoA'nın 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-merkaptoetanol 0.2 mM, bromfenol blue 0.03 mM) ile 1/1 oranında karıştırıldıktan sonra 5 dakika kaynatıldı. Kaynatılarak denatüre edilen proteinler örnek tamponu içeriğindeki SDS yardımı ile negatif yükle yüklenir ve hidrofobik etkileşimleri bozularak lineer hale gelirler. Tamamen negatif yüklenen proteinler elektroforez sırasında katottan anoda doğru hareket ederler. Eşit miktarlarda protein %10'lik sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel (SDS-PAGE) jele yüklenerek elektroforeze tabi tutuldu ve jel üzerinde birbirlerinden ayrılmaları sağlandı. Poliakrilamid jel matrisi farklı büyüklükte porlar içerir, bu nedenle protein karışımı jele yüklenip elektroforez uygulandığında; proteinlerin bu kanallardan geçiş hızı tamamen büyüklüklerine bağlıdır. Küçük proteinler jelde hızlı, büyük proteinler yavaş ilerleyebilirler. Jelde büyüklüklerine göre ayrılan ve bantlar oluşturan proteinler elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz bir membrana aktarıldı.

Membran ECL kit tozu (Amersham Biosciences, Freiburg Germany) % 2 olacak bir şekilde % 20'lik Tween-20 içeren Tris solüsyonuna (TBS-T) konur ve membranlar 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 bu bloklama işleminden sonra membranlar 3 kez 10'ar dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandıktan sonra ROCK enzimine özgü ROCK-2 (ROK α) (Monoklonal IgG, BD Transduction Lab) antikoruna 1:1000 dilüsyonda bir saat muamele edildi. Böylelikle primer antikor membrana bağlı olan hedef protein ROCK ile bağlanmış oldu.

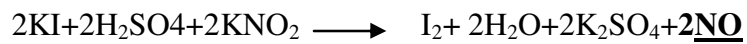
Bu işlem sonrasında da membranlar tekrar TBT-T solüsyonu ile 3 defa 10'ar dakika yıkandı.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra membranlar bu kez HRP (horseradish peroxidase) bağlı sekonder ROCK antikoruna ile (1:2000 dilüsyonda) yine bir saat muamele edildi ve böylelikle sekonder antikorun gidip primer ROCK antikoruna 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 5 dakika karanlıkta muamele edildikten sonra görüntülendi. Aynı işlemler RhoA içinde tekrarlanır.

3.6 Nitrit Tayini

Amperometrik Yöntem: Diğer taraftan hücre kültür ortamında nitrit tayini NO-metre kullanarak amperometrik olarak da ölçüldü. Bu yöntemin esası, NO'ya selektif, gaz geçirgen bir probun içinde bulunan elektrolit çözeltisinin asidik ortamda açığa çıkan NO ile okside olması sonucu akım değişmesidir. Yöntemin esası aşağıdaki reaksiyona dayalıdır.



Asid ortamda açığa çıkan NO gazı prob tarafından yakalanır ve amplifiye edilerek bilgisayar ortamına bir program aracılığı ile (Duo-18, WPI) aktarılır.

3.7 Bulguların Değerlendirilmesi

Western Blot tekniği ile elde edilen bantların analizi için Scion Image programından faydalanıldı. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirilme için ANOVA ve Dunnet post hoc testi kullanıldı. $P<0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültüründe Total Protein Miktarı

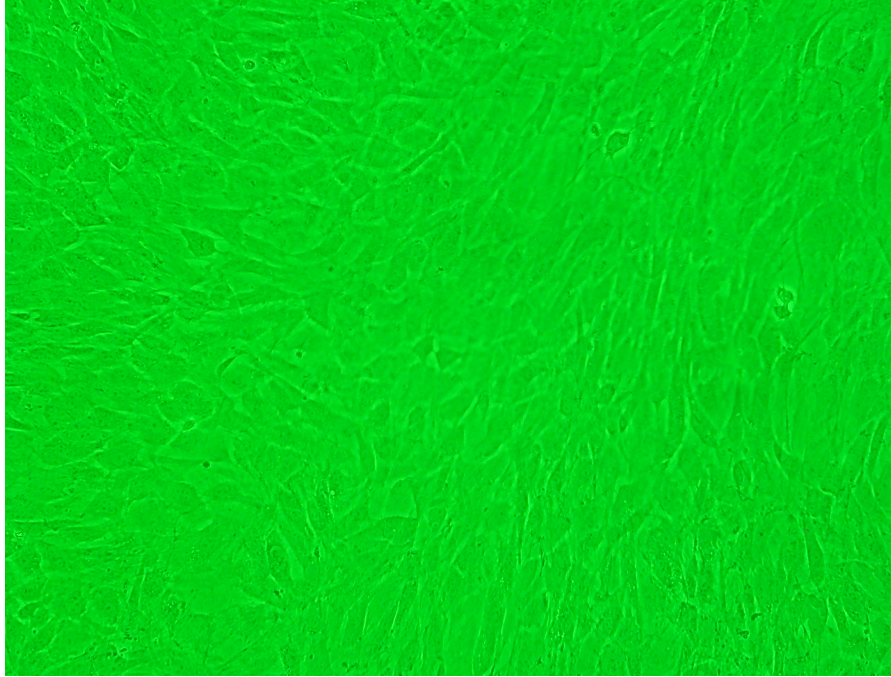
Kültüre edilmiş sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde 17- β estradiol, testosteron ve progesteron total protein düzeylerini anlamlı bir şekilde arttırdı.

Total Protein ($\mu\text{g}/\text{flask}$)						
Kontrol	10^{-8} M Estradiol	10^{-7} M Estradiol	10^{-8} M Testosteron	10^{-7} M Testosteron	10^{-8} M Progesteron	10^{-7} M Progesteron
2654 \pm 650 **	3305 \pm 443 **	3462 \pm 525 **	3472 \pm 423 **	3399 \pm 316 **	3544 \pm 357 **	3444 \pm 257 **

Tablo 3. 17- β estradiol, testosteron ve progesteron uygulanan hücrelerin total protein miktarları. Total proteinler Bradford yöntemiyle flask başına μg olarak hesaplandı. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. **: $P < 0.01$.

4.2 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücrelerinin Kültürü

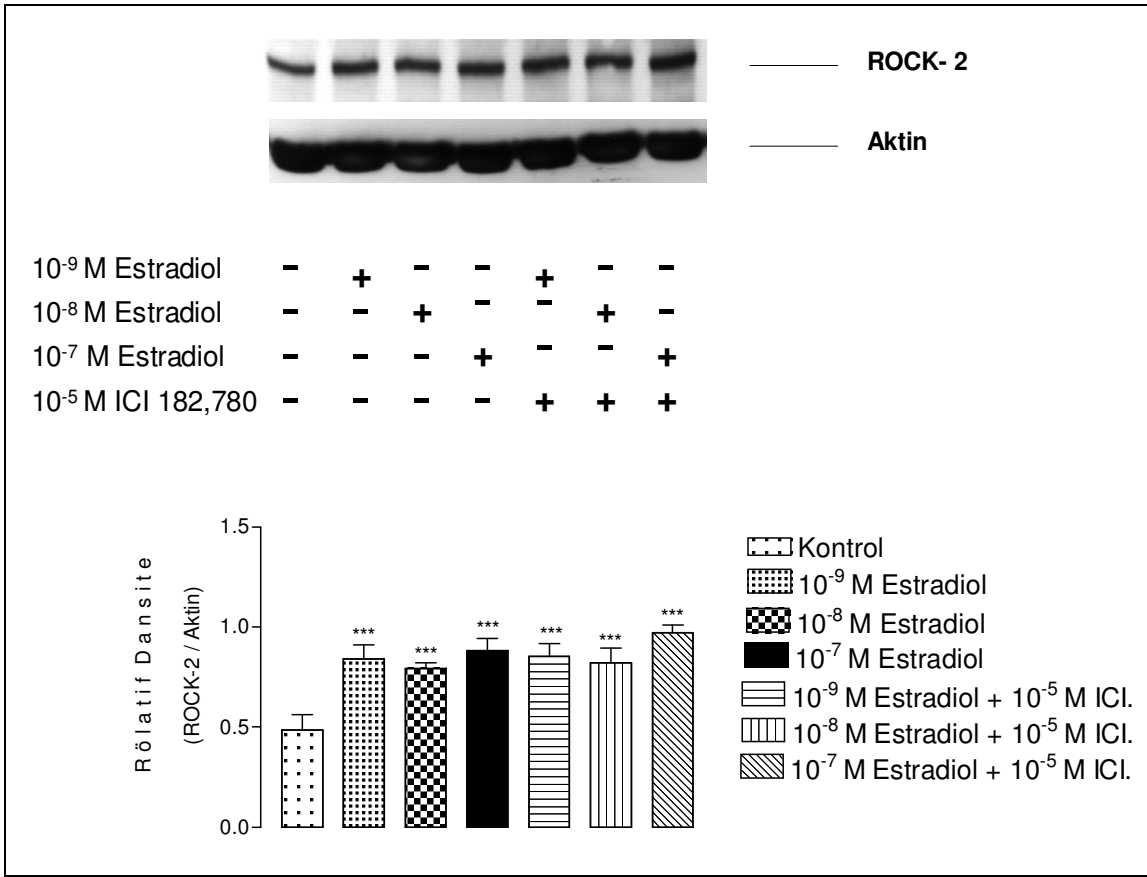
Koroner mikrovasküler endotel hücreleri başarılı bir şekilde izole edilip kültürü gerçekleştirildi (Şekil 10).



Şekil 10. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinin kültür zeminini kapladığını (konfluent olduğunu) gösteren bir fotoğraf. Tüm deneyler konfluent (en az % 90) olan hücrelerde gerçekleştirildi.

4.2.1 17-β Estradiol ve ICI 182,780'nun Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkileri

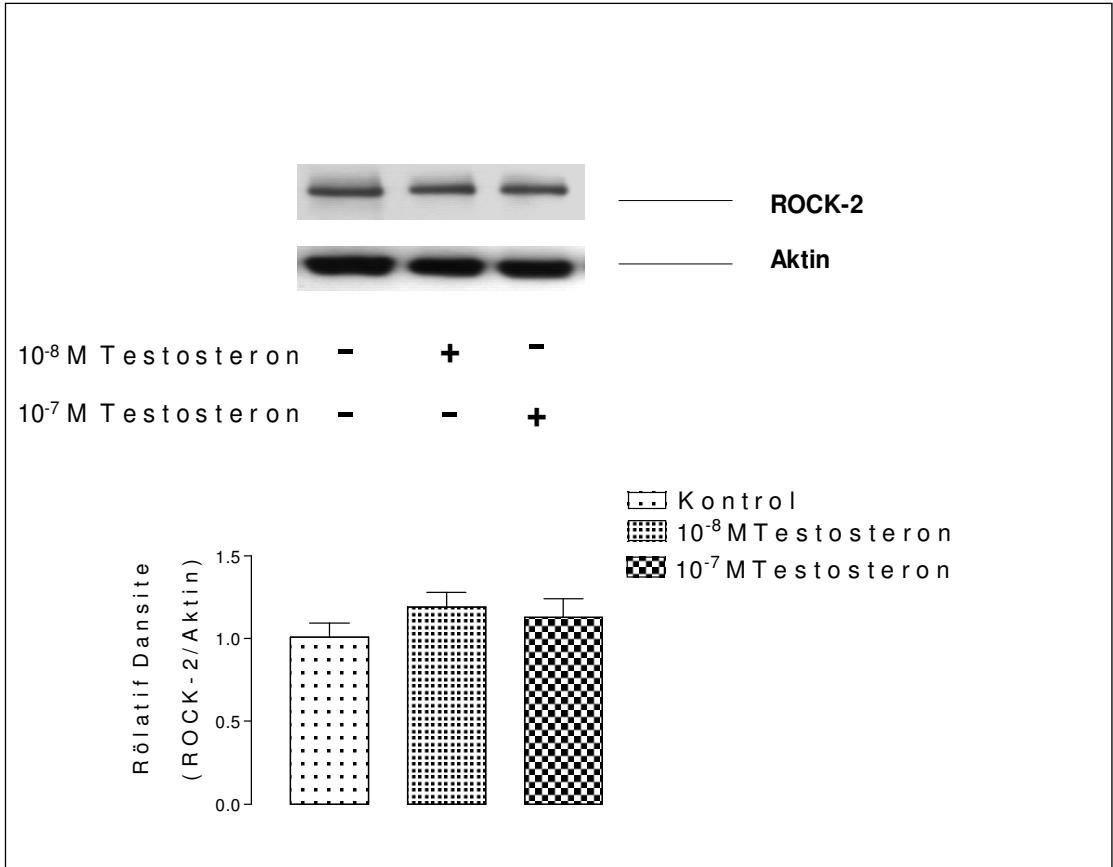
10^{-9} M, 10^{-8} M ve 10^{-7} M 17-β estradiol, sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde ROCK-2 enzim ekspresyonlarını arttırdı, fakat bu artış konsantrasyon bağımlı değildi. Estrojen reseptör blokörü ICI 182,780 estradiolün oluşturduğu ROCK-2 enzim ekspresyon artışını inhibe etmedi (Şekil 11).



Şekil 11. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında 17-β estradiol (10^{-9} , 10^{-8} ve 10^{-7} M, 24 saat, n=5) ve onun ICI 182,780 (10^{-5} M) ile kombinasyonunu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-2) ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. ***: $P < 0.001$.

4.2.2 Testosteronun Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkileri

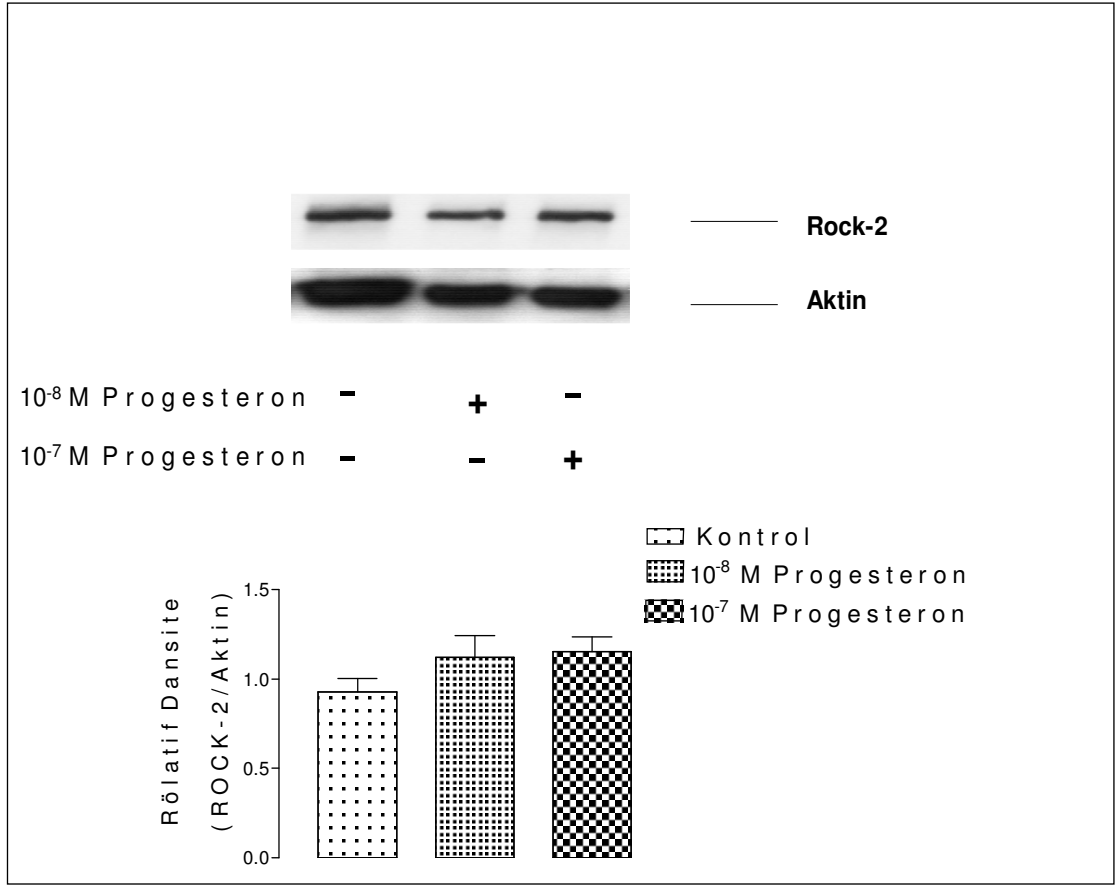
10^{-8} M ve 10^{-7} M testosteron sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültürlerinde ROCK-2 enzim ekspresyonlarını etkilemedi (Şekil 12).



Şekil 12. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında testosteron (10^{-8} M ve 10^{-7} M, 24 saat n=5) inkübasyonunu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-2) ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır.

4.2.3 Progesteronun Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine etkisi

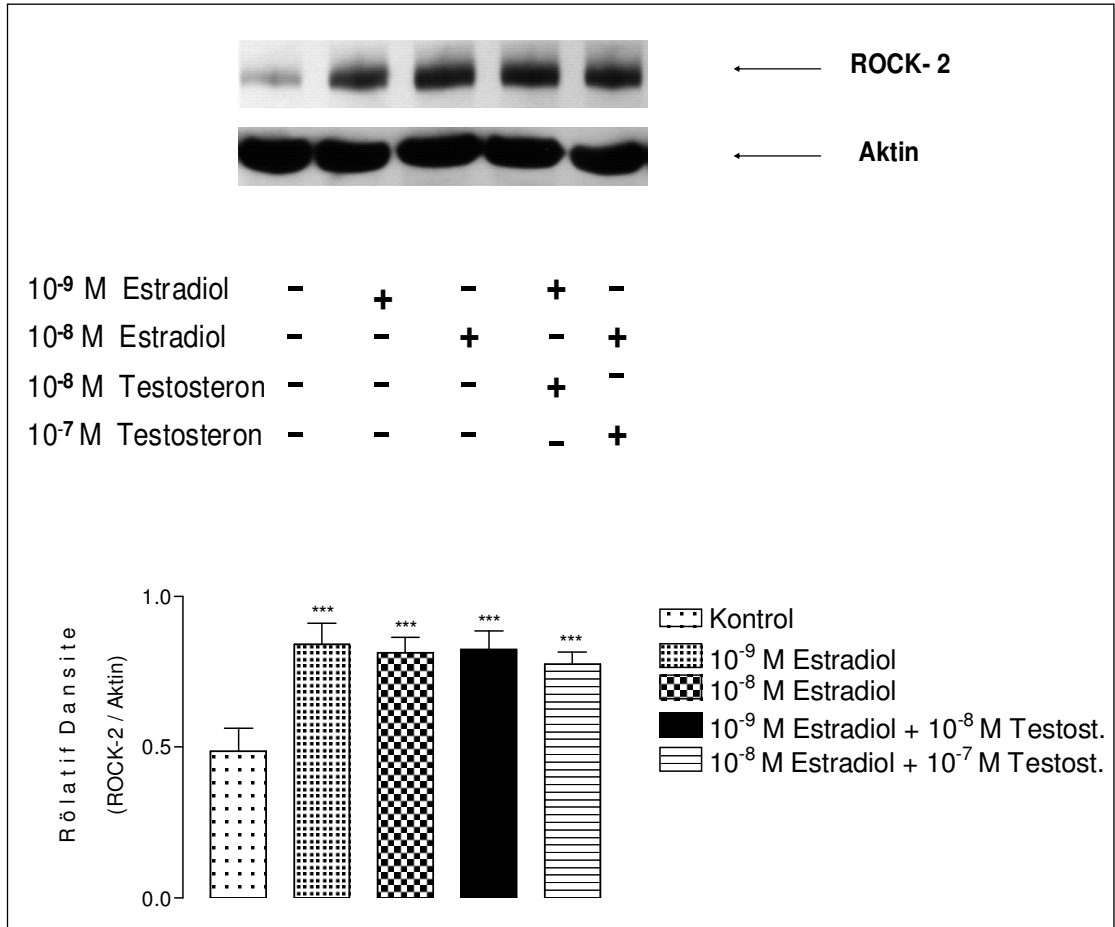
10^{-8} M ve 10^{-7} M progesteron koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde ROCK-2 ekspresyonlarını etkilemedi (Şekil 13).



Şekil 13. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında progesteron (10^{-8} M ve 10^{-7} M, 24 saat, n=5) inkübasyonunu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-2) ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır.

4.2.4 Testosteronun Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkileri

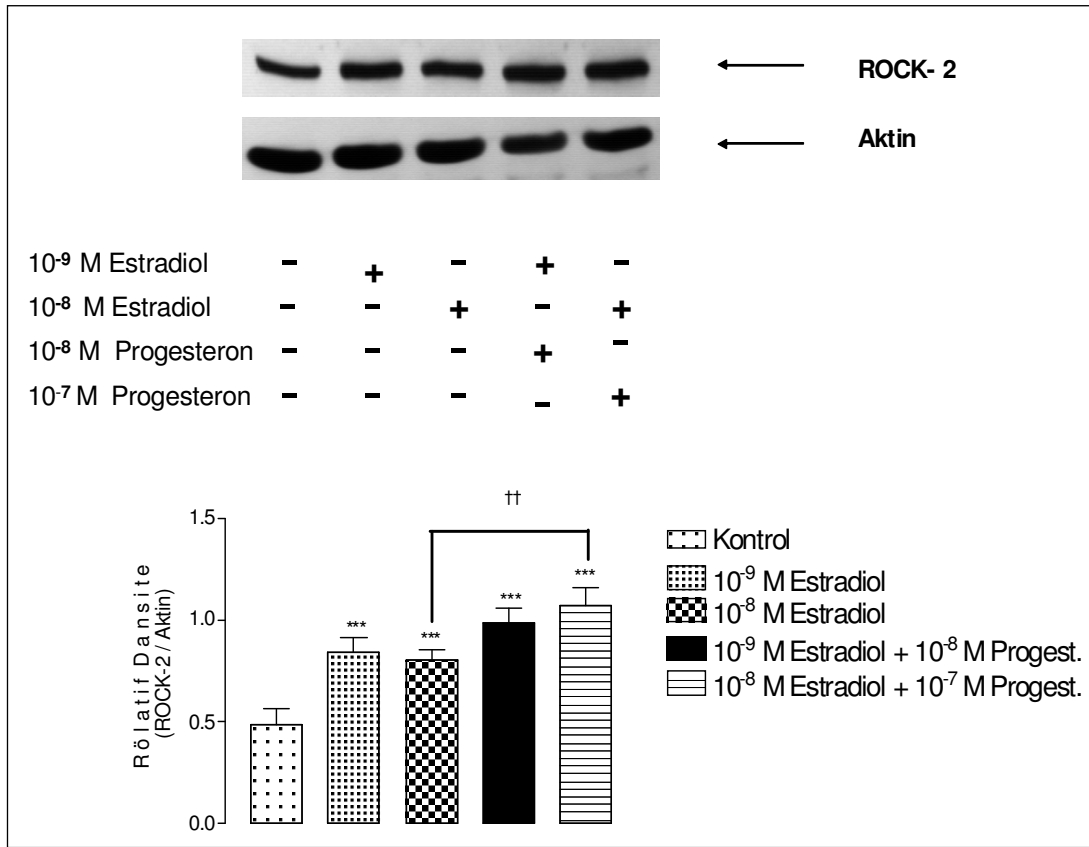
Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültürlerinde 10^{-8} M ve 10^{-7} M testosteron, $17-\beta$ estradiol (10^{-9} M - 10^{-8} M) ile indüklenen ROCK-2 upregülasyonunu etkilemedi (Şekil 14).



Şekil 14. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında $17-\beta$ estradiolün (10^{-9} ve 10^{-8} M, 24 saat, $n=5$) ve onun testosteron (10^{-8} ve 10^{-7} M) ile kombinasyonunun Rho-kinaz enzim (ROCK-2) ekspresyonları üzerine etkisi. Testosteronun estradiolle indüklenen ROCK-2 upregülasyonunu değiştirmedigine dikkat ediniz. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. ***: $P < 0.001$.

4.2.5 Progesteronun Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkileri

Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültürlerinde 10^{-8} M ve 10^{-7} M progesteron, $17-\beta$ estradiol (10^{-9} M - 10^{-8} M) ile indüklenen ROCK-2 upregülasyonunu etkilemedi (Şekil 14). Buna karşılık 10^{-7} M progesteron, 10^{-8} M $17-\beta$ estradiolün etkisini anlamlı bir şekilde artırdı (Şekil 15).

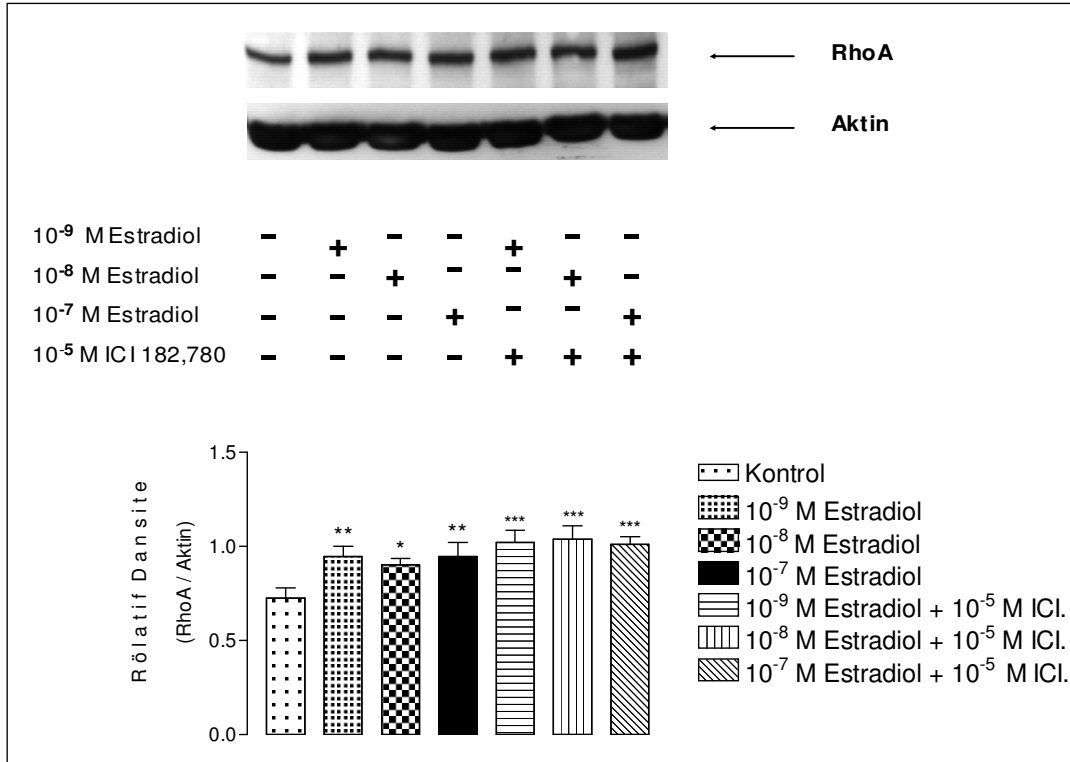


Şekil 15. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında $17-\beta$ estradiolün (10^{-9} ve 10^{-8} M, 24 saat, n=5) ve onun progesteron (10^{-8} ve 10^{-7} M) ile kombinasyonunun Rho-kinaz enzim (ROCK-2) ekspresyonları üzerine etkisi. İlginç olarak, 10^{-7} M progesteron, estradiolle indüklenen ROCK-2 upregülasyonunu artırdı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. ***: $P < 0.001$. ††: $P < 0.01$.

4.3 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültüründe RhoA Protein Ekspresyonları

4.3.1 17- β Estradiol ve ICI 182,780'nun RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

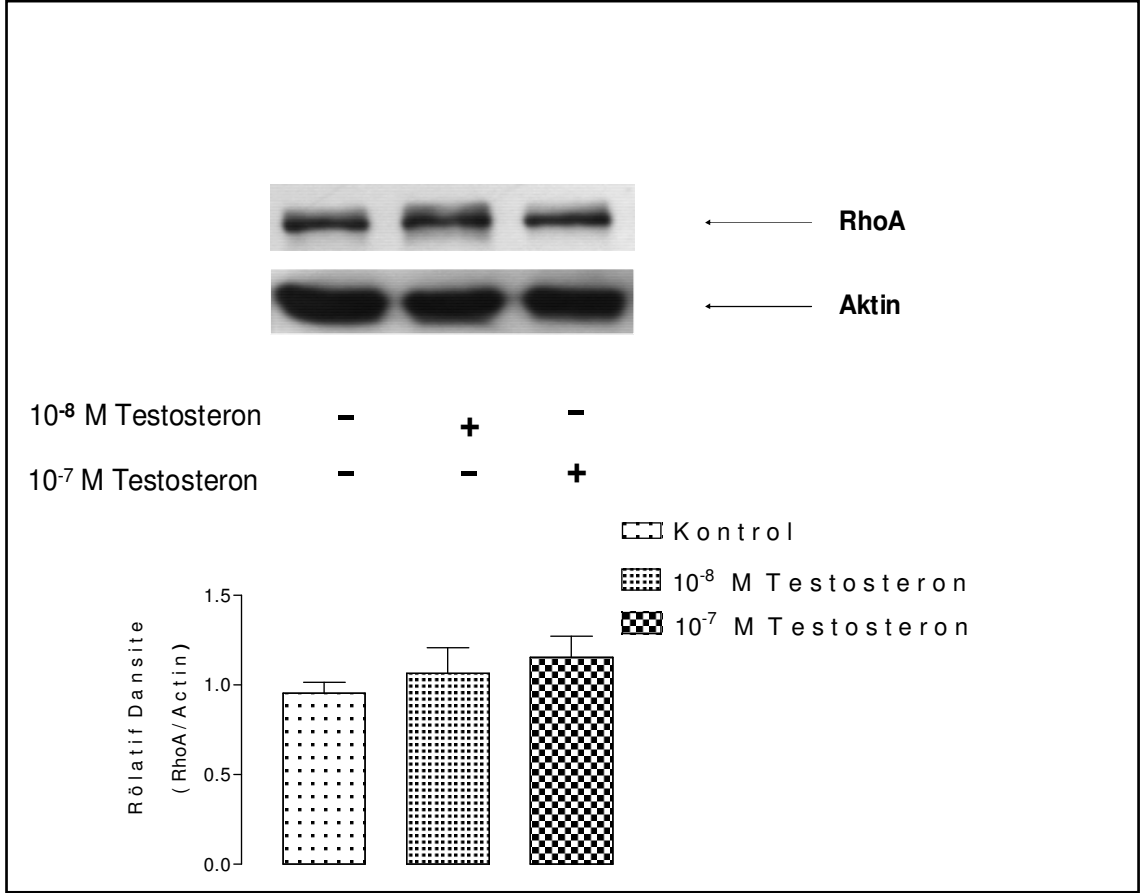
10^{-9} M, 10^{-8} M ve 10^{-7} M 17- β estradiol, sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde RhoA protein ekspresyonlarını arttırdı, fakat bu artış konsantrasyon bağımlı değildi. Estrojen reseptör blokörü ICI 182,780, estradiolün oluşturduğu RhoA protein ekspresyon artışını inhibe etmedi (Şekil 16).



Şekil 16. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında 17- β estradiol (10^{-9} M, 10^{-8} M ve 10^{-7} M, 24 saat, n=5) ve onun ICI 182,780 (10^{-5} M) ile kombinasyonunun RhoA protein ekspresyonları üzerine etkisinin Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

4.3.2. Testosteronun RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

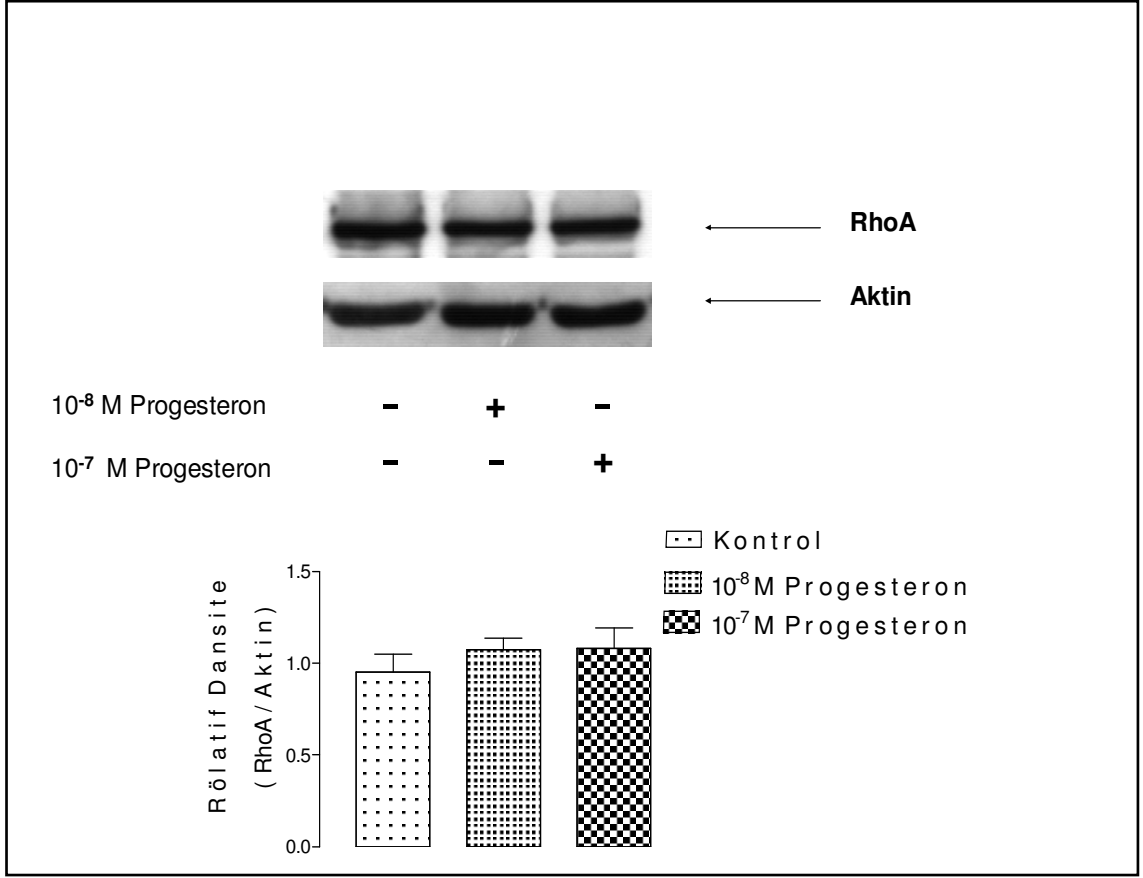
10^{-8} ve 10^{-7} M testosteron koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde RhoA protein ekspresyonlarını etkilemedi (Şekil 17).



Şekil 17. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında testosteron (10^{-8} ve 10^{-7} M, 24 saat $n=5$) inkübasyonunu takiben RhoA protein ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır.

4.3.3. Progesteronun RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

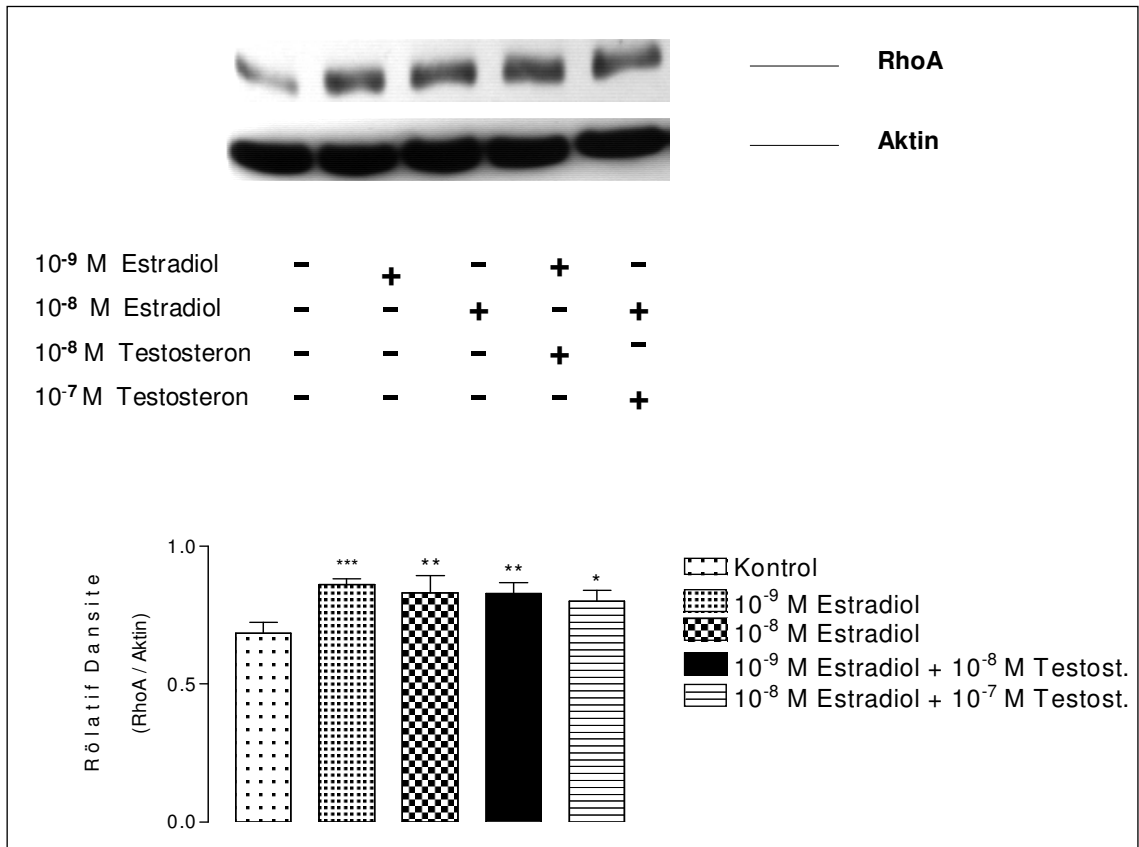
10^{-8} ve 10^{-7} M progesteron koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde RhoA protein ekspresyonlarını etkilemedi (Şekil 18).



Şekil 18. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında progesteron (10^{-8} ve 10^{-7} M, 24 saat $n=5$) inkübasyonunu takiben RhoA protein ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır.

4.3.4 17-β Estradiol ve Testosteronun RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

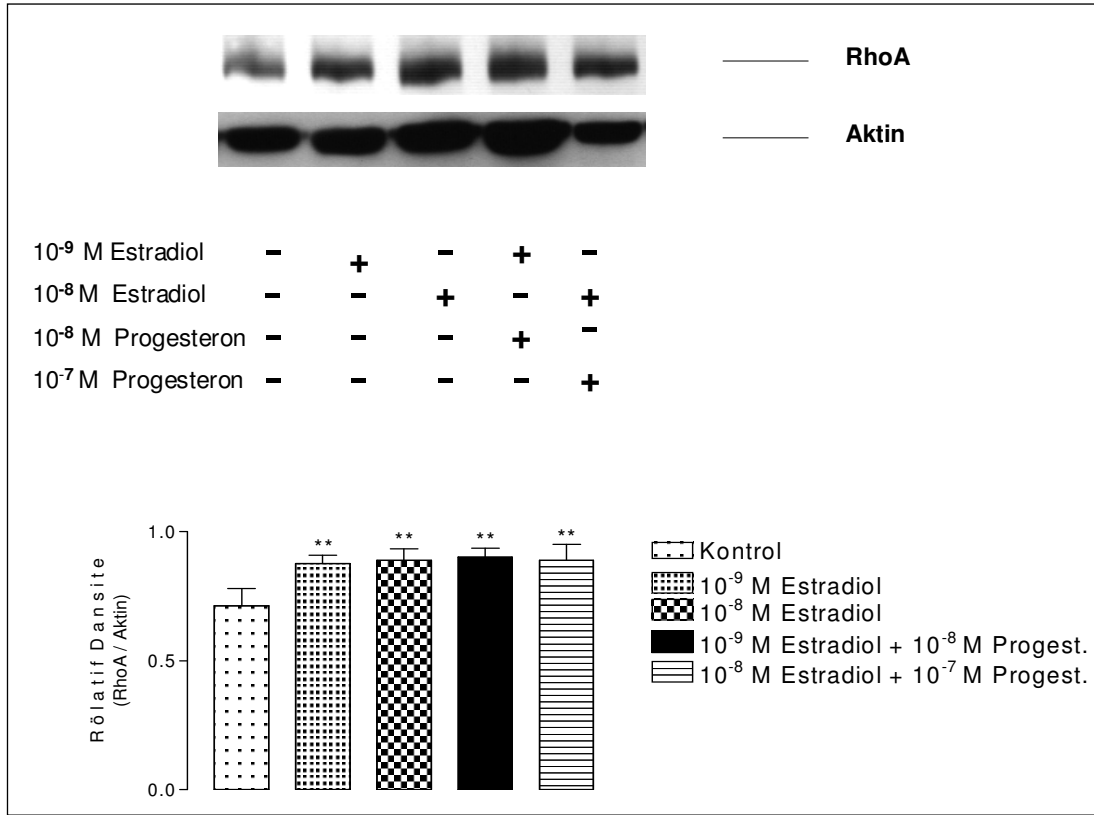
10^{-9} ve 10^{-8} M 17-β estradiol sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde RhoA protein ekspresyonlarını anlamlı olarak artırdı, 10^{-8} ve 10^{-7} M testosteron estradiolün oluşturduğu RhoA protein ekspresyon artışını inhibe etmedi (Şekil 19).



Şekil 19. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında 17-β estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M ve 24 saat, n=5) ve onun testosteron (10^{-8} ve 10^{-7} M) ile kombinasyonunun 24 saat inkübasyonunu takiben RhoA protein ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

4.3.5 17-β Estradiol ve Progesteronun RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

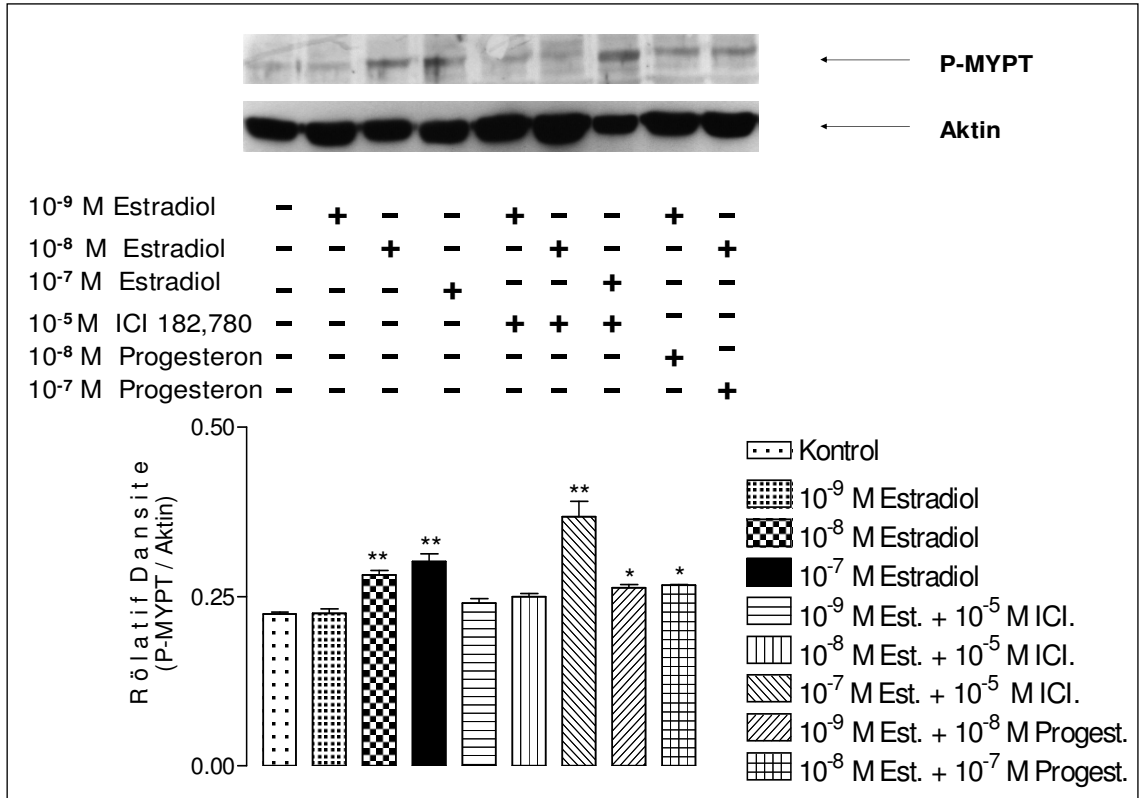
10^{-9} ve 10^{-8} M 17-β estradiol sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde RhoA protein ekspresyonlarını anlamlı olarak artırdı, 10^{-8} ve 10^{-7} M progesteron bu etkiyi ortadan kaldırmadı (Şekil 20).



Şekil 20. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında 17-β estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M ve 24 saat, n=5) ve onun progesteron (10^{-8} ve 10^{-7} M) ile kombinasyonunun 24 saat inkübasyonunu takiben RhoA protein ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. **: $P < 0.01$.

4.4 17- β Estradiol, ICI 182,780 ve Progesteronun MYPT Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

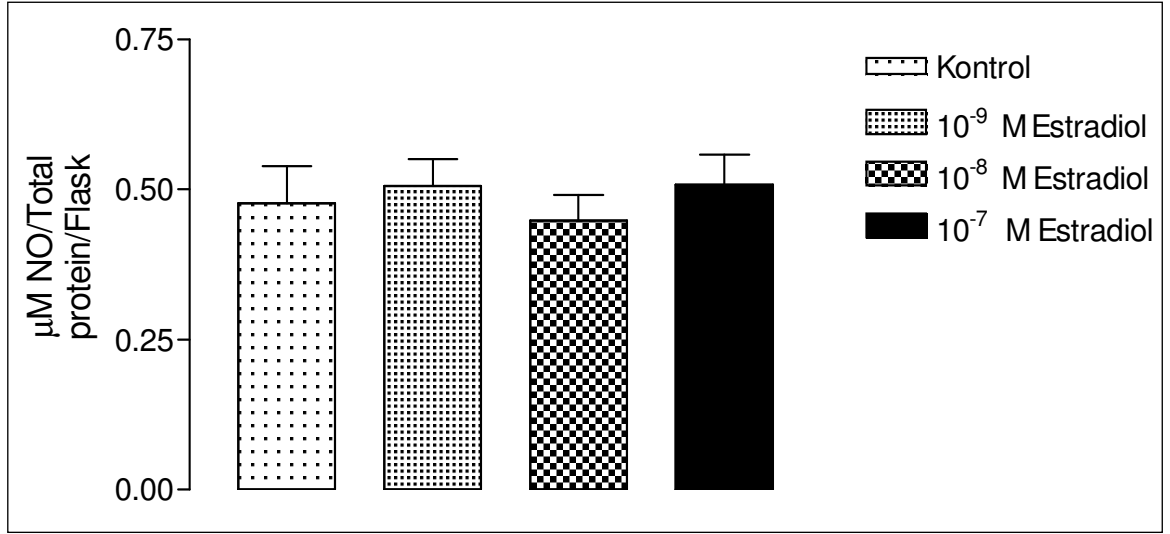
10^{-8} M ve 10^{-7} M 17- β estradiol, sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde myozin fosfatazın myozin bağlayıcı alt ünitesinin fosforilasyonunu (p-MYPT) anlamlı olarak artırdı. Bunun yanı sıra estrogen reseptör blokörü ICI 182,780 (10^{-5} M), 10^{-8} M 17- β estradiolün oluşturduğu MYPT fosforilasyonunu inhibe ederken, 10^{-7} M 17- β estradiolün oluşturduğu fosforilasyona etki etmedi. Öte yandan estradiolün oluşturduğu MYPT fosforilasyonu, 10^{-8} M ve 10^{-7} M konsantrasyonlarda progesteron inhibe etmedi (Şekil 21).



Şekil 21. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında 17- β estradiol (10^{-9} M, 10^{-8} M ve 10^{-7} M, 24 saat, n=5) ve onun ICI 182,780 (10^{-5} M) veya progesteron (10^{-8} M ve 10^{-7} M) ile kombinasyonlarının MYPT fosforilasyonuna olan etkisinin Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

4.5 17-β Estradiolün Nitrik Oksit Üzerine Etkisi

17-β Estradiol (10^{-9} M, 10^{-8} M ve 10^{-7} M), koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde NO düzeylerini değiştirmedir (şekil 22).



şekil 22. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde 17-β estradiol (10^{-9} , 10^{-8} ve 10^{-7} M, 24 saat, n=3) inkübasyonunu takiben NO miktarlarının amperometrik yöntem ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada estradiol, testosteron ve progesteronun tek başına ve estradiolün progesteron, testosteron ve estrogen reseptör α ve β blokörü, ICI 182,780 ile kombinasyonlarının Rho (RhoA) ve Rho-kinaz (ROCK-2) ekspresyonu ve Rho-kinaz aktivitesi üzerine etkilerini araştırdık.

Yapılan pek çok klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda premenopozal kadınlarda aynı yaş erkek ve postmenopozal kadınlara göre kardiyovasküler hastalık insidansı daha düşük olduğu bildirilmektedir (124). Bundan dolayı, bu çalışmada sıçan koroner endotel hücre kültürlerinde seks hormonlarının (estrogen, testosteron ve progesteron) kardiyovasküler komplikasyonlara aracılık ettiği bu gün iyi bilinen bir yolak olan Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizmaları (23) üzerine etkilerini inceledik. Her ne kadar androjenlerin sıçan renal arterinde Rho-kinaz (ROCK) ekspresyonunu ve aktivitesini stimüle ettiği (22) progesteronun insan umbilikal ven endotel hücre kültüründe (HUVEC) Rho-kinazın alt efektörü olan moezinin fosforilasyonunu artırdığı (21) ve 17- β estradiolün ROCK ekspresyonunu ve fonksiyonunu baskıladığı bildirilmiş olsa da (18), bizim çalışmamızda tam tersine estradiol, ROCK ekspresyon ve aktivitesini artırmıştır. İlginç olarak bu upregülasyon, estrogen reseptör blokörü ICI 182,780 ile inhibe edilemedi. Ayrıca pek çok dokuda estrogenin etkisini zayıflatan ve ona ters yönde hareket eden progesteron ve testosteron uygulaması da estradiolle indüklenen ROCK ekspresyon artışını baskılamadı. Ayrıca testosteron ve progesteronun tek başlarına uygulanması ROCK ekspresyonunu etkilemedi.

Bilindiği üzere Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizması vasküler sistemin tonüsünün düzenlenmesinde esaslı bir rol oynamaktadır. Rho/Rho-kinaz yolağı sadece damar düz kasılmasına katkı sağlamaz aynı zamanda inflamatuvar aterosklerotik lezyonların oluşmasına da neden olur (23). Rho/Rho-kinaz yolağı ateroskleroz, koroner arter hastalığı, aritmi, hipertrofik kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir terapötik hedef olarak görülmektedir. Kalp damar sisteminde böylesi olumsuz etkisi olan bir yolağın iyi etkileri olduğu bilinen estradiol ile güçlenmesi ilk bakışta

güncel bilgilerimizle pek bağdaşmamaktadır. Ne var ki, estrojenin hücre proliferasyonu için mitojenik bir ajan olduğu dikkate alınır, bu etkinin esasında koruyucu olabileceği düşünülebilir. Şöyle ki; Brouchet ve arkadaşları, estradiolün reendotelizasyonu estrojen reseptörü α (ER α) aracılığıyla artırdığını rapor etmişlerdir (125). Bu da, esasında estradiolün sadece kadın cinsel organlarında proliferatif olmadığını fakat aynı zamanda diğer doku ve hücreler için de mitojenik bir ajan olduğunu düşündürebilir. Ancak etkinin estrojen reseptör blokörü (ICI 182,780) ile bloke edilmemesi bu olaya estrojen reseptörlerinin karışmadığını gösterebilir. Ya da bilinen estrojen reseptörü dışında başka bir reseptörün katkısı olabilir. Yahut estrojen reseptöründen bağımsız olarak direk bir şekilde ROCK ekspresyonunu artırmış olabilir. Bu etkinin detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

Estrojenlerin Rho/ROCK yolağını aracılığı ile tümör hücre proliferasyonu ve invazyonunu tetikleyebilir. Nitekim, endotel hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde p38 ve p42/44 mitojen aktive protein kinazlar rol alır (126). Bu estrojenin endotel hücre hasarı sonrasında hücre migrasyonu ve proliferasyonunu artırarak ve ayrıca NO gibi vazoaaktif maddelerin salınımını düzenleyerek endotel hücrelerini koruyabileceği anlamına gelir (127). Estrojen over kanserinde Rho-kinazın alt efektörlerinden biri olduğu bilinen ezrin proteininin ekspresyonunu belirgin olarak indükler (128). Bu sonuçlar, estrojenin Rho-kinaz aktivitesinin göstergesi olan myozin hafif zincir fosfataz hedef proteininin (mypt) fosforilasyonunu arttırması yönündeki bulgularımızla paraleldir. Estrojenin mitojenik bir ajan olduğu ve Rho/ROCK yolağının kanser proliferasyonu, invazyonu ve metastazında rol oynayabildiği göz önüne alınacak olunursa, estrojen tarafından arttırılan Rho/ROCK sinyalizasyonu, tümörögenezisin ilerlemesi gibi kötü etkilere de aracılık edebilir (129).

Estrojenler bir taraftan Rho/ROCK yolağını da içine alan mekanizmalarla tümör hücre proliferasyonu ve migrasyonunu tetiklerken, aynı zamanda olasılıkla aynı yollar üzerinden endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu gibi yararlı etkiler oluşturabilir zira endoteli hasarlanmış damar bölgesinde trombus oluşumu hızlanmakta ve vazokonstriksiyon gelişmektedir (130,131).

Sonuç olarak, estradiol sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründe ICI 182,780, progesteron ve testosteron ile bloke edilemeyen RhoA ve ROCK-2 upregülasyonuna neden olmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın olası sonuçları arasında:

1. Estrojenik hormonların kardiovasküler sistemde yeni bir etkisi,
2. Kardiovasküler sistemde genellikle kötü şöhreti olduğu bilinen bir yolağın (Rho/Rho-kinaz) bu sistemde olumlu (koruyucu) etki yaptığına inanılan bir hormon (estrojen) tarafından da aktive edileceği ve bu etkinin esasında söz konusu sistemi korumaya yönelik bir fonksiyon olabileceği,
3. Diğer taraftan proliferatif ve mitojenik ve dolayısıyla olası karsinojenik etkili olduğu bilinen estradiolün bu etkilerine Rho/Rho-kinaz yolağının katkı sağladığı,
4. Bulgulara göre belki de yeni bir estrojenik reseptörün varlığına ilişkin ön veriler sayılabilir.

Bundan sonraki çalışmalarda, estradiolün Rho ve ROCK ekspresyon artışına, hangi tip reseptörünün (membranal ve/veya sitozolik) aracılık ettiği araştırılabilir. Bu amaçla endotel hücre membranını geçemeyen sığır serum albumini ile konjige edilmiş estradiol (BSA-estradiol) kullanılabilir. Öte yandan estrojen uygulaması sonucu ROCK-2 enzim ekspresyonlarındaki artışa bilinen estrojen reseptörlerinin ($ER\alpha$, $ER\beta$) aracılık edip etmediğini, eğer aracılık ediyorsa hangisinin aracılık ettiğini saptamak amacıyla her iki reseptör tipi için selektif agonistler denenebilir. Böylece estradiolün etkilerinin taklit edilip edilmediği belirlenebilir. Ayrıca G proteinlerinin estradiolün etkisine katkı sağlayıp sağlamadığını tespit etmek için ise, G proteinlerinin blokörü pertussis toksini denenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Koledova VV, Khalil RA.** Sex hormone replacement therapy and modulation of vascular function in cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, **2007**;5(4):777-789.
2. **Kublickiene K, Luksha L.** Gender And The Endothelium. *Pharmacological Rep*, **2008**;60:49-60.
3. **Rosano GM, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P.** Beneficial effect of oestrogen on exercise-induced myocardial ischaemia in women with coronary artery disease. *Lancet*, **1993**;342:133-141.
4. **Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E.** Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA*, **1998**;280(7):605-613.
5. **Angerer P, Störk S, Kothny W, Schmitt P, von Schacky C.** Effect of oral postmenopausal hormone replacement on progression of atherosclerosis : a randomized, controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2001**;21(2):262-8.
6. **Orshal JM, Khalil RA.** Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp, Physiol*. **2004**;286(2):233-249.
7. **Aydilek N, Aksakal M.** Effects of testosterone on lipid peroxidation, lipid profiles and some coagulation parameters in rabbits. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, **2005**;52(9):436-439.
8. **Heler RF, Jacobs HS.** Androgens estrogen and coronary heart disease. *Br Med J* **1981**;282:438-439.
9. **Ross R.** Atherosclerosis –an inflammatory disease. *N Engl J Med* **1999**;340:115-126.
10. **Rubio AR, Morales–Segura MA.** Nitric Oxide, an Iceberg in Cardiovascular Physiology: Far Beyond Vessel Tone Control. *Archives of Medical Research*, **2004**; 35:1-11.
11. **Wojciak-Stothard B, Ridley AJ.** Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*, **2002**;39(5):187-99.
12. **van Nieuw Amerongen GP, Beckers CM, Achekar ID, Zeeman S, Musters RJ, van Hinsbergh VW.** Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2007**;27(11):2332-2339.
13. **Somlyo AP and Somlyo AV.** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, **1994**;372:231-236.

14. **Solmyo AP and Solmyo AV.** Signal transduction by G-Proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol (Lond)*, **2000**; 522:177-185.
15. **Kamm KE and Stull JT.** The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1985**; 25:593-620.
16. **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: 32-39.
17. **Swärd K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne DJ, Walsh MP.** Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca^{2+} sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J. Physiol*, **2000**;522:33-49.
18. **Chrissobolis S, Budzyn K, Marley PD, Sobey CG.** Evidence that estrogen suppresses rho-kinase function in the cerebral circulation in vivo. *Stroke*, **2004**;35(9):2200-2225.
19. **Lin AD, Levin RM, Kogan BA, Whitbeck C, Leggett RE, Kearns C, Mannikarottu A.** Alteration of contractile and regulatory proteins in estrogen-induced hypertrophy of female rabbit bladder. *Urology*, **2006**;68(5):1139-1144.
20. **Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, Fadiel A, Giretti MS, Fu XD, Baldacci C, Garibaldi S, Caruso A, Fornari L, Naftolin F, Genazzani AR.** Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway. *Mol Endocrinol*, **2006**;20(8):1756-1771.
21. **Fu XD, Flamini M, Sanchez AM, Goglia L, Giretti MS, Genazzani AR, Simoncini T.** Progestogens regulate endothelial actin cytoskeleton and cell movement via the actin-binding protein moesin. *Mol Hum Reprod*, **2008**;14(4):225-234.
22. **Song J, Kost CK Jr, Martin DS.** Androgens potentiate renal vascular responses to angiotensin II via amplification of the Rho kinase signaling pathway. *Cardiovasc Res*. **2006**;72(3):456-463.
23. **Shimokawa H, Morishige K, Miyata K, Kandabashi T, Eto Y, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Takeshita A.** Long-term inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic coronary lesions in a porcine model in vivo. *Cardiovasc Res*, **2001**;51(1):169-177.
24. **Utsunomiya T, Satoh S, Ikegaki I, Toshima Y, Asano T, Shimokawa H.** Antianginal effects of hydroxyfasudil, a Rho-kinase inhibitor, in a canine model of effort angina. *Br J Pharmacol*, **2001**;134(8):1724-1730.
25. **Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC.** Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays*, **1994**;16:901-906.
26. **Furchgott RF, Zawadski JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **1980**;288:373-376.

27. **Rubio AR, Morales-Segura MA.** Nitric Oxide, an Iceberg in Cardiovascular Physiology: Far Beyond Vessel Tone Control. *Archives of Medical Research*, **2004**; 35:1-11.
28. **Griffith TM.** Modulation of blood flow and tissue perfusion by endothelium-derived relaxing factor. *Exp Physiol*, **1994**;79:873-913.
29. **Koller A, Kaley G.** Shear stress dependent regulation of vascular resistance in health and disease: role of endothelium. *Endothelium*, **1996**;4:247-272.
30. **Mombouli J, Vanhoutte PM.** Endotherapy. *J Mol Cell Cardiol*, **1999**;31:61-74.
31. **Kharbanda RK.** Functions of the healthy endothelium. *Coronary Artery Disease*, **2001**;12:485-491.
32. **Fleming I, Busse R.** Control and consequences of endothelial nitric oxide formation. *Adv Pharmacol*, **1995**;34:187-206.
33. **Venema RC, Sayegh HS, Arnal JF.** Role of the enzyme calmodulin-binding domain in membrane association and phospholipid inhibition of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, **1995**;270:705-711.
34. **Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S.** Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1977**;74:3203-3207.
35. **Vallance P, Collier J, Moncada S.** Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*, **1989**;2:997-1000.
36. **Stamler JS, Loh E, Roddy MA.** Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation*, **1994**;89:2035-2040.
37. **Celermajer DS, Dollery C, Burch M.** Role of endothelium in the maintenance of low pulmonary vascular tone in normal children. *Circulation*, **1994**;89:2041-2044.
38. **Harrison DG.** Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*, **1997**;100:2153-2157.
39. **Stroes E, Kastelein J, Cosentino F.** Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest*, **1997**;99:41-46.
40. **Büyükafşar K.** Nitrik Oksidin Fizyolojik ve Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü. *Türk Farmakoloji Derneği, Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı*. **2005**.

41. **Garcia CE, Kilcoyne CM, Cardillo C.** Effect of copper-zinc superoxide dismutase on endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. *Hypertension*, **1995**;26:863-868.
42. **Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L.** Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*, **1998**;97:2222-2229.
43. **Duffy SJ, Castle SF, Harper RW.** Contribution of vasodilator prostanoids and nitric oxide to resting flow, metabolic vasodilation, and flow-mediated dilation in human coronary circulation. *Circulation*, **1999**;100:1951-1957.
44. **Husain S, Andrewa NP, Mulcahy D.** Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, **1998**; 97:716-720.
45. **Hornig B, Kohler C, Drexler H.** Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation*, **1997**;95:1115-1118.
46. **Anderson TJ, Elstein E, Haber H.** Comparative study of ACE-inhibition, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease. *J Am Coll Cardiol*, **2000**;35:60-66.
47. **Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L.** Vasoconstriction to endogenous endothelin-1 is increased in the peripheral circulation of patients with essential hypertension. *Circulation*, **1999**;100:1680-1683.
48. **Kyriakides ZS, Kremastinos DT, Kolettis TM.** Acute endothelin-A receptor antagonism prevents normal reduction of myocardial ischemia on repeated balloon inflations during angioplasty. *Circulation*, **2000**;102:1937-1943.
49. **Feletou M, Vanhoutte PM.** The alternative: EDHF. *J Mol Cell Cardiol*, **1999**;31:15-22.
50. **Lefer DJ, Jones SP, Girod WG.** Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol*, **1999**;276:1943-1950.
51. **Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M.** Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*, **2000**;101:2149-2153
52. **Mendelsohn ME, O'Neill S, George D.** Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem*, **1990**;265:19028-19034.
53. **Diodati JG, Dakak N, Gilligan DM.** Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation*, **1998**; 98:17-24.
54. **Dahlback B.** Blood coagulation. *Lancet*, **2000**;355:1627-1632

- 55. Pothula A, Serebruany VL, Gurbel PA.** Pathophysiology and therapeutic modification of thrombin generation in patients with coronary artery disease. *Eur J Pharmacol*, **2000**;402:1–10.
- 56. Stein CM, Brown N, Vaughan DE.** Regulation of local tissue-type plasminogen activator release by endothelium-dependent and endothelium-independent agonists in human vasculature. *J Am Coll Cardiol*, **1998**;32:117–122.
- 57. Brown NJ, Gainer JV, Murphey LJ.** Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B(2) receptor-dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway. *Circulation*, **2000**;102:2190–196.
- 58. Kayaalp O.** Östrojenler, Progesterinler ve Antagonistleri. *Tıbbi Farmakoloji Ankara*: **2000**: 1387-1413.
- 59. Kayaalp O.** *Tıbbi Farmakoloji Ankara*: **2002**
- 60. Mendelsohn ME.** Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2000**;74:337–343
- 61. Mendelsohn ME.** The protective effects of estrogen on cardiovascular system. *N Engl J Med*, **1999**;340:1801–1811.
- 62. Mendelsohn ME.** Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean? *Circ Res*, **2000**;87:956–960.
- 63. Gisclard V, Miller VM, Vanhoutte P.** Effect of 17 α -estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther*, **1988**;244:19-22.
- 64. Arnal JF, Clamens S, Pechet C.** Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine aortic endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**; 93:4108-4113.
- 65. Vita JA, Keany JF.** Hormone replacement therapy and endothelial function. The exception that proves the rule? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2001**;21:1867–1869.
- 66. Elhage R, Clamens S, Besnard S.** Loss of the atheroprotective effect of estradiol in immunodeficient mice. *Endocrinology*, **2000**;141:462-464.
- 67. Kalantaridou SN, Naka KK, Bechlioulis A.** Premature ovarian failure, endothelial dysfunction and estrogen–progesterone replacement *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **2006**;17:101-109.
- 68. Dikmen N, Özgünen T.** Harper’ın Biyokimyası. *Nobel Tıp Kitapevleri*, **2004**:594-599

- 69. Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM.** Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol*, **1992**; 44: 275-283
- 70. Sitruk-Ware R.** Progestogens in hormonal replacement therapy: new molecules, risks, and benefits. *Menopause*, **2002**; 9(1):6-15.
- 71. Colditz GA.** Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*, **1987**;316:1105–1110.
- 72. Kalantaridou SN.** Impaired endothelial function in young women with premature ovarian failure: normalization with hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab*, **2004**;89:3907–3913.
- 73. The Writing Group for the PEPI Trial.** Effects of estrogen or estrogen/ progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) trial. *JAMA*, **1995**;273:199-208.
- 74. Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB.** Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys: lack of an effect of added progesterone. *Arteriosclerosis*, **1990**;10:1051-1057.
- 75. Clarkson TB, Anthony MS, Williams JK.** The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. *Proc Soc Exp Biol Med*, **1998**;217:365-368.
- 76. Bond A, Davis C.** Sex hormone binding globulin in clinical perspective. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **1987**;66:255-62
- 77. Artur C. Guyton, John E. Hall:** Textbook of Medical Physiology; W.B. Saunders Orijinal 9. basımdan çeviri. Çeviri Editörü: Prof. Dr. Hayrinüsa Çavuşoğlu **1996**: Nobel Tıp Kitapevleri :1009-1011
- 78. Bertram G. Katzung, Anthony J. Trevor:** Pharmacology; Appleton&Lange, International edition, **1995**.
- 79. Blight LF, Judd SJ, White GH:** Relative diagnostic value of serum non-SHBG bound testosterone, free androgen index and free testosterone in the assessment of mild to moderate hirsutism. *Ann Clin Chem*, **1989**;35:1609-14
- 80. Anderson S, Cockayne S.** Clinical Chemistry Concept and Applications in: Reproductive Endocrinology. W. B. Saunders Company; **1993**: 554.
- 81. Ajayi A, Mathur R, Halushka PV.** Testosterone Increases Human Platelet Thromboxane A2 Receptor Density And Aggregation Responses. *Circulation*, **1995**;91:2742-2747
- 82. Nieschlag E, Swerdloff R, Behre Hm, Gooren Lj, Kaufman Jm, Legros Jj, Lunenfeld B, Morley Je, Schulman C, Wang C, Weidner W, Wu Fc;** International Society Of Andrology (ISA);

International Society For The Study Of The Aging Male (ISSAM); European Association Of Urology (EAU). Investigation, Treatment And Monitoring Of Late-Onset Hypogonadism In Males. Isa, Issam, And Eau Recommendations. Eur Urol, **2005**;1:1-4

83. Morley JE, Perry HM, Kaiser E. Effects Of Testosterone Replacement Therapy In Old Hypogonadal Males: A Preliminary Study. J Am Geriatr Soc, **1993**; 41:149-152

84. Kadioğlu A, Atan A, Cangüven Ö, Gürkan L, Özgök Y. Yaşlanan Erkeklerde Geç Başlayan Hipogonadizm; Tanı, Tedavi Ve Takip Kılavuzu, **2004**; Türk Androloji Derneği

85. Edited by John C Foreman, DSc, PhD, Torben Johansen, MD. Text book of Reseptör Pharmacology.

86. Bourne HR, Sanders DA, and McCormick F. The GTP'ase superfamily: a coserved switch for diverse cell functions. Nature, **1990**; 348:125-132.

87. Hall A. The cellular fuctions of small GTP binding proteins. Science, **1990**; 249:635-640

88. Takai Y, Kaibuchi K, Kikuchi A, and Kawata M. Small GTP- binding proteins. Int Rev Cytol, **1992**; 133:187-230.

89. Madaule P and Axel R. A novel ras-related gene family. Cell, **1985**; 41:31-40.

90. Christine Barandier, Xiu-Fen Ming, Sandro Rusconi and Zhihong Yang. PKC is required for activation of ROCK by RhoA in human endothelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, **2003**; 304:714-719.

91. Bishop AL and Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. Biochem J, **2000**. 348:241-255.

92. Havva Kubat. Kronik Alkol Alan Farelerde Rho/Rho-Kinaz Yolağının İncelenmesi. **2007** Uzmanlık Tezi.

93. Weber LP, Van Lierop JE, Walsh MP. Ca²⁺ independent phosphorylation of miyosin in rat caudal artery and chicken gizzard miyoflaments. J Physiol (Lond), **1999**; 516:805-824.

94. Deng JT, Van Lierop JE, Sutherland C. Wals MP Calcium independent smooth muscle contraction. A novel function for integrin-linked kinase. J Biol Chem, **2001**; 276:16365-16373.

95. Bradley AB, Morgan KG. Alterations in cytoplazmic calcium sensitivity porcine coronary artery contractions as detected by aequorion. J Physiol (Lond), **1987**; 385:437-448.

96. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kiabuchi K. Regulation of miyosin phosphatase by Rho and Rho-

associated kinase (Rho-kinase) Science, **1996**;273:245-248.

97. Cario-Toumaniatz C, Evellin S, Maury S, Baron O, Pacaud P, Loirand G. Role of Rho-kinase signalling in healthy and varicose human saphenous veins. *Br J Pharmacol*, **2002**;137: 205-212.

98. Nakamura K, Nishimura J, Hirano K, Ibayashi S, Fujjishima M, Kanaide H. Hydroxyfasudil, an active metabolite of fasudil hydrochloride, relaxes the rabbit basilar artery by disinhibition of myosin light chain phosphatase. *J Cerb Blood Flow Metab*, **2001**;21:876-885.

99. Batchelor TJ, Sadaba JR, Ishola A, Pacaud P, Munsch CM, Beech DJ. Rho-kinase inhibitors prevent agonist-induced vasospasm in human internal mammary artery. *B J Pharmacol*, **2001**; 132:302-308.

100. Chitale K, Wingard CJ, Webb RC, Branam H, Stoper VS, Lewis R.W., Mills TM. Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide independent pathway. *Nat. Med*, **2001**;7:119-122.

101. Büyükafşar K, Ün İ Effects of Rho-kinase inhibitors, Y27632 and fasudil on the corpus cavernosum from diabetic mice. *Eur J Pharmacol*, **2003**;472:235-238

102. Büyükafşar K and Levent A. Involvement of Rho-Rho-kinase signaling in the contractile activity and neurotransmitter release in the mouse gastric fundus. *Biochem Biophys Res Commun*, **2003**;303,777-781.

103. 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. *FASEB J*, **2001**;15: 1062–1064.

104. Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, Yang Z. Rho GTPase/Rho-kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human. *Mol Cell Biol*, **2002**;22: 8467-8477.

105. Zheng Y. Dbp family guanine nucleotide Exchange factors. *Trends Biochem Sci*, **2001**;26:724-732.

106. Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Brown JH. The role of Rho in G-protein coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **2000**;40:459-489

107. Coussin F, Scott RH, Wise A. Comparison of sphingosine 1-phosphate-induced intracellular signaling pathways in vascular smooth muscles differential roles in vasoconstriction. *Circ Res*, **2002**;91:151-157.

108. Shirao S, Kashiwagi S, Sato M. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-

kinase mediated Ca²⁺ sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circ Res*, **2002**;91:112-119.

109. Miao L, Dai Y, Zhang J. Mechanism of RhoA/Rho kinase activation in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2002**;283:983-989.

110. Nagumo H, Sasaki Y, Ono Y. Rho kinase inhibitor HA-1077 prevents Rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2000**;278:57-65.

111. Amerongen GPN, Delft A, Vermeer MA. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability role of Rho kinase and protein tyrosine kinase. *Circ Res*, **2000**;87:335-340.

112. Ai S, Kuzuya M, Koike T. Rho-Rho kinase is involved in smooth muscle cell migration through myosin light chain phosphorylation-dependent and independent pathways. *Atherosclerosis*, **2001**;155:321-327.

113. Ülker S, Çınar M, Bayraktutan U, Evinç A. Aprotinin impairs endothelium-dependent relaxation in rat aorta and inhibits nitric oxide release from rat coronary endothelial cells. *Cardiovascular research*, **2001**;50:589-596.

114. Deliloğlu-Gürhan Sİ. Çeşitli Organlardan Hazırlanan Hücre Kültürü Teknikleri. Hücre Kültüründe Temel İlkeler Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı-1, **2003**.

115. Victor W M van Hinsberg, Geerten P van Nieuw Amerongen. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *J Anat*, **2002**; 200:549-560.

116. Zhao SP, Li XP. The association of low plasma testosterone level with coronary artery disease in Chinese men. *International Journal of Cardiology*, **1998** (63):161-164

117. Mandour O, English KM, Steeds P, Diver MJ. Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms. *European Heart Journal*, **2000**;21:890-894

118. Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation*, **1995**;91(4):1154-1160

119. Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, Christiansen C. Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits. *Circ Res*, **1999**;84(7):813-819.

120. Kajinami K, Takeda K, Takekoshi N, Matsui S, Tsugawa H, Kanemitsu S, Okubo S, Kitayama M, Fukuda A. Imbalance of sex hormone levels in men with coronary artery disease. *Coron Artery Dis*, **2004** ;15(4):199-203.

121. Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, de Zeigler D, Collins P. Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation*, **1999**;100(16):1690-1696.

- 122. Travison TG, Araujo AB, Kupelian V, O'donnell AB, McKinlay JB.** The relative contributions of aging, health, and lifestyle factors to serum testosterone decline in men. *J Clin Endocrinol Metab*, **2007**;92(2):549-555.
- 123. Dunajska K, Milewicz A, Szymczak J.** Evaluation of sex hormone levels and some metabolic factors in men with coronary atherosclerosis. *The Aging Male*, **2004**;7:197-204.
- 124. Mosca L, Manson JE, Sutherland SE, Langer RD, Manolio T, Barrett-Connor E.** Cardiovascular disease in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Writing Group. *Circulation*. 1997;7;96(7):2468-82
- 125. Brouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF.** Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation*. **2001**;23;103(3):423-8.
- 126. Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF.** Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2002**;1;22(10):1585-90.
- 127. Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, Yuhanna IS, Mendelsohn ME, Mumby SM, Shaul PW.** Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). *J Biol Chem*. **2001**;20;276(29):27071-27076.
- 128. Song J, Fadiel A, Edusa V, Chen Z, So J, Sakamoto H, Fishman DA, Naftolin F.** Estradiol-induced ezrin overexpression in ovarian cancer: a new signaling domain for estrogen. *Cancer Lett*. **2005**;18;220(1):57-65.
- 129. Giretti MS, Fu X, Rosa G, Sarotto I, Baldacci C, Garibaldi S, Mannella P, Biglia N, Sismondi P, Genazzani AR, Simoncini T.** Extra-nuclear signalling of estrogen receptor to breast cancer cytoskeletal remodelling, migration and invasion. *Plosone*. **2008**;30;3(7):2790
- 130. Bath P, Gray LJ.** Association between hormone replacement therapy and subsequent stroke: a meta analysis. *BMJ* **2005**;330:342.
- 131. Peverill RE.** Hormone therapy and venous thromboembolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol metab*. **2003**;17:149-164.

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Berlin-Almanya'da doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimimi Mersin'de tamamladım. 2000 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun oldum. 2003-2005 döneminde bir ilaç firmasında çalıştım. 2005 yılı Eylül ayında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladım. 2006 yılı Haziran ayından itibaren Sağlık Bilimleri Enstitüsünde araştırma görevlisi kadrosunda çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk babasıyım.