

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

**SIÇAN KORONER MİKROVASKÜLER ENDOTEL HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE RHO/RHO-KİNAZ YOLAĞI
VE NİTRİK OKSİD İLİŞKİSİ**

Dr. R.Nalan TİFTİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR

MERSİN – 2005

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

**SIÇAN KORONER MİKROVASKÜLER ENDOTEL HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE RHO/RHO-KİNAZ YOLAĞI
VE NİTRİK OKSİD İLİŞKİSİ**

Dr. R.Nalan TİFTİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR

Bu çalışma; Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK, SBAG-2711) ve Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA-GEBİP-2002-1-5) tarafından desteklenmiştir.

Tez No:.....

MERSİN – 2005

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

“Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans (Tezli) Program” çerçevesinde yürütülmüş olan “Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültüründe Rho/Rho-Kinaz Yolağı ve Nitrik Oksit İlişkisi”adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 15/07/2005

Doç. Dr. Kansu BÜYÜKAŞAR
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

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

Doç. Dr. Mustafa ARK
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

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

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Canan ERDOĞAN

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. Doç. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezime katkılarından dolayı Anabilim Dalımız öğretim üyeleri Sn. Doç. Dr. Mustafa ARK, Sn. Yrd. Doç. Dr. Muradiye NACAĞ'a teşekkür ederim.

Ayrıca katkılarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. Arzu KANIK'a ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sn. Yrd. Doç. Dr. Necat YILMAZ'a teşekkür ederim.

Her türlü desteğinden dolayı çalışma arkadaşım Sn. Dr. Havva KUBAT'a, Sn. Vet. Hek. Seyhan ŞAHAN FIRAT'a ve diğer anabilim dallarındaki çalışma arkadaşlarım ile teknik ve idari personele teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her türlü fedakarlığı için anneme ve babama, tezimin deneyleri boyunca sabır ve desteklerini esirgemeyen eşim Naci ve oğlum BarıŐ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	xi
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Endotel	5
2.1.1. Endotel Hücresinin Fizyolojisi	5
2.1.2. Endotel Hücresinin Fonksiyonları	6
2.1.2.1. Vazomotor Fonksiyon.....	6
2.1.2.2. Mikrosikülasyonun Düzenlenmesi.....	7
2.1.2.3. İmmunoloji ve İnflamasyon.....	7
2.1.2.4. Koagülasyon.....	8
2.1.2.5. Miyokard Kontraktilitesinin Düzenlenmesi.....	10
2.2. Nitrik Oksid	10
2.2.1. Nitrik Oksid Sentezi.....	11
2.2.2. Nitrik Oksid Sentaz Enzimleri.....	13
2.2.2.1. NOS-1 Nöronal Nitrik Oksid Sentaz (nNOS).....	14
2.2.2.1.1. NOS-1 Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	14
2.2.2.1.2. NOS-1 Aktivasyonunun Düzenlenmesi	15
2.2.2.2. NOS-2 İndüklenebilir Nitrik Oksid Sentaz (iNOS).....	15
2.2.2.2.1 NOS-2 Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	15
2.2.2.3. NOS-3 Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz (eNOS).....	16
2.2.2.3.1 NOS-3 Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	16
2.2.2.3.2 NOS-3 Aktivasyonunun Düzenlenmesi.....	16
2.2.3. Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörleri.....	17

2.2.4. Nitrik Oksid Donörü İlaçlar.....	17
2.2.5 Nitrik Oksidin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri.....	18
2.2.5.1. Kalp.....	18
2.2.5.2. Vasküler Düz Kas.....	23
2.2.5.3. Trombositler.....	24
2.2.6. Nitrik Oksidin Diğer Sistemler Üzerine Etkisi.....	25
2.3. G Proteinleri	26
2.3.1. Heterotrimerik G Proteinleri.....	26
2.3.2. Küçük G Proteinleri.....	26
2.3.2.1. Rho.....	27
2.3.2.2. Rho/Rho-Kinaz Yolağı.....	27
2.3.2.3. Rho Rho-Kinazın Düzenlenmesi	30
2.4. Hücre Kültürü.....	31
2.4.1. Hücre Kültürünün Tanımı	31
2.4.2. Hücre Kültürünün Kullanım Alanları.....	32
2.4.3. Hücre Kültürü İçin Gerekli Cihaz Ve Kimyasal Malzemeler	34
2.4.3.1. Özel Bir Laboratuar Ortamı	34
2.4.3.2. Karbondioksitli Etüv.....	34
2.4.3.3. Laminar Air Flow Kabin.....	34
2.4.3.4. İverted Mikroskop.....	35
2.4.3.5. Besi Yeri (Toz Ya Da Sıvı).....	35
2.4.3.6. Fetal Buzağı/Sığır Serumu	36
2.4.3.7 L-Glutamin.....	36
2.4.3.8. Gerekli Diğer Malzemeler.....	36
2.4.4. Hücre Kültürü Hazırlanırken Dikkat Edilmesi Gereken Kurallar.....	37
2.4.5. Kontaminasyon Riski.....	37
2.4.6. Hücrelerin İnkübasyonu Ve Bakımı.....	38
2.4.7. Farklı Canlı Türlerinde Hücre Kültürleri:.....	38
2.4.8. Primer Kültür Nasıl Hazırlanır?.....	38
2.4.9. Hücrelerin Birbirinden Ve Destek Yüzeyden Ayrılmasında Kullanılan Yöntemler.....	39
2.4.10. Divalan Katyonların Rolü.....	40
2.4.11. Primer Hücre Kültürünün Hazırlanmasında Genel Prensipler.....	40

2.4.12. Primer Kùltürlerin Hazırlanmasında Kullanılan Enzim ve Kimyasallar.....	41
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	43
3.1. Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kùltürü.....	43
3.1.1. Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre İzolasyonu ve Ekimi.....	43
3.1.2. Tripsinizasyon Ve Pasajlama İşlemi.....	45
3.2. Deney Gruplarının Hazırlanması.....	46
3.2.1. Nitrit-Nitrat Serileri.....	46
3.2.2. Rho-Kinaz Ekspresyonlarının İncelendiği Seriler.....	47
3.3. Kullanılan Kimyasal Madde Ve İlaçlar.....	49
3.4. Lowry Yöntemi İle Protein Tayini	49
3.5. Western-Blot Analizi	50
3.6. Nitrit-Nitrat Tayini.....	52
3.7. Bulguların Değerlendirilmesi.....	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. Kùltüre Edilmiş Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücrelerde Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları.....	54
4.2. Rho Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Trombinin Etkileri.....	55
4.3. Rho Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine A-23187'nin Etkileri	56
4.4. Rho Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Gliseril Trinitratın (GTN) Etkileri.....	59
4.5. Rho Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Sodyum Nitroprussiyatın (SNP) Etkileri.....	61
4.6. Rho Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Sodyum Nitritin (NaNO ₂) Etkileri.....	64
4.7. Rho Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Deta-No'nun Etkileri.....	64
4.8. Y-27632'nin Endotelial Nitrit/Nitrat Düzeyleri Üzerine Etkisi.....	65
5. TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
7. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Nitrik Oksit Sentezini Stimüle Eden Faktörler.....	12
Şekil 2.2 Nitrik Oksit Sentezi.....	12
Şekil 2.3 Nitrik Oksidin Sentez ve Metabolizması.....	13
Şekil 2.4 Rho Rho-Kinaz Yolağı.....	29
Şekil 2.5 Rho Aktivitesinin Düzenlenmesi.....	31
Şekil 4.1 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücrelerinin Kültür Ortamında Konfluent Olduğunu Gösterir Bir Fotoğraf.	53
Şekil 4.2 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Rho-kinaz (ROCK-1 ve ROCK-2) enzim Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemiyle Gösterilmesi.	54
Şekil 4.3 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Bazal Şartlarda Ve Trombin İle İnkübasyonu Takiben ROCK-1 Enzim Ekspresyonlarının. Western Blot Yöntemiyle Gösterilmesi.....	54
Şekil 4.4 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Bazal Şartlarda Ve Trombin İle İnkübasyonu Takiben ROCK-1 enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.....	55
Şekil 4.5. Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Bazal Şartlarda A-23187 İle İnkübasyonu Takiben ROCK-1 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.	56

- Şekil 4.6** Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Trombin İle Stimülasyon Yapılmış Şartlarda, A-23187 ile İnkübasyonu Takiben ROCK-1 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.56
- Şekil 4.7** Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Bazal Şartlarda A-23187 İnkübasyonu Takiben ROCK-2 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.57
- Şekil 4.8** Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Trombin İle Stimülasyon Yapılmış Şartlarda, A-23187 İle İnkübasyonunu Takiben ROCK-2 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.57
- Şekil 4.9** Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Bazal Şartlarda Gliseril Trinitrat İle İnkübasyonunu Takiben ROCK-1 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.58
- Şekil 4.10** Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Trombin İle Stimülasyon Yapılmış Şartlarda, Gliseril Trinitrat İle İnkübasyonu Takiben ROCK-1 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.59
- Şekil 4.11** Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Bazal Şartlarda, Gliseril Trinitrat İle İnkübasyonu Takiben ROCK-2 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.59
- Şekil 4.12** Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Trombin İle Stimülasyon Yapılmış Şartlarda, Gliseril Trinitrat İle İnkübasyonu Takiben ROCK-2 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.60
- Şekil 4.13** Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Bazal

Şartlarda, Sodyum Nitroprussiyat İle İnkübasyonu Takiben ROCK-1 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.....61

Şekil 4.14 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Trombin İle Stimülasyon Yapılmış Şartlarda, Sodyum İle İnkübasyonu Takiben Enzim ROCK-1 ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi.....61

Şekil 4.15 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Bazal Şartlarda, Sodyum Nitroprussiyat İle İnkübasyonu Takiben ROCK-2 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.....61

Şekil 4.16 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Trombin İle Stimülasyon Yapılmış Şartlarda, Sodyum Nitroprussiyat İle İnkübasyonu Takiben ROCK-2 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.....61

Şekil 4.17 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Bazal Şartlarda, Sodyum Nitrit İle İnkübasyonu Takiben ROCK-2 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.63

Şekil 4.18 Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Homojenatlarında Bazal Şartlarda, NO Salıverici Bir Ajan Olan DETA-NO ile İnkübasyonu Takiben ROCK-2 Enzim Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Gösterilmesi.64

Şekil 4.19 Bazal Şartlarda Ve Rho-Kinaz Enzim İnhibitörü Y-27632 İnkübasyonu Sonrasında, Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültür Ortamında Ölçülen Nitrit/Nitrat Düzeyleri.64

KISALTMALAR DİZİNİ

ADE	- Anjiotensin dönüştürücü enzim
ADP az	- Adenozin difosfataz
AGM	- Agmatin
AMG	- Aminoguanidin
BAEC	- Sığır aortik endotelial hücreleri
BSA	- Bovin Serum Albumin
CAMs	- (cell-cell adeshion molecule) hücre-hücre tutunma molekülleri
cDNA	- komplementer DNA
CaM	- Kalmodulin
Ca ²⁺ _i	- İntrasellüler kalsiyum
CPI-17	- Protein kinaz C ile aktive edilen fosfataz inhibitörü,
CMVE	- Koroner mikrovasküler endotel hücresid
CREB	- sAMP duyarlı element bağlayıcı proteini
DDT	- Dithiothreitol
EDTA	- Etilendiamintetraasetik asit
EGTA	- Diaminoetoksietan tetraasetik Asit
EDRF	- Endotel kaynaklı gevşetici faktör
EDHF	- Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör
ELAM-1	- Endotelial hücre lökosit adezyon molekülü-1
eNOS	- Endotelyal nitrik oksit sentaz
FMN	- Flavin mononükleotid
FAD	- Flavin adenin dinükleotid
GAPs	- Guanin trifosfataz aktive edici proteinler
GDP	- Guanozin difosfat
GDI _s	- Guanin trifosfataz ayırıcı inhibitörler
GTN	- Gliseril Trinitrat
GTP	- Guanozin trifosfat
HMWK	- Yüksek molekül ağırlıklı kininojen
HEPA	- high efficiency particle air
IP ₃	- inozitol trifosfat
IL-1	- İnterlökin-1
IL-6	- İnterlökin-6
IL-8	- İnterlökin-8

ICAM-1	- İntersellüler adezyon molekülü-1
ICAM-2	- İntersellüler adezyon molekülü-2
IFN- γ	- İnterferon- γ
IL1- β	- interlökin1 β
iNOS	- İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LPS	- Lipopolisakkarit
L-NMMA	- N ^G -monometil-L-arginin
L-NA	- N ^G -nitro-L-arginin
L-NAA	-N ^G -amino-L-arginin
L-NAME	- L-N ^G -nitro arginin metil ester
L-NIO	- N-iminoetil-L-ornitin
MHZ	- myozin hafif zinciri
MHC	- Major histokompatibilite kompleksi
mRNA	- Mesenjer ribonükleotid asit
NO	- Nitrik oksit
NADPH	- Nikotin adenin dinükleotid fosfat
NaNO ₂	- Sodyum nitrit
NOS	- Nitrik oksid sentaz
NF κ B	- Nükleer faktör κ B
nNOS	- Nöronal nitrik oksit sentaz
sGMP	- Siklik guanozin monofosfat
PGI ₂	- Prostrasiklin
PMSF	- Phenylmethylsulphonyl fluoride
PAF	- Trombosit aktive edici faktör
ROCK	- Rho-kinaz
Rho GEFs	- Rho spesifik guanin nükleotid değişim faktörleri
SMPP-IM	- Düz kas miyozin hafif zincir fosfatazı
SDS-PAGE	- Sodium dodecyl sulfate-polycrilamide gel
SNP	- Sodyum nitroprussiyat
TNF- α	- Tümör nekroze edici faktör- α
TGF- β	- Tümör nekroze edici faktör- β
VCAM-1	- Vasküler hücre adezyon molekülü-1
TH ₄	- Tetrahidrobiopterin
7-NI	- 7-nitroindazol

ÖZET

Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültüründe Rho/Rho-kinaz yolağı ve Nitrik Oksit İlişkisi

Bu çalışmada sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde Rho/Rho-kinaz yolağı ve nitrik oksit ilişkisi araştırıldı. Bu amaçla sıçan koroner mikrovasküler endotel hücreleri kültüre edildi.

Kültüre edilen sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde nitrik oksit (NO) vericileri, gliseril trinitrat (GTN, 10^{-7} M- 10^{-8} M), sodyum nitroprussiyat (SNP, 10^{-7} M- 10^{-8} M), DETA-NO (10^{-5} M- 10^{-6} M) ve NaNO_2 (10^{-3} M- 10^{-4} M) ile intrasellüler kalsiyum düzeyini yükselterek endotel hücrelerde NO sentezini ve salıverilmesini artıran kalsiyum iyonofor, A-23187'nin (10^{-7} M ve 10^{-6} M) bazal şartlarda ve trombin varlığında Rho-kinaz (ROCK) enziminin (ROCK-1 ve ROCK-2 izoformlarının) ekspresyonları üzerindeki 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 CO_2 'li ortamda inkübe edildi. Konfluent olan flasklar pasajlanarak çoğaltıldı.

3. pasaj koroner mikrovasküler endotel hücreleri, deneylerden 24 saat önce bölünmeleri durdurulup NO donörleri, NO sentezi ve salıverilmesini artıran ilaçlar ve Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632 ile inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası Y-27632 ile inkübe edilen flaskların mediumları alınarak nitrit-nitrat düzeyleri Griess yöntemiyle ölçüldü. Diğer ilaçlarla inkübe edilen flasklardaki hücreler ise homojenize edilerek Western-Blot yöntemi ile ROCK (ROCK-1 ve ROCK-2) enzim ekspresyon düzeyleri ölçüldü.

Sonuç olarak, NO donörleri ve NO sentezini artıran A-23187, koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde kontraktıl bir protein olan Rho-kinaz enziminin ekspresyonunu azalttı. Bu bulgu, NO donörleri ve sentezini artıran ajanların yeni bir etki mekanizmasına işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler; Rho/Rho-kinaz, nitrik oksit, NO vericileri, kalsiyum iyonofor A23187, koroner mikrovasküler endotel hücreleri.

ABSTRACT

The relation of Rho/Rhokinase pathway and nitric oxide in rat coronary microvascular endothelium cell culture

In this study, we aimed to investigate possible relationship between Rho/Rho-kinase pathway and nitric oxide in rat coronary microvascular endothelial cells. Therefore, we cultured rat coronary microvascular endothelial cells.

The effect of nitric oxide (NO) donors, glyceryl trinitrate (GTN, 10^{-7} M- 10^{-8} M), sodium nitroprusside (SNP, 10^{-7} M- 10^{-8} M), DETA-NO (10^{-5} M- 10^{-6} M) and NaNO_2 (10^{-3} M- 10^{-4} M) and calcium ionophore A-23187 that induces NO synthesis and expression via increasing the intracellular calcium concentration, on the expression of ROCK enzyme (ROCK-1, ROCK-2) was investigated on basal as well as thrombin-stimulated conditions.

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 % CO_2 .

The third passage coronary microvascular endothelial cells was made quiescent 24 hours before experimentation and than NO donors, A-23187 or the Rho-kinase inhibitor, Y-27632 was incubated.

After the incubation, the medium of flasks incubated with Y-27632 was taken and their nitrit-nitrate levels were measured by Griess method. The cells incubated with the other drugs was homogenized for measuring ROCK (ROCK-1, ROCK-2) enzyme expression levels by Western-Blotting technique.

As a result, NO donors and A-23187 increasing NO synthesis, downregulated the expression of contractile protein Rho-kinase in the coronary microvascular endothelial cells. This finding indicates a new mechanism of action of NO donors and A-23187 that induces NO synthesis.

Key Words; Rho/Rho-kinase, nitric oxide, NO donors, calcium ionophore A23187, coronary microvascular endothelial cells.

1. GİRİŞ

Endotel şimdilerde kan ve damar duvarı arasında sadece fizyolojik bir bariyer olmanın dışında aynı zamanda çoklu endokrin ve parakrin fonksiyonları olan önemli ve stratejik lokalizasyonlu bir organ olarak tanımlanmaktadır. İlâveten hemodinamik değışiklikleri ve dolaşım kaynaklı sinyalleri algılayabilir ve vazoaaktif maddeler salarak bunlara cevap verebilir. Fizyolojik şartlarda endotelium vasküler kontraksiyon, lökosit adhezyonu, vasküler düz kas hücre büyümesi ve trombosit agregasyonu üzerinde bir dizi biyolojik molekülün üretimi yoluyla inhibitör bir regülatör olarak rol oynar (1).

Endotelden salınan nitrik oksit, prostasiklin, endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF), gibi vazoaaktif maddeler mikrosirkülasyonun regülasyonunda önemlidir (2). Nitrik oksidin sentezi, vasküler endotelde, 135 kDa ağırlığında yapısal olarak eksprese edilen endotelyal nitrik oksid sentaz (eNOS) enzimi tarafından gerçekleştirilir (3).

Vasküler tonusun regülasyonunun ötesinde NO'in antitrombotik, antiinflamatuvar, antiaterojenik, ve antiapoptotik özellikleri de vardır (1).

Akım stresi (shear stress), asetilkolin, bradikinin, P maddesi ve serotonin gibi ekstrasellüler sinyallere cevap olarak intrasellüler Ca^{2+} düzeylerinin artması Ca^{2+} -kalmodulin kompleksini aktive eder. Bu kompleks eNOS'u aktive eder. eNOS aktivasyonu sonucu da L-argininin L-sitrülline dönüşümü sırasında nitrik oksit açığa çıkar. Açığa çıkan nitrik oksit solubl guanilil siklazın aktivasyonu yolu ile GTP'den sGMP oluşumunu sağlar ve bu yolla nitrik oksidin biyolojik etkileri gerçekleşmiş olur (4).

Serotonin, asetilkolin, karbakol ve fenilefrin gibi agonistler, fosfatidil inozitol kaskadını aktive ederek sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesini artırır. İntrasellüler kalsiyum düzeyindeki artış sonucunda kalmodulin aktive edilir ve kalsiyum-kalmodulin kompleksi oluşur. Kalsiyum kalmodulin kompleksi, myozin hafif zincir kinaz enzimini aktive ederek miyozin hafif zincirini fosforile eder (5).

Düz kas ve diğer kontraktıl hücrelerin kasılma mekanizmasında Ca^{2+} hayati öneme sahiptir fakat, son zamanlarda miyozin hafif zincir fosforilasyonunun ve dolayısıyla kasılma gücünün intrasellüler Ca^{2+} düzeylerinden bağımsız olarak da sürdürülebileceği bildirilmiştir. Buna "kalsiyum duyarlaşması" adı verilir (6).

Daha sonra yapılan çalışmalar agonistle indüklenen Ca^{2+} duyarlaşması için bir GTP bağlayıcı proteine ihtiyaç olduğunu göstermiştir (7). GDP/GTP bağlayıcı bir protein olan Rho ve onun aktive ettiği Rho-kinaz söz konusu kalsiyum duyarlaşmasına sebep olmaktadır. Bu etkide ana mekanizmanın miyozin hafif zincir stimülasyonundan çok, Rho-kinazın miyozin hafif zincir fosfatazı inhibe etmesi olduğu iddia edilmektedir (5).

Öte yandan nitrik oksidin rezistan arterlerde oluşturduğu gevşemenin vasküler düz kastaki Ca^{2+} düzeylerinde bir düşme ile ilişkisi olmadığı, buna karşılık Rho/Rho-kinaz sinyalizasyonu ile kontrol edilen Ca^{2+} duyarlaşmasını inhibe ettiği bildirilmiştir (8).

Diğer taraftan Rho/Rho-kinaz yolağının endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimini negatif olarak regüle ettiği ve onun ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmektedir (9). Rho/Rho-kinaz sinyalizasyonu endotel hücrelerinde intrasellüler kavşak bütünlüğü ve aktomyozin kasılmasına bağlı olarak endotelial permeabiliteyi düzenler (10).

Trombin ve histamin endotelial hücrelerde in vitro sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonlarında benzer şekilde artışa neden olur (11). Bu ajanlarla indüklenen Rho/Rho-kinaz yolağı, endotelial kontraktiliteye ve buna bağlı olarak permeabilite artışına neden olur (12). Endotelial hiperpermeabilite, hayatı tehdit eden ciddi bir klinik komplikasyondur ve altta yatan mekanizmaların daha iyi anlaşılması, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir (13).

Artan kanıtlar, Rho/Rho-kinaz sinyalizasyonunun endotel hücrelerinde intrasellüler kavşak bütünlüğü ve aktomyozin kasılmasına bağlı meydana gelen endotelial permeabiliteyi düzenlendiğini göstermektedir (10).

Artmış vasküler permeabilite, inflamatuvar cevapların artışı ile birlikte gerek koroner arterlerde gerekse diğer vasküler yapılarda ateroskleroz benzeri patolojik durumların oluşmasında rol oynar (14, 15). Koroner ateroskleroza bağlı olarak gelişen koroner arteriyel kan akımındaki azalma iskemik kalp hastalığının en önemli sebebidir. Koroner arter daralmasının oranı ve miyokardın cevabına bağlı olarak angina pectoris, miyokard infarktüsü, ani kardiyak ölüm ve konjestif kalp yetmezliği ile birlikte kronik iskemik kalp hastalığı meydana gelebilir (16).

Koroner vazodilatör olarak kullanılan nitrogliserin ve türevi ilaçlar vasküler düz kas hücrelerinde NO açığa çıkartarak koroner ve sistemik vazodilatasyona neden olurlar ve angina pectoris tedavisinde kullanılırlar (17). Ancak bu ajanların endotelial Rho-kinaz ekspresyonu üzerine etkisi bilinmemektedir. Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) vasküler endotelial hücrelerden nitrik oksit üretimi yoluyla kardiovasküler hemostaziste önemli bir düzenleyici rol oynar. eNOS aktivasyonu protein kinaz B tarafından serin-1177 de fosforilasyon yoluyla gerçekleştirilir. Rho/Rho-kinaz yolağı protein kinaz B'nin inhibisyonu yoluyla eNOS fosforilasyonunu negatif olarak düzenlerken protein kinaz B'den bağımsız olarak eNOS ekspresyonunu azaltır (9).

Nitrik oksit, Rho kinaz enzimini ve RhoA aktivasyonu inhibe edebilir. NOS enziminin gerek aktivitesini gerekse ekspresyonunu baskılayabilir. Diğer taraftan selektif Rho-kinaz inhibitörü olarak bilinen Y-27632 'nin, NO düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (18). Endotel hücrelerinin kontraktilesinde ve buna bağlı olarak endotelial permeabilite artışında Rho/Rho-kinaz yolağının esansiyel rol oynadığı bildirilmiştir. Öte yandan Rho/Rho-kinaz yolağı ile endotel hücrelerinin ürettiği ve salıverdiği nitrik oksit arasında bir etkileşmenin olabileceği de bildirilmektedir.

Sonuç olarak, Rho/Rho-kinaz yolağının endotel hücrelerinin gerek salgılama, gerekse bariyer fonksiyonlarına karıştığı görünmektedir. Diğer taraftan bu yolağın koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründeki NO salıverme kapasitesi üzerine etkileri araştırılmamıştır. Ayrıca NO-donörlerine uzun süreli maruziyetin, bu hücrelerde Rho-kinaz enzim ekspresyonuna etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründe angina pectoris tedavisinde kullanılan nitrogliserin ile sabit bir şekilde uzun süreli NO salıveren DETA-NO (19) adlı bileşiğin, sodyum nitroprusiyatın, sodyum nitritin ve A23187'nin Rho-kinaz enzim ekspresyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve ayrıca Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632'nin endotelial NO üretim kapasitesi üzerindeki etkisini araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endotel

Endotel hücreleri 10-15 µm genişliğinde, 20-25 µm uzunluğunda uzamış nukleusları ile damarın uzun eksenini boyunca sıralanmış poligonal hücrelerdir. Bu hücrelerin yüzeylerinin bazen mikrovillus bazen de kıvrım boyutunda uzantılı olması fonksiyon yüzeyini arttırmaktadır. Bu hücreler birbirlerine iki şekilde bağlanmışlardır:

-Sıkı bağlantı birimleri (Tight junction) : İntersellüler aralık boyunca permeabilite kontrolünü üstlenir.

-Birleştirici bağlantı birimleri veya aralıkları (Gap junction): Hücreler arası iki yönlü etkileşmeyi sağlar. Arteriollerde gap junctionlar kuvvetli iken venüllerde daha gevşektir.

Endotel katmanı kan ile dokular arasında seçici bir baraj oluşturur. Gaz geçirgenliği oldukça fazla olan bu katmanın sıvı geçirgenliği azdır (20)

2.1.1. Endotel Hücresinin Fizyolojisi

Endotel artık sadece kan ve damar duvarı arasında fizyolojik bir bariyer değil aynı zamanda çok çeşitli endokrin ve parakrin fonksiyonu olan önemli ve stratejik lokalizasyonlu bir organ olarak kabul edilmektedir. Fizyolojik şartlarda endotel, vasküler kontraksiyonda, lökosit adhezyonunda, vasküler düz kas hücre büyümesinde ve trombosit agregasyonunda inhibitör bir düzenleyici olarak rol oynar (21).

Endotel tabakasını endotelial hücreler ve subendotelial bölge oluşturmaktadır. Endotel hücreleri etraflarındaki mekanik, kimyasal veya humoral değişiklikleri algılar, aldıkları sinyalleri işler ve çok sayıda endojen faktörleri sentezleyip salıvererek bu sinyallere yanıt verirler (22).

2.1.2. Endotel Hücresinin Fonksiyonları

2.1.2.1. Vazomotor Fonksiyon

Endotel hücrelerinin en önemli fizyolojik fonksiyonlarından birisi kendi içinde sentezleyip salıverdiği vazoaaktif faktörler aracılığı ile vazomotor fonksiyonun düzenlenmesidir. Prostanoidler, nitrik oksit veya nitrik oksit içeren bileşikler (Endotel kaynaklı gevşetici faktörler, EDRF), serbest oksijen radikalleri, endotelinler, anjiotensinler, düz kas hücresi hiperpolarizan faktörleri ve endotel kaynaklı kasıcı faktörler endotel aracılı vazomotor yanıtta rol oynayan temel bileşiklerdir. Vasküler endotel hücrelerinden salınan prostasiklin (PGI_2) güçlü antiagregan, vazodilatör, profibrinolitik bir maddedir ve dolayısı ile endotel hücrelerine trombozist ve vazodilatör özellikler kazandırır. Ayrıca endotel hücrelerinde siklooksijenaz, lipooksijenaz ve sitokrom P-450 bağımlı monoooksijenaz yolları aracılığı ile arasıdonik asidin monohidroksi, dihidroksi ve epoksi türleri gibi diğer eikozanoidler sentezlenir ve bunlar vasküler tonusu etkiler (22). Endotel hücrelerinden salınan nitrik oksit prostasiklinin vazoaaktif etkilerinden çoğunu içermektedir. Düz kası gevşetir, trombosit agregasyonunu inhibe eder. Diğer taraftan NO, varolan EDRF'lerden sadece bir tanesidir. Nitrozotiller, dinitrozil demir sisteinler gibi nitrik oksitten daha dayanıklı başka maddeler de NO'e mal edilen damar düz kas gevşemesine etkide aracılık etmektedir. Bu maddeler nitrik oksidin hücre içinde depolanmasını da sağlamaktadır. Nitrik oksit'in membranda hiperpolarizasyon oluşturmadığı iddia edilmektedir. Bu nedenle de hiperpolarizan faktörlere aday olarak gösterilmemektedir. Bu etkiyi oluşturan bileşiklere "endotel kaynaklı hiperpolarizan faktörler" (EDHF) adı verilmiştir. Fizyolojik zeminde prostasiklin ve tromboksan A_2 üretimiyle EDRF/NO ve serbest oksijen radikallerinin üretimi arasında bir denge söz konusudur ve bu denge damar duvarının tonusunu düzenler.

Endotel hücresi içinde bu mediatörlerin dengesinde oluşan bir bozulma kan hücrelerinin endotel üzerine non-fizyolojik adhezyonuna, vazokonstriksiyona ve sonuçta çeşitli patolojilere neden olmaktadır (22).

2.1.2.2. Mikrosikülasyonun Düzenlenmesi

Endotel hücresi dokuların metabolik gereksinimi doğrultusunda yanıt vererek mikrodamarlanmayı düzenlemektedir. Mikrosirkülasyondaki damarlar hücre substratları ve metabolitlerinin temini ve transferini direkt lokal olarak sağlarlar. Endotel hücresi lokal kan akımı değişikliklerine karşı küçük damarların yanıtının düzenlenmesinde rol oynar.

Mikrodamarlar yakın çevrelerindeki oksijen düzeylerindeki değişikliklere karşı duyarlıdır. Oksijen basıncının düşmesi endotel kaynaklı hiperpolarizan faktörlerin salıverilmesine neden olur. Böylelikle damar düz kasında hiperpolarizasyon ve gevşeme gerçekleşir. Bunun aksine oksijen konsantrasyonlarının artması lökotrien üretimine neden olur ve bu mikrovasküler tonusta artış ile birlikte kan akımında azalma ile sonuçlanır. Mikrosirkülasyonla ilgili bir diğer olay reaktif hiperemidir. Reaktif hiperemi başta prostaglandin E₂ olmak üzere endotel kaynaklı siklooksijenaz ürünlerinin ani olarak üretilmesine bağlıdır. EDRF/NO ise kısa süreli fonksiyonel hiperemide aracılık etmemektedir (22).

2.1.2.3 İmmünoloji ve İnflamasyon

Endotel tabakası stratejik pozisyonundan dolayı hem immünolojik, hem de inflamatuvar yanıtta önemli rol oynamaktadır. Endotel hücrelerinde hücre adhezyonu, aktivasyonu ve migrasyonu gibi olaylarda adhezyon moleküllerinin ekspresyonu, lökosit aktivasyonu ve lokal sitokinlerin aktivitesi rol oynamaktadır.

Endotel hücrelerinin lökositlerle etkileşiminde rol oynayan adhezyon molekülleri üç grupta değerlendirilir. Lenfosit ve nötrofillerle etkileşimde aracı selektinler, T ve B lenfositler için antijen spesifik reseptörler içeren immünglobulinler, trombosit adhezyonunda ve hücre migrasyonunda rol oynayan integrinler bu üç grubu oluşturur.

İnterlökin-1, TNF α , TGF- β , gibi sitokinler veya bakteriyel endotoksinler endotel hücrelerinde IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin yapımını uyarır. IL-8 sekresyonunu indükler. IL-8 polimorfonükleer lökositlerin endotel tabakasının oluşturduğu bariyer boyunca transendotelial migrasyonunu düzenlemektedir. Sitokinler veya trombin endotel hücrelerinde endotelial hücre lökosit adhezyon molekülü-1 (ELAM-1) ile intersellüler adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarır.

Endotel hücreleri aktive olduğunda olayı tetikleyen bir faktör olan trombosit aktive edici faktör (PAF) üretimi de gerçekleşir. PAF adhezyon moleküllerinin üretimini de hızlandırır. Selektin ve ELAM-1 endotel hücrelerinde saatler içinde sentezlenir ve polimorfonükleer lökositlerle monositleri parçalar. ICAM-1 ve ICAM-2 immünglobulin ailesinin üyeleridir. ICAM-1 polimorfonükleer lökositler ve lenfositlerin adhezyonunu hızlandırır. ICAM-2 ise T

ve B lenfositlerin endotel hücrelerine bağlanmasına aracılık eder. Endotel hücrelerinin indüklenebilir yüzey immünglobulinlerinden bir diğeri de vasküler hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1)'dir. Bu lenfosit ve monositleri bağlar.

Endotel hücreleri bir de major histokompabilite kompleksinin (MHC) klas I antijenlerini eksprese edebilmektedir. Fakat endotel hücrelerinin dolaşımdaki lenfositlerle etkileşmesinde etkili olan MHC-II antijenleridir. Endotel hücrelerinden bazal şartlarda yapısal olarak MHC-II ekspresyonu bulunmaz. Ancak aktive T hücreleri tarafından indüklenebilir. MHC-II ekspresyonu gerçekleştiğinde endotel hücreleri antijen sunan hücre olarak kabul edilirler ve T hücre yanıtının oluşmasını tetiklerler. Uyarılmış endotel hücreleri GMP-140 adında trombositleri bağlayan bir yüzey reseptörünü de sentezlerler (22).

2.1.2.4. Koagülasyon

Endotel tabakası birbirinden ayrı 4 ayrı mekanizma ile intravasküler koagülasyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

- Tromboregülatör bileşiklerin üretimi
- Fibrinolizisin düzenlenmesi
- Prokoagülan proteinlerin inhibisyonu
- Prokoagülan yollara katılma

Endotel hücresi yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK), Faktör V, Faktör VIII ve doku faktörü gibi bazı faktörleri üreterek koagülasyon kaskadına katkıda bulunur. Doku faktörü endotel hücrelerinden sentezlenen ve subendotelial bölgede bulunan prokoagülan bir enzimdir. Bazal sekresyon düzeyi düşük olmakla birlikte uyarı yada yaralanma olduğunda salınımı yaklaşık 10 ile 40 kat artar. Ayrıca endotel hücrelerinin yüzeyinde yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK) ve faktör VIII, IX, IXa, X ve Xa için bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Endotel hücrelerinin yüzeyinde Faktör VIII ve X'un bulunması bu hücrelerin faktör IX'a afinitesini düşürür. Böylece faktör IX'un aktivasyonu ve bağlanması gerçekleşir ve endotel yüzeyinde IXa-VII komplekslerinin oluşumu tetiklenir. Faktör IXa endotele bağlandıktan sonra yıkımı faktör VIII ve X tarafından inhibe edilir. Bu sayede endotel bağımlı prokoagülan aktivitenin devamlılığı sağlanır.

Endotel hücresi çeşitli tromboregülatör maddeler içinde kaynak hücrelerdir. Bu maddeler trombus oluşumunun erken fazlarında fizyolojik yanıtı düzenlerler. Bu maddelerin başında prostanoidler gelir. Prostaglandin I₂, trombosit agregasyonunu inhibe eder ve tromboksan A₂ bunun tersine agregasyonu artırır. Bir diğer tromboregülatör madde EDRF/NO'tir. Nitrik oksit trombosit adhezyonunu ve aktivasyonunu önler.

Endotel hücre yüzeyi ektonükleotidazları, bir diğer tromboregülatör faktördür. Bu maddeler adenozin difosfatı metabolize ederek trombositlerin kümelenmesini önler ve oluşan adenozin trombosit içinde sAMP düzeylerini artırır ve sonuçta trombosit aktivasyonu inhibe olur (22). Normal damar sisteminde pıhtılaşmayı önleyen en önemli faktörler olasılıkla;

-Endotelin düzgünlüğü; ki bu intrinsek pıhtılaşma sisteminin aktivasyonunu önler,

-Glikokaliks tabakası; endotelin iç yüzüne adsorbe olan mukopolisakkarit pıhtılaşma faktörlerini ve trombositleri iterek pıhtılaşmanın aktivasyonunu engeller.

Endotel membranına bağlı bir protein olan trombomodulin trombinin bağlar. Trombomodulin ile trombinin bağlanması pıhtılaşmayı yalnızca trombinin ortamdaki uzaklaştırmak sureti ile önlemez, fakat trombomodulin-trombin kompleksi bir plazma proteini olan protein C'yi de aktive eder ve protein C, Faktör V ve VIII'i inaktive etmek yolu ile antikoagülan etkinlik gösterir. Endotel duvarı hasarlandığında, hem düzgünlüğünü ve hemde glikokaliks ve trombomodulin tabakasını kaybeder; bunun sonucunda faktör XII ve trombositler aktive olarak pıhtılaşmanın intrinsek yolu başlatılmış olur. Eğer faktör XII ve trombositler endotel altındaki kollagen ile temas ederse, aktivasyon daha da güçlü olur (23).

2.1.2.5. Miyokard Kontraktilitesinin Düzenlenmesi

Endotelial hücrelerden salınan NO'in kalpte belirgin bir etkisi β -adrenerjik reseptör uyarısı ile oluşan (+) inotropik ve kronotropik yanıtı inhibe etmesidir. NO, vazodilatasyon yapıcı etki ile arteriyel tonusu ve kalp debisini, venöz dönüşü ve ventrikül dolma basıncını, koroner vasküler tonusu ve koroner perfüzyonu değiştirerek kardiyak fonksiyonlara etki eder (24).

2.2. Nitrik Oksit

1980'de Furchgott ve Zawadzki damar preperatlarında asetilkolin ile oluşturulan gevşemelerde endotel bağımlı bir faktörün aracı olduğunu gösterdiler ve daha sonra bu endotel kaynaklı gevşetici faktör olarak (Endotelium Derivated Relaxing Factor, EDRF) olarak adlandırıldı (25). Daha sonraki çalışmalar EDRF'nin yarı ömrünün çok kısa olduğunu ve etkisinin nitrovazodilatörlere benzediğini gösterdi. 1986'da Furchgott ve Ignaro birbirlerinden bağımsız olarak EDRF' nin NO olduğunu düşündüler (22).

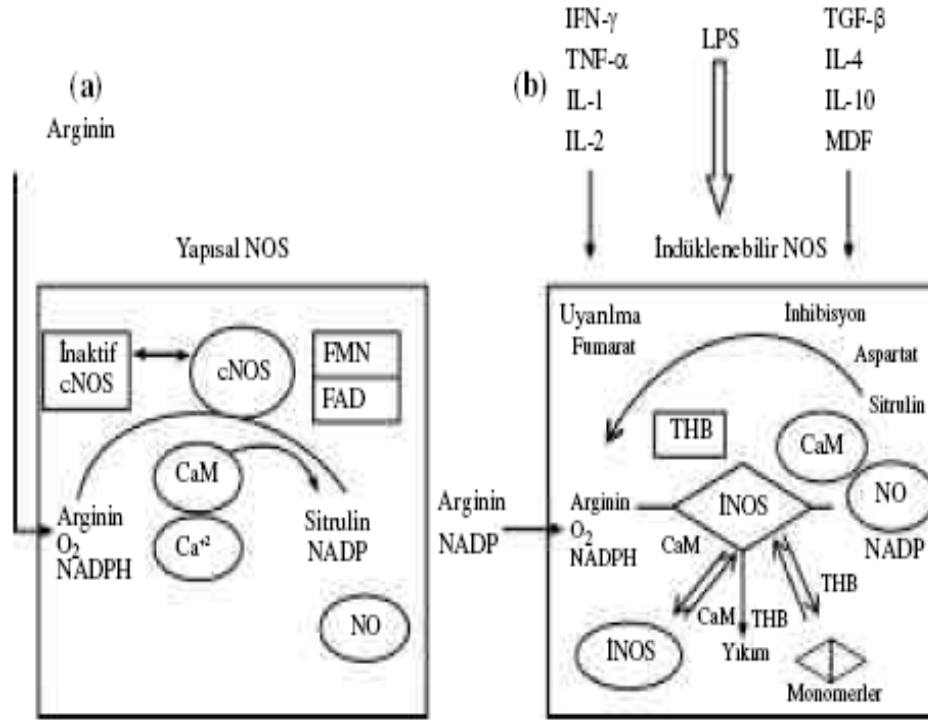
Nitrik oksit siklik guanozin monofosfatta (sGMP)'da artma ve sonuçta damar düz kaslarında gevşemeye (vazodilatasyona) yol açan guanil siklazı aktive eder. Nitrik oksidin yarılanma ömrü saniyelerle ölçüldüğü için sadece üretildiği kaynağın çevresindeki hücreleri etkileyebilir. Bundan başka kısa yarı ömrü, NO'in etkilerinin esas olarak sentez hızı tarafından düzenlendiğini kabul ettirmektedir. Nitrik Oksit kısa ömürlü çözünürlüğü olan, çeşitli hücreler tarafında üretilen, şaşırtıcı sayıda efektör fonksiyona aracılık yeteneği olan serbest radikal bir gazdır. Santral sinir sisteminde, kan akımı gibi nörotransmitter salınımını düzenler. Makrofajlar tarafından mikroorganizmalar ve tümör hücrelerine karşı sitotoksik bir metabolit olarak kullanılır (16).

Nitrik oksit nörotransmisyon veya vasküler tonus (çözünür guanilil siklaz aktivasyonu ile) gen transkripsiyonu ve mRNA translasyonu (Fe-duyarlı elementler aracılığı ile) ve proteinlerinlerin posttranslasyonel modifikasyonu (adenozin difosfatın ribozillenmesi ile) gibi yaşamsal fonksiyonları kontrol edebilir (26). Daha yüksek konsantrasyonlarda NO, Fe bağlı enzimleri inhibe ederek veya direkt olarak DNA'ları ile etkileşime girerek parazitleri, tümör hücrelerini harap etme yeteneğine sahiptir (27).

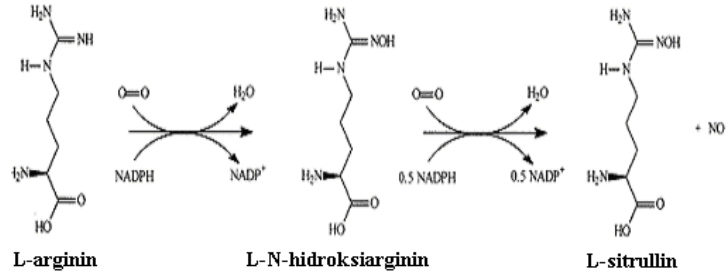
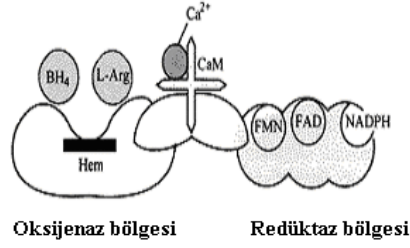
NO'in etkilerinde aracı olan temel faktör sGMP bağımlı kinazların aktivasyonu ile protein fosforilasyonunun sağlanmasıdır. NO düz kası gevşetir, trombosit agregasyonunu inhibe eder. Ancak NO, o kadar da masum bir madde değildir. Uygun şartlarda süperoksit anyonları ile reaksiyona girerek oldukça toksik bir madde olan peroksinitrite dönüşmektedir (22).

2.2.1. Nitrik Oksit Sentezi

NO, L-Arginin, moleküler oksijen ve NADPH'den nitrik oksit sentaz enzimi tarafından sentezlenmektedir (16).

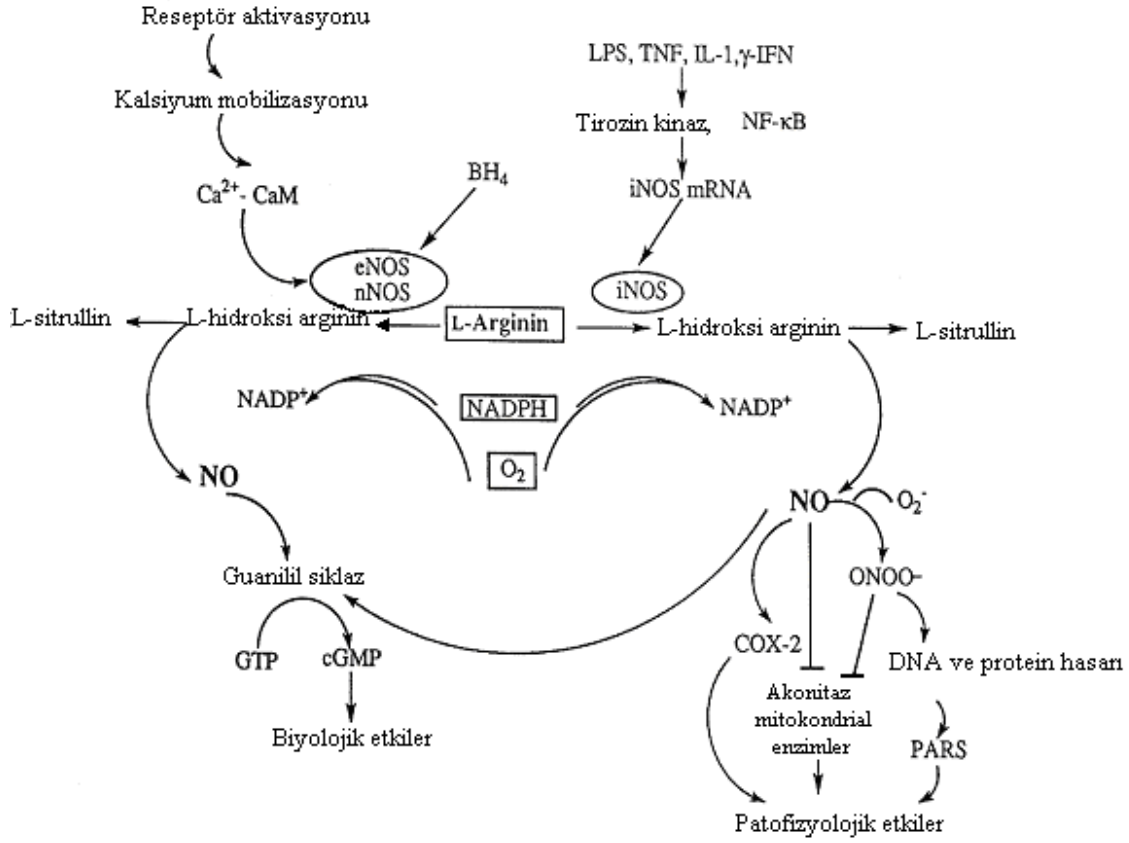


Şekil 2.1 Nitrik Oksit sentezini stimüle eden faktörler (28).



Şekil 2.2 Nitrik oksit sentezi (29).

NOS aktivitesi hücre içine kalsiyum girişi ile düzenlenmektedir. NO, kendi sentezini enzim üzerinde feed-back inhibisyon yaparak kontrol eder. Bu feed-back inhibisyon NO'in hem kofaktörü ile etkileşmesi yolu ile hem de NOS'un NO aracılı protein fosforilasyonunun sağlanması ile oluşmaktadır. Protein fosforilasyonu sGMP bağımlı kinazların aktivasyonu ile sağlanır (22).



Şekil 2.3 Nitrik oksidin sentez ve metabolizması(4).

2.2.2. Nitik Oksit Sentaz Enzimleri

Memelilerde nitrik oksit sentazın üç izoformu tanımlanmıştır ve bu enzimlerin komplementer DNA (cDNA)'ları izole edilmiştir (30).

2.2.2.1. NOS-1 - Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS)

NOS-1, nöronal NOS olarak da isimlendirilmiştir. İlk olarak çeşitli hayvan türlerinin beyinde tanımlanmıştır. Beyinde NOS-1 en çok çözünür enzimdir ve SDS-PAGE'de 160 kDa moleküler ağırlıkla göç eder (31, 32, 33). NOS-1 düşük salınımlı bir enzimdir ve prototipik olarak nöronlarda bulunur. Ca^{2+} 'la aktive kısa süreli pulsatil bir salınımı vardır (30).

NOS-1 ekspresyonu sadece nöronal hücrelerle sınırlanmamıştır. Aynı zamanda omurilik (34), sempatik ganglionlar ve adrenal bez (35, 36) periferel nitreerjik sinirler (37, 38, 39), akciğer epitelyal hücreleri, uterus ve mide (40), böbrek makula densa hücreleri (40), ve pankreatik islet hücrelerinde de (41) tanımlanmıştır.

NOS-1 aynı zamanda insan iskelet düz kas hücrelerinde, kobay, sıçan ve insan rabdomiyosarkom hücre dizilerinde de bulunur. (42, 43, 44, 45).

2.2.2.1.1. NOS-1 Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Birçok hücrede eksprese edilen NOS-1'in ekspresyon düzeyi dinamik olarak düzenlenebilir. Nöronal hücrelerde NOS-1 mRNA upregülasyonu fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlarla oluşturulan stres ve travmaya nöronal hücrelerin cevabı olarak görülebilir. Formalinle oluşturulan ağrı (46), ısı stresiyle oluşturulan beyin travması, aksonal transeksiyon, kolşisin tedavisi veya deneysel alerjik ensefalomyelit (47, 48, 49) ve iskelet kasının kronik elektriksel stimülasyonu (50) bu dinamik değişikliklere örnek verilebilir.

2.2.2.1.2. NOS-1 Aktivasyonunun Düzenlenmesi

NOS-1 Ca^{2+} ve kalmodulin bağımlı bir enzimdir (33, 51). Aktivitesi intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonlarındaki fizyolojik değişimler ile düzenlenir. Böylece, hormonlar ve nörotransmitterler nöronlar ve diğer hücrelerde enzim aktivasyonuna neden olacak intrasellüler Ca^{2+} artışına yol açar (31).

NOS-1 proteini subsellüler lokalizasyondur. Nöronlarda hem membranlar hem de stoplazmada bulunur. Nöronal NOS-1 proteinin %30-60'ı membranaldır (52).

2.2.2.2. NOS-2 - İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)

Enzim ilk olarak sıçan makrofajlarından izole edilmiştir. NOS-2 birçok hücre tipinde sitokinler, LPS ve çeşitli diğer ajanlar tarafından indüklenebilir (53, 54). Makrofajlardaki bu

enzim NOS-2 SDS-PAGE'de 125 kDa ağırlığında moleküler kitleye sahiptir ve genellikle çözünebilir bir enzimdir.

2.2.2.2.1 NOS-2 Ekspresyonunun Düzenlenmesi

İndüklenmeyen hücrelerde NOS-2 ekspresyonu genellikle çok düşüktür veya fark edilmez. Makrofajlar ve diğer hücrelerde bu enzimin ekspresyonunu indüklediği fark edilen ilk ajanlar LPS, IL-1, TNF- α , ve IFN- γ gibi sitokinlerdir (30).

Fakat NOS-2'nin sitokinler tarafından indüksiyonunu engelleyen çok sayıda bileşik bilinmektedir. İlk olarak inhibitör sitokinler ve büyüme faktörleri vardır. IL-4 (55, 56) IL-8, IL-10, monosit kemotaktik protein-1 ve makrofaj deaktive edici faktör, makrofaj ve nötrofillerde NOS-2 indüksiyonunu inhibe eder. Glukokortikoidler, endotelial hücreler, makrofajlar, fibroblastlar ve düz kas hücrelerinde NOS-II indüksiyonunun etkili inhibitörleridir (57, 58). İnsan NOS-2 geni birçok inflamatuvar hastalıkta aşırı eksprese olur. İn vitro, insan hücreleri NOS-2 indüksiyonu için tipik olarak IFN- γ , IL-1 β ve TNF- α içeren sitokin karışımına genel olarak gereksinim duyarlar.

2.2.2.3. NOS-3 - Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS)

NOS-3 ilk olarak endotelial hücrelerde tanımlanmıştır (59). Endotelial NOS-3 % 90'dan fazla membranaldır. Çözünmüş enzim 135 kDa ağırlığında denatüre moleküler ağırlık gösterir (59, 60).

NOS-3 için spesifik antikor kullanılarak yapılan immünohistokimyasal çalışmalarla, enzim çeşitli tipte arteriyel ve venöz endotelial hücrelerde (61), insan plasenta sinsitotrofoblast hücrelerinde (62), böbrek tübül epitel hücrelerinde (63), köpek kolon interstisyel hücrelerinde (64) ve sıçan hipokampus ve diğer beyin bölgelerinde (65) lokalize edilmiştir.

2.2.2.3.1 NOS-3 Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Egzersiz ve akım stresi, NOS-3 ekspresyonunu upregüle eder (66, 67). İnsan primer pulmoner arter endotelial hücrelerinde (68) ve kültüre edilmiş sığır pulmoner arter hücrelerinde (69) ve sığır pulmoner arter endotelial hücrelerinde (70) hipoksi NOS-3 mRNA ve/veya proteinini azaltmıştır. Arnet ve arkadaşları 1996'da sığır aortik endotelial hücrelerinde düşük O₂ basıncında (%1'lik) inkübe edilmiş hücrelerde NOS-3 mRNA ve protein ekspresyonunun upregülasyonunu görmüşlerdir.

2.2.2.3.2 NOS-3 Aktivasyonunun Düzenlenmesi

Ca²⁺ kalmodulin bağımlı bir enzim gibi (59, 60) endotelial NOS-3 intrasellüler serbest Ca²⁺ konsantrasyonlarının artması sonucu olarak agonistler tarafından aktive edilebilir. Benzer şekilde enzim aktivitesinde de değişiklikler olur (31).

2.2.3. Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörleri;

		inhibitör etki
N ^G -monometil-L-arginin	(L-NMMA)	nNOS=eNOS>iNOS
N ^G -nitro-L-arginin	(L-NA)	nNOS=eNOS>>iNOS
N ^G -amino-L-arginin	(L-NAA)	nNOS=iNOS>eNOS
7-nitroindazol	(7-NI)	nNOS=eNOS=iNOS
L-N ^G -nitro arginin metil ester	(L-NAME)	
N-iminoetil-L-orнитin	(L-NIO)	iNOS>eNOS=nNOS
Aminoguanidin	AMG	iNOS>eNOS=nNOS
Agmatin	AGM	eNOS>iNOS>nNOS

(71)

2.2.4. Nitrik Oksid Donörü İlaçlar

- S-Nitrozotoller: NO donörü ilaçların önemli bir grubudur.
- Organik Nitratlar: Nitroglicerine, izosorbide dinitrat ve mononitrat bu gruptandır ve uzun süredir anjina pectoris tedavisinde vazodilatör olarak kullanılmaktadır.

- Demir-Nitrozil Kompleksleri: Na-Nitroprussid vazodilatör olarak hipertansif kriz tedavisinde klinik olarak kullanılmaktadır.

- Sidnoniminler: Bu moleküller Morpholine'den oluşan heterosiklik bileşiklerdir.
- C- nitrozo-bileşikler
- Sekonder amin/NO kompleks iyonlar (41).

2.2.5. Nitrik Oksidin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

2.2.5.1. Kalp

NO'in birçok yönden kardiyak miyosit biyolojisindeki düzenleyici rolü kanıtlanmıştır. NO kalp fonksiyonları üzerinde önemli etkilere sahiptir. NO, kardiyak miyosit kontraksiyonunun düzenlenmesinde fizyolojik öneme sahiptir. Kalp kasında NOS'un üç izoformu da bulunur. Bu üç izoform tarafından da üretilen NO kalp kasında her bir NOS izoformunun ekspresyon ve aktivitesini sıkı bir şekilde düzenler (72).

NOS-1 proteini kobay kalbinde sempatik sinir uçlarında ve hem kolinerjik hem de non-adrenerjik, non-kolinerjik sinir uçlarında gösterilmiştir (40, 73). İnsanoğlunu da içeren çeşitli türlerde ve kemirgenlerde arteriyel kapillerler ve venlerden, ve endokardiyumdan alınan endotel hücrelerinde NOS-3 (eNOS) eksprese edilmiştir (74, 75). Endotel hücrelerine ilaveten bir çok türde atrium, atrioventriküler nod ve ventriküler doku kardiyomiyositlerinde eNOS eksprese edilmiştir. eNOS'un kalpte eksitasyon kontraksiyon olayında potansiyel bir rolü vardır (74,76).

Feron ve arkadaşları göstermiştir ki, endotelial hücrelerde olduğu gibi kardiyak miyositlerdeki palmitoyllenmiş ve myristoyllenmiş eNOS, hücre membranında glikosfingolipidden zengin deterjanda çözilemeyen mikro bölgelerde yerleşmiştir. Bunlar "kaveol" olarak isimlendirilmektedir. eNOS'un kalpte eksitasyon kontraksiyon olayında potansiyel bir rolü vardır (77). Sıçan kardiyak miyositlerinde eNOS, kaveolinin Kaveolin-3 izoformu ile ko-immünopresipite edilmiştir (77). eNOS proteinindeki caveolin-bağlayıcı bölgeler kardiyomiyositlerde eNOS ve caveolin 3 arasında daha önce eNOS ve caveolin-I arasında gösterildiği gibi protein-protein etkileşmesini gösterir (78, 79).

Kalp kasındaki bir çok hücre tipi arasından kardiyak mikrovasküler endotel hücreleri ve kardiyak miyositlerin inflamatuvar stokinler tarafından stimüle edilen iNOS'u eksprese ettiği bilinmektedir (75, 80). Kalp yetmezliği ile sonuçlanan bir çok kardiyovasküler hastalıkta TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyon ve üretimlerinin artmasıyla ilişkili olarak in-vitro iNOS gen transkripsiyonunda arttırdığı bilinmektedir (81, 82). iNOS ekspresyonunun miktarı, kalp yetmezlikli hastaların miyokardiyumunda daha çok heterojenite göstermektedir (81, 83). İskemik kardiyomiyopatiye bağlı ileri evre kalp yetmezliği, sepsis ve miyokarditli hastalarda, iNOS infarkte ve non-infarkte alanlar içeren kardiyak miyozitlerde ve infiltrate makrofajlarda immünolojik olarak bulunmaktadır (84). iNOS aktivitesi değişkendir ve infiltrate olmuş makrofajların miktarı ile ilişkilidir. iNOS'un immünolojik olarak pozitifitesi kardiyomiyopatinin etyolojisi ile çeşitlilik göstermektedir (84).

Bazı çalışmalar iNOS ekspresyonundaki artışı idiyopatik kardiyomiyopati ile sınırlandırmışlardır ve diğer bazıları ise artmış ekspresyonu sadece iskemik koroner arter hastalığına sekonder kalp yetmezlikli hastalarda ve sepsisle ilişkili miyokardiyal disfonksiyonda rapor etmişlerdir (84, 85). Miyokardiyumda farklı hücrelerde iNOS ekspresyonu zamana bağlı olarak değişiklik gösterebilir ve bu şekilde doku örneklerinde hastalığın progresyonu test edilebilir. Kardiyomiyositlerde eksprese edildiği bilinen iki izoform eNOS ve iNOS'dur. Makrovasküler endotelial hücrelerde olduğu gibi, kültüre edilmiş ventriküler kardiyak miyositlerde de eNOS mRNA artışı, TNF- α , interlökin1 β (IL1- β) ve interferon γ (IFN- γ) gibi inflamatuvar sitokinler tarafından baskılanır (74, 86). Kalp yetmezlikli hastaların vasküler yapılarında NO ve endotel bağımlı gevşeme ile ilgili yapılan çalışmalar, kalp yetmezliğinde artmış vasküler rezistans alanlarında eNOS downregülasyonu ile ilgili çalışmalara öncülük etmektedir.

Son yapılan bir çalışmada sıçan ventriküler kası mikrovasküler endotelial hücrelerine karşın kardiyak miyositlerde eksprese edilen eNOS'un farklı regülasyonu gösterilmiştir. Kültüre edilmiş hücrelerin invitro β -adrenerjik agonistler ile tedavisini veya ratların in vivo milrinon ile tedavisini takiben sAMP'deki artışlar, mikrovasküler endotel hücrelerinde değil fakat kardiyak miyositlerde eNOS mRNA'nın selektif downregülasyonu ile ilişkilidir (87). eNOS aktivitesi ve protein düzeylerinin sıçan kalbinde pertusis toksini tarafından etkilendiğine dair kanıtlar vardır (88).

Ca²⁺ dan bağımsız mekanizmalarda akım stresi bazal NO salınımını stimüle eder (89).

Pinsky ve arkadaşları NO sinyallerinin kalbin ön yük ve arka yükündeki değişiklikler tarafından modüle edildiğini göstermişlerdir. Endotelial hücreler, deneysel koşullarda NO üretiminin ana kaynağıdır (90). Elektriksel olarak stimüle edilen erişkin rat ventriküler miyosit kültürlerinde Kaye ve arkadaşları göstermiştir ki, miyositlerde NO üretimi kontraksiyonların sıklığında artış ile aktive edilebilir ve NOS inhibitörleri ile inhibe edilebilir (91).

β_1 ve β_2 reseptörler üzerine etkili olan katekolaminlerin kardiyak miyositlerde protein kinaz A bağımlı L-tipi Ca^{2+} akımının upregülasyonu ve sAMP'yi arttırarak intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonlarını yükselttikleri iyi bilinmektedir. Kültüre edilmiş neonatal ve erişkin ratların ventriküler miyositleri, β_1 veya β_2 agonistlere maruz kaldığında NO salınımında L-NMMA ile inhibe edilebilir bir artışa sebep olur (92). sAMP analogları, GTP'ler ve Ca^{2+} kanallarını aktive eden dihidropridin klasik G protein bağlı β_1 veya β_2 adrenerjik yolla eNOS aktivasyonuna neden olur ve NO sinyalini arttırır.

İnsan ventriküler kasında (-) inotropik etkisi olduğu daha önce gösterilen β_3 adreno reseptör aktivasyonu eNOS aktivasyonu ile birlikte ve intrasellüler sGMP konsantrasyonlarında L-NMMA ile inhibe edilebilir bir artışı içerir (93). Hem sGMP de hem de (-) inotropik etkideki artışların pertusis toksini ile tamamen inhibe edilmesi kuvvetli bir şekilde göstermektedir ki insan kalbinde β_3 adreno reseptörler $G_{i/o}$ proteinleri yoluyla NOS aktivasyonu ile bağlantılıdır (94).

Kardiyomiyositlerde predominant olarak eksprese edilen muskarinik (M_2) reseptörler kalp hızı ve kontraksiyon gücü üzerinde asetilkolinin negatif etkilerine aracılık eder ve bunu G_{ai} bağımlı adenilsiklaz inhibisyonu veya potasyum akımlarına (IK-Ach) spesifik G_{aq} bağlanması ile yapar (95). Rat kalplerinden izole edilen ventriküler miyositlerde muskarinik reseptör stimülasyonu reseptörlerin kaveolaya transloke olmasına öncülük eder ki, burada fosfoinositid yolunun komponentleri (fosfolipaz C içerir), sarkoplazmik retikulum Ca^{2+} salınım kanalları ve eNOS ko-lokalize olmuştur (77).

Endotelial hücrelerde bir kaveolin/eNOS düzenleyici siklus mevcuttur. Bu protein-protein etkileşmesi e-NOS'a Ca^{2+} bağımlı kalmodulin bağlanması ile denge içerisinde (78). İntrasellüler Ca^{2+} ve kalmodulin bağlanmasıdaki agonist bağımlı artışlar kaveolin ile yer

değiştirerek eNOS'un aktive olmasına öncülük eder ve böylece NOS'un tonik inhibisyonuna aracılık eder.

Muskarinik kolinerjik indüklenmiş intrasellüler cGMP artışı ve kontraksiyon hızında azalma (ki bunların eNOS bağımlı olduğu daha önce gösterilmişti) (96), transfekte neonatal rat miyositlerinde kaveolin-3'ün aşırı salınımını ortadan kaldırır. Tüm önemli sinyal proteinlerinin aynı subsellüler kompartmanda ko-lokalizasyonları eNOS aktivasyonu için herhangi bir membran reseptörüne bağlanmayı gerektirir (97).

Sitokinler ve inflamatuvar mediatörler iNOS geninin transkripsiyonel regülasyonuna etki ederler. Bunun yanında yapısal olarak eksprese edilen eNOS'un direkt aktivasyonu ile kardiyovasküler dokuda NO salınımını arttırabilirler. Endotoksin ile indüklenen aortik endotel hücrelerinden NO benzeri bir madde salgılanır (98). Kardiyak miyositlerde IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ve TGF- β gibi birçok sitokinin iNOS ekspresyonu üzerine etkisi çalışılmıştır (99, 100). Bir iNOS öncüsü ile transfekte edilmiş neonatal rat ventriküler miyositleri kullanılarak kardiyomiyositlerde iNOS gen ekspresyonunda anahtar rol oynayan düzenleyiciler tanımlanmıştır. Bunlar NF κ B, IFN-RF, sAMP duyarlı element bağlayıcı proteini (CREB) içerir (101).

Kalp kası hücrelerinde NO'in intrasellüler etki mekanizmaları:

- sGMP bağımlı guanil siklaz aktivasyonu
- sGMP bağımsız mekanizmalar

Galione ve arkadaşları 90'ların başlarında göstermişlerdir ki, cGMP ryanodin kanallarından intrasellüler Ca²⁺ salınımını ADP ribozil siklaz ve ardından sADP riboz artışları ile aktive eder (102). Kardiyak miyositlerde iNOS sitokinler ve endojen NO aracılığı ile indüklenir (103).

L-Tipi Ca²⁺ kanalları S-nitrozotiyoller ile direkt olarak inhibe edilir (104). NO'nun eksitasyon-kontraksiyon kenetlenmesinde (coupling) antagonistik etkisi vardır. Buna ilaveten glikolitik enzimlerde ve mitokondrial solunumda anahtar rol oynayan NO, aynı zamanda oksijen tüketimini ve kalpte ATP tüketimini etkilemektedir (75, 80, 105).

Septik şokta yüksek miktarda NO ve süperoksit anyonu oluşumu, sitokin stimülasyonu altında yüksek iNOS salınımı sonucu meydana gelir. Septik şokta myokardiyal disfonksiyondan, peroksinitrat sorumlu tutulmaktadır (106).

Endokardiyal eNOS tarafından endojen olarak üretilen NO'nun pozitif lusitropik etkisi vardır (107). Bradikinin ile stimüle edilen endotel hücrelerinde parakrin NO üretimi görülmüştür (108). eNOS'un bradikinin ve P maddesi ile stimülasyonu, domuzlarda sol ventrikül diastolik basıncını düşürmüştür ancak sistolik parametrelerde belirgin bir değişiklik oluşturmamıştır (109).

NO salınımını arttırdığı bilinen P maddesi, intrakoronar olarak infüze edildiğinde sol ventrikül sistolik basıncından bir düşüşe neden olmuştur (110). NOS inhibitörleri tarafından eNOS'un inhibisyonu, myokardiyal oksijen tüketimini azaltır. Bu etki NO'nun ufak dozlarının küçük pozitif inotropik etkisi ile koreledir (111). Anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri ile tedavi, endojen NO üretimindeki artışlar ile bazal myokardiyal O₂ tüketimini depresse eder. NO, myokardiyal solunumu modüle eder (112, 113). NOS tarafından endojen olarak üretilen NO, kalp kası üzerinde katekolaminlerin etkisini azaltarak negatif inotropik etki oluşturur (96). eNOS'un inhibisyonu, izoproteronol stimülasyonuna olan pozitif inotropik cevabı potansiyalize eder (114). Endojen NO üretimi, myokardiumda adrenerjik olarak indüklenen ventriküler aritmiler için eşiği yükseltir (115). Endojen NO, β-adrenerjik stimülasyona kontraktıl yanıtı azaltır (116).

Yüksek verimli iNOS tarafından üretilen NO büyük konsantrasyonları myokardiyal depresyona neden olur. İnflamatuvar olaylarda oksidasyon yoluyla depresyona yol açar. İn vitro lipopolisakkarit ve sitokinler ile muamele edilmiş domuz kardiyositlerinde TNFα ve interlökin1 β ile muamele edilen perfüze kalplerde NOS inhibitörleri kontraktıl fonksiyonu iyileştirir. iNOS enzim aktivitesi ve iNOS proteini immünohistokimyasal olarak idiyomatik dilate kardiyomyopati artmıştır ve bu düzeltilmiş kontraktıl performans ile ilişkilidir (83).

İdiyomatik dilate kardiyomyopati ve post partum myopati, immünkardiyomyopati, myokardiyal enfarktüs gibi kardiyak disfonksiyon durumlarında iNOS aktivitesi ve protein düzeyi artar (117). İnflamatuvar sitokinlerden TNFα sepsiste ve kalp yetmezliğinde iNOS indüksiyonunu arttırmıştır. Kontraktıl disfonksiyonda NO üretimi görülmektedir. NOS

inhibitörleri ile tedavide bu durum tersine döner. Kardiyak myositlerde iNOS'un rolü sadece kontraktıl fonksiyonla sınırlı değildir. Viral enfeksiyonlardan sonra myokardiyal hasarın derecesini modüle etmek için iNOS ekspresyonu meydana gelir. NO'nun biyolojik etkileri muhtemelen mikroçevre tarafından etkilenmiştir (72).

NO'un paradoksal doğasına başka bir örnek de kan basıncının regülasyonudur. Kan basıncı sabit bir biçimde NO konsantrasyonundaki fizyolojik yükselme ve alçalmalarla ayarlanmaktadır. Bununla birlikte, endotoksik şokta görüldüğü gibi çok miktarda NO salgısı fatal bir dolaşım yetmezliğine yol açar (118, 119)

2.2.5.2 .Vasküler Düz Kas

Endotelial hücrelerden salınan nitrik oksit arteriel dolaşımında önemli bir regülatördür. Bu yolla doku perfüzyonunda önemli bir rol oynar. Damarlardaki kan akışı endotelyumun lüminal yüzeyinde bir sürtünme kuvveti oluşturur. Bu sürtünme kuvveti sürekli bir NO salınımı için major bir stimulustur.

Endotelin-1, prostasiklin, prostaglandin H₂, superoksit anyonu ve endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör gibi birçok endotelial kaynaklı vazodilatör ve vazokonstrüktör otakoidler bulunmasına rağmen bu otakoidlerden hiçbiri vasküler tonus ve hemostazisin düzenlenmesinde serbest radikal olan NO kadar kilit bir rol oynamaz (120).

Vasküler endotelial hücrelerde bulunan NOS enzimi multidomain bir enzimdir. Heme, L-Arginin ve tetrahidrobiopterin (TH₄) için bağlanma bölgeleri bulunan bir N-terminal oksijenaz bölgesi, flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), nikotin adenin dinükleotid (FAD), nikotin adenin dinükleotid fosfat (NADPH), kalmodulin (CaM) bağlanma bölgeleri bulunan bir redüktaz domainine sahiptir (121). NO'in intrasellüler sGMP konsantrasyonlarını arttırmak için çözünür guanilil siklazı aktive etme yolu ile relaksasyonu arttırdığı tanımlanmıştır. sGMP sırasıyla G kinazı aktive eder ve sonrasında düz kas (Ca²⁺)_i'nu artırır. NO'in düz kas hücrelerinde (Ca²⁺)_i'nu düzenleyen proseslerden bir çoğunu etkilediği gösterilmiştir fakat, bu etkilerin tümü sGMP artışına dayanmamaktadır. NO, G kinazı aktive ederek intrasellüler depolardan Ca²⁺ salınımını azaltır, bu da sırasıyla inozitol trifosfat (IP₃) reseptörlerini fosforile ve inaktive eder (122).

2.2.5.3.Trombositler

Endotel kaynaklı nitrik oksit, trombositlerin adhezyon, agregasyon ve aktivasyonunu guanilil siklazı aktive etmek yolu ile inhibe eder (123). Kültüre edilmiş endotel hücreleri bradikinin ile stimüle edildikleri zaman trombosit adhezyonunu inhibe edebilecek miktarda NO salgırlar (124).

Nitrik oksidin bazal ya da stimüle edilmiş salınımı, endotelyal yaralanmalarda ve agregasyona neden olan ajanlarca oluşturulan trombosit agregasyonunda inhibisyona ve kanama zamanında bir artışa neden olur (125). Buna ilaveten vasküler yapılardan lümene trombositlerdeki sGMP düzeylerini arttıran bir NO salınımı vardır (126).

Tromboksan A₂, adenosin difosfat ve matriks metalloproteinaz, trombosit fonksiyonlarını aktive eden reaksiyonlara arıcılık eder (127). Prostaglandin, ADP az ve nitrik oksit, trombosit inhibitör yolaklarını regüle eder (128). Endotel hücrelerinde L-argininden NO yolağının tanımlanması trombositlerdeki NOS enziminin varlığında olmaktadır (129).

2.2.6. Nitrik Oksidin Diğer Sistemler Üzerine Etkisi;

Nitrik oksit (NO), santral ve periferik sistemde hem serbest oksijen radikali, hem de nörotransmitter olarak işlev gören bir gazdır (130). NO'in noradrenalin ve dopamin salınımı, bellek ve öğrenme, serebrovasküler sistemin ve nosiseptif duyuların düzenlenmesi, koku alma, yemek yeme gibi birçok fizyolojik işlevin gerçekleşmesinde rolü vardır. Son yıllarda NO'in depresyon, bipolar afektif bozukluklar, şizofreni, otizm ve migren gibi nöropsikiyatrik hastalıklardaki rolü yaygın olarak araştırılmıştır (131, 132, 133, 134, 135). Nitrik oksit immün reaksiyonlar sırasında hem makrofajlar hem de nötrofiller tarafından üretilmektedir (136, 137, 138, 139).

Nitrik oksit tümör hücrelerine ve diğer hücrelere sitotoksik olduğu gibi aynı zamanda bir karsinojen olarak da rol oynayabilir. Fizyolojik şartlarda NO sekonder aminleri karsinojenik N-nitroso bileşiklerini oluşturmak üzere nitrozilleyebilir (140).

Nitrit oksit aynı zamanda trombosit fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bazal yada stimüle edilmiş nitrik oksit salınımı bazı agregasyon yapıcı ajanların ya da

endotelial yaralanmanın indüklediği trombosit agregasyonunun inhibisyonu ve kanama zamanında artış ile sonuçlanır (141).

Nitrik oksit bölgesel renal kan akımı, renal otheregölasyon, glomerüler filtrasyon, renin salınımı ve tuz atılımı gibi renal fonksiyonların kontrolünde rol oynayan en önemli parakrin mediatörlerinden birisidir (142). Böbrekten nitrik oksitin eNOS, nNOS ve iNOS formlarının her üçü de salınır (143). Nitrik oksitin böbrek fonksiyonları içerisinde en önemlileri renovasküler direncin azalması, renal kan akımının düzenlenmesindeki basınç değişikliklerine olan yanıtın ve glomerüler filtrasyon oranının azalması, renin atılımının stimölasyonu ve tubuler sodyum reabsorpsiyonunun inhibisyonudur. Aynı zamanda diyabetik nefropati, inflamatuvar glomerüler hastalıklar, septik şokta akut renal yetmezlik ve kronik renal yetmezlik gibi bir çok renal hastalığın patogeneğinde de rol oynamaktadır (144).

2.3. G PROTEİNLERİ

Sinyal ileten G proteinleri GTP azlar kabaca iki sınıfa ayrılır.

- Heterotrimerik G proteinleri
- Tek bir α subunit içeren küçük G proteinleri (p21-ras gibi) (145)

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 (145).

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 (146, 147, 148).

Bu superfamilya yapısal olarak 5 familyaya ayrılır.

-Ras

-Rho/Rac/Cdc 42

-Rab

-Sar1/Arf

-Ran

Birçok hücrel 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 (148).

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 homoloğu RhoA, RhoB, RhoC izlemiştir (149). 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 (150).

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, citron, p140 mDia ve fosfolipaz D gibi efektörler ile etkileşime girer (151).

2.3.2.2. Rho/Rho-Kinaz Yolağı

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

-ROK α (ROCK-2)

-p160 ROCK (ROCK-1 veya ROK β)

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 (152).

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 artırarak aktomyozin bağlanma hızını ve gücünü artırır (153, 154).

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 (155). 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 (154).

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

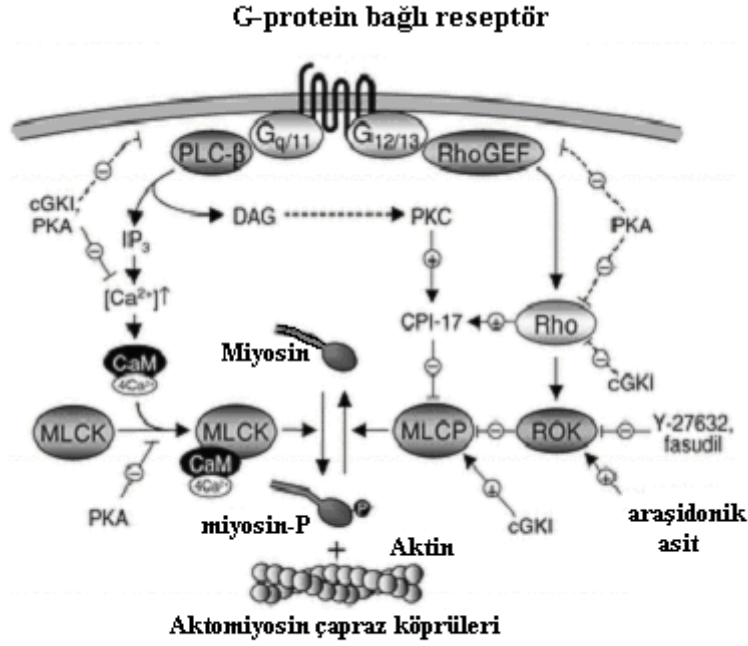
Protein kinazlardan miyozin hafif zincir kinazı 10^{-6} M sitozolik kalsiyum düzeyleri ile aktive olur. Miyozin hafif zincir fosforilasyonu kalsiyum yokluğunda da meydana gelmektedir. Bunun bazal bir miyozin hafif zincir kinaz aktivitesine mi yoksa diğer kinazlara bağlı mı olduğu tartışma konusudur (156).

Şimdilerde integrin bağımlı kinazın kalsiyumdan bağımsız bir şekilde miyozin hafif zincirini fosforile ettiği gösterilmiştir(152, 157). Kalsiyum aracılı bu yolak uzun zamandır miyozin hafif zincir fosforilasyonunun düzenlenmesinde ana mekanizma gibi görünse de, düz kas hücrelerinde kalsiyuma duyarlı 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 (152, 158). Daha sonra yapılan çalışmalar kalsiyumdan bağımsız bu düzenlemenin miyozin fosfatazın inhibisyonu yolu ile olduğunu ve monomerik GTP bağlayıcı protein Rho'yu da içerdiğini göstermiştir (152,153).

RhoA'nın aktivasyonu Rho-kinazın aktivitesine öncülük eder. Rho-kinaz daha sonra enzimin inhibisyonu ile sonuçlanan miyozin fosfatazın düzenleyici miyozin bağlayıcı subünitinin fosforilasyonuna neden olur (152). 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 (152).

Rho/Rho-kinaz yolağı, myozin II'nin miyozin hafif zincirinin (MHZ) fosforilasyon düzeylerini modüle eder, bunu myozin fosfatazın inhibisyonu ile gerçekleştirir ve bu fenomene agonistle indüklenen Ca^{2+} duyarlaşması adı verilir (159). Rho-kinazın en önemli substratı miyozin hafif zincir fosfatazdır ve miyozin bağlayıcı subünitinin Rho-kinaz aracılı fosforilasyonu ile inaktive edilir (160). Rho kinazı inhibe etmek için farklı bileşikler geliştirilmiştir. Bunlar arasında Y-27632 ve fasudil (HA-1077) vardır (152).

Rho/Rho-kinaz yolağının antagonize edilmesi, vazodilatasyona (161), spazmolitik etkiye (162,163,164), penis ereksiyonuna (165, 166), nörotransmitter salınımının inhibisyonuna (167) ve vas deferensin myojenik ve elektriksel aktivitesinin baskılanmasına neden olur (168).



Şekil 2.4 Rho Rho-kinaz yolağı(152).

Rho/ROCK yolu eNOS gen ekspresyonunun ve insan endotel hücrelerinde enzim aktivitesinin süpresyonunda önemli bir rol oynar ki bu azalmış NO salımına sebep olur, ve bu da, ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıkların artmasına sebep olur (150).

Ca²⁺ 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 (7).

Şimdilerde insan endotel hücrelerinde trombinin eNOS gen ekspresyonunu ve RhoA/ROCK yolağı üzerinden bu enzimin aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (9).

Rho-kinaz sadece Rho tarafından değil aynı zamanda araşidonik tarafından da aktive edilir. Araşidonik asit düz kas hücrelerinden çeşitli agonistlere yanıt olarak salınır (169).

2.3.2.3.Rho Rho-kinazın düzenlenmesi

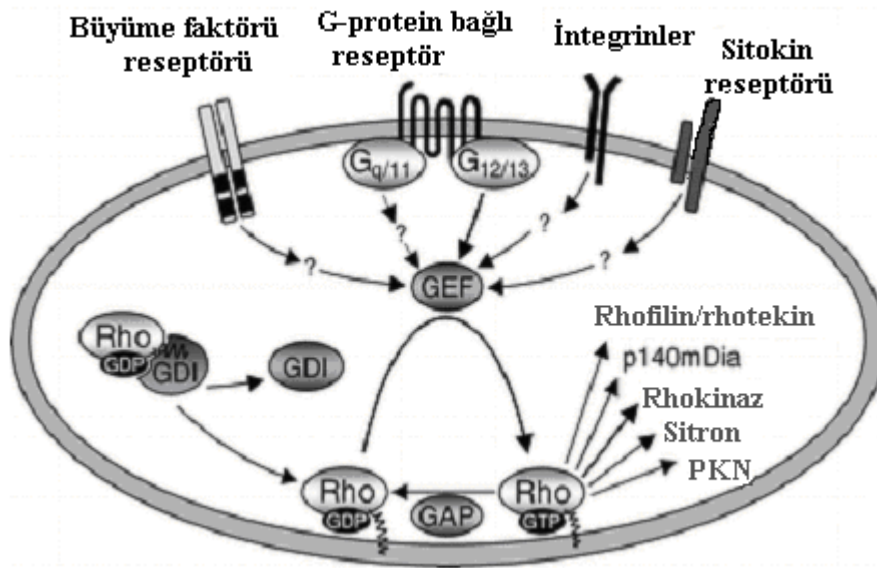
Rho'nun kendi aktivitesi üç grup protein tarafından düzenlenir.

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

-GTPaz ayırıcı inhibitörler (GDIs): Bazı Rho ailesi GTPazlarının membrana bağlanmalarını inhibe eder. Nükleotid ayrılmasını ve aktivasyonunu önler (170).

-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 (171). Rho aktivitesi aynı zamanda çok sayıda G proteini bağlı reseptörler tarafından da düzenlenebilir (172).



Şekil 2.5 Rho aktivitesinin düzenlenmesi (152).

2.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ

2.4.1. Hücre Kültürünün Tanımı

Hücre kültürü canlı bir doku ya da organdan alınan küçük bir parçanın in vitro ortamda büyütülmesi ve çoğaltılması işlemidir. Günümüzde sitogenetik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik çalışmalarda tanı ve araştırma amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır. Hücre kültürleri primer olarak doku eksplantları veya hücre süspansiyonlarından meydana gelir (173).

Hücre kültürleri kaynaklarına ve büyüme biçimlerine göre sınıflandırılırlar.

Kaynaklarına göre;

a-Primer kültürler: Hücre yada doku izole edildikten sonra yapılan ilk kültüre primer kültür denir. Primer kültürde hücre soyu sonludur yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölürlür. Bu nedenle primer hücrelerle belirli bir sayıda pasajlama yapılabildiğinden deneyler bu dönemde yapılmalıdır. Primer hücrelerde çalışılabilecek pasaj sayısı hücre tipine göre değişmektedir. Primer hücreler pasajlamalar sonunda ölümsüz (immortalize) olabilirler. Bu durumda hücre soyu (cell line)'lar elde edilmiş olur. Buna in vitro transformasyon denir. Bu hücreler anöploidirler. Örneğin, primer aortik, mikrovasküler ya da göbek kordonu endotel hücreleri, primer hepatositler, primer düz kas hücreleri

b-Hücre soyları (Cell-line'lar): Primer kültürden spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden yada kimyasal ajanlar yada virusler eklenerek insan eliyle oluşturulurlar. Tümör dokusundan alınan hücrelerden de elde edilirler.

Hücre soylarının primer kültürlerden farkı;

- kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri,
- büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim duymaları,
- çoğalmak için bir zemine tutunma gereksinimlerinin daha az olması,
- sonsuz çoğalma yetenekleri, (bu özellikleri ile tümör hücrelerine benzerler)

Büyüme biçimlerine göre ise yine ikiye ayrılırlar:

1- Süspansiyon kültürler: Kan, dalak, kemik iliği ve olgunlaşmamış hücreler bu şekilde kültüre edilirler. Bu kültürler kültür kabına yapışma göstermezler.

2- Monolayer (tutunarak büyüyen) kültürler: Ekdoderm ve endodermden oluşan hücreler (fibroblast ve epitel hücreleri) ekstrasellüler matrix olarak adlandırılan ve kollagen, fibronektin, laminin, proteoglikanlar gibi makromoleküllerin bir karışımı olan kompleks bir yapı üzerinde bu yapıdaki moleküllerle membran reseptörleri aracılığı ile etkileşerek büyürler. Bu etkileşimi sağlayan membran proteinlerinin en önemlileri integrin adlı heterodimerik proteinlerdir (174).

2.4.2. Hücre Kültürünün Kullanım Alanları

Hücre kültürünün amacı bir grup hücreyi yaşatmak, ileri çalışmalar için çoğaltmak ve gerektiğinde kullanmak için dondurarak saklamaktır. Hücrelerin çoğaltılması yapılacak deney sayısını arttırmayı, deney yapılan pasajdaki hücrelerin dondurulması ise ileride deneyin aynı pasajdaki hücrelerle tekrarlanabilmesini sağlar.

Bu nedenle;

- Aşı,
- Monoklonal Ak.larla, çeşitli enzimler ve hormonların üretimi için,
- Hücre içi aktivite ölçümü,
- DNA, RNA replikasyonu araştırması,
- Protein sentezi,
- Enerji metabolizmasının araştırılması,
- Çeşitli ilaçların hücre siklusuna etkisi,
- Hormon reseptör komplekslerinin davranışları,
- Sinyal iletim mekanizması ve hücre haberleşmesi,
- Hücrelerin beslenme özellikleri,
- Enfeksiyon,
- Viral transformasyon,
- Kimyasal transformasyon,
- Özel ürünlerin sentezlenip salgılatılması,
- Embriyonik araştırmalar,
- Hücre popülasyon kinetiği,
- Adhezyon,

- Sitogenetik analiz,
- Genetik manüplasyon ve immortalizasyon gibi amaçlar için kullanılabilir.

Her aşamada önemli olan hücrelerin canlılığıdır. Hücre kültüründe başarı steril çalışma koşullarının sağlanabilmesinde yatmaktadır.

2.4.3.Hücre Kültürü İçin Gerekli Cihaz Ve Kimyasal Malzemeler

2.4.3.1. Özel Bir Laboratuvar Ortamı

Hücre kültürü laboratuvarlarını diğerlerinden ayıran en önemli özellik kültüre edilmiş hücrelerin sterilitasını ve bunun devamını sağlamak için gerekli aseptik şartların sağlanması gerekliliğidir. Laboratuvar belirli aralıklarla aseptik solüsyonlarla temizlenmeli. En ideali hava filtreli odaların kullanımınıdır ancak bu her zaman mümkün olmaz. Bu hücre kültürü laboratuvarlarında laminar hava akımlı kabinler kullanılır. Hücre kültürü laboratuvarlarında çalışma alanları mümkünse ayrı ayrı odalarda kurulmalı. Eğer aynı mekan kullanılmak zorunda ise de laboratuvar içerisinde çalışılacak alanlar birbirinden mümkün olduğunca izole edilmeli. Hücre kültürü laboratuvarları çalışılacak kişi sayısı da gözönünde bulundurularak en az hareketi gerektirecek şekilde ergonomik olarak düzenlenmeli.

2.4.3.2. Karbondioksitli Etüv

Hücreler %5-10 CO₂'li ortamda çoğalırlar. Çünkü ortamın CO₂ içeriği mediumun NaHCO₃/karbonik asit (H₂CO₃) dengesinde önemli rol oynar. Bu nedenle kültür flasklarının kapakları gaz giriş çıkışına uygun olmalı, yada gevşek kapatılmalı. İnkübatörün kapısı uzun süre açık kalmamalı, sıcaklık düşmesi ve kontaminasyon riski unutulmamalıdır. Kültür ortamının optimal sıcaklığı kullanılan organizmanın vücut sıcaklığına uygun olmalı, şayet

bölgesel değişimler var ise dikkate alınmalıdır. Genellikle 36.5-37 C° hücre kültürleri için uygun sıcaklıktır.

2.4.3.3. Laminar Hava Akımlı Kabin

Laminar hava akımlı kabinlerde temel olarak dışardan alınan ve filtre yardımıyla sterilize edilen hava, fan yardımıyla çalışma alanına gönderilir ve havanın kabin içerisinde sirkülasyonu sağlanır. Kabin içerisindeki havanın büyük kısmı resirküle olurken, küçük bir kısmı hava çıkış filtresi ile dışarı atılır. Horizontal ve vertikal olmak üzere iki ana çeşit vardır. Her iki çeşit laminar hava akımlı kabinde de havadaki partikülleri uzaklaştıran HEPA (high efficiency particle air) filtre kullanılır.

Horizontal kabinler ortamı steril ederken, vertikal kabin de steril edilen hava çalışılan ortamın önünden aşağıya doğru bir şelale gibi akar ve iç ortam ile dış ortamın karışmasını engeller. Ortamda kısa dalga boylu UV ışığı da her zaman için steriliteye katkıda bulunur. İlk başlangıçta ve çalışmaya başladıktan sonra 10-20 dakika açık bırakılır. Her kullanımdan sonra ortam % 70 etanol ile temizlenir.

2.4.3.4. İverted Mikroskop

İverted faz kontrast mikroskop hücre kültürü çalışmalarında çok önemlidir. Kültür devam ederken hücrelerin büyümesi, morfolojik özellikleri ve kontaminasyon olup olmadığı invert mikroskopla takip edilir.

2.4.3.5. Besi Yeri (Toz ya da Sıvı)

Hücrelerin in vitro ortamda yaşayabilmeleri, büyümeleri ve çoğalmaları için uygun besiyerine ihtiyaçları vardır.

İyi bir besiyeri; hücrelerin canlılığını sürdürmelerini, proliferasyonlarını ve diferansiyasyonlarını sağlamalı, esansiyel ve non-esansiyel aminoasitleri, vitaminleri, tuzları,

şekerleri (glukoz), serum, penisilin streptomisin gibi antibiyotikleri, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, P, NaHCO₃, CO₂, gibi iyonları, Fe²⁺, Zn²⁺, selenyum gibi iz elementleri ve kolin, inozitol gibi lipidleri ihtiva etmelidir. Besiyeri kültürü yapılacak hücrelerin ampirik olarak yada özel seçim yapılarak ilgili firmalardan satın alınır. Hazırlanan besiyerine zaman içerisinde L-glutamin ilavesi yapılması gerekir. Besiyerine hücrelerin beslenme ihtiyaçlarını gidermek için mutlaka inaktive serum ilavesi yapılması elzem olarak kabul edilmektedir.

İyi bir besiyerinin pH'sı 7.2-7.3'e ayarlanmalı.(6.8-7.4), pH indikatörü (fenol kırmızısı) içermelidir. Piyasada hazır besiyerleri de mevcuttur. Kullanımları daha kolay olmakla birlikte miadları kısa ve pahalıdır. (Medium 199, MEM, CMRL 1066, DMEM, Ham's F-12, ve RPMI bunlara örnektir.)

2.4.3.6. Fetal Buzağı/Sığır Serumu (İnaktive)

Besiyerine eklenen serum hücre için elzem olan temel bir besin kaynağıdır. Serum, hormonları ve büyüme faktörlerini taşır, pH'yı ayarlar ve farklılaşma faktörlerini ihtiva eder. Bağlayıcı (binding) proteinleri, mekanik hasara karşı non-spesifik koruma faktörlerini ve proteaz inhibitörlerini taşır. Serum plazma proteinlerini, peptidleri, karbonhidratları, lipidleri, mineralleri, büyüme faktörlerini ihtiva eder. Genellikle fetal buzağı serumu ve fetal sığır ve at serumu inaktive olarak kullanılır. Normal aktif serum içeriğindeki komplemandan dolayı hücrelere toksik etki gösterebilir. Bu nedenle inaktive edilmesi gerekir veya hazır inaktive serumlar kullanılır (173).

2.4.3.6. L-Glutamin

Yarı ömrü kısa bir aminoasit olduğundan uzun süre bekleyen besi yerlerine ilave edilmeli. Glutamin nükleik asit sentezinde karbon ve enerji kaynağı olarak rol oynar.

2.4.3.7. Gerekli Diğer Malzemeler

Penisilin/streptomisin, Na-bikarbonat, HCl etanol, cam pipet, silindirik cam şişeler, beher, mezür, cam baget, 0.20 µm'lik filtre, steril konik kültür tüpleri, kültür tabakları, Işık

mikroskobu, +4 ve -30 °C buzdolabı, de iyonize ddH₂O (iki kez distile edilmiş H₂O), enjektör, steril cerrahi eldiven, gazlı bez, UV lamba.

2.4.4. Hücre Kültürü Hazırlanırken Dikkat Edilmesi Gereken Kurallar

Doku ve organlardan alınan eksplantlarla ilgili bilgilerin kaydedilmesi ve amaca uygun besiyeri ortamı hazırlanması gerekir. Kullanılacak aletlerden kültür pipetleri, cam malzemeler, metal aletler otoklavda veya 165 °C’de kuru hava ile 2-3 saat steril edilir. Kuru sıcaklıktan etkilenen cam ve plastik malzemeler, kauçuk malzemeler ile pipet uçları ya 121°C’de 20-30 dk otoklavlanır ya da etilen oksit ile sterilize edilirler. Sıvı maddeler 0.20-0.22 µm çapında filtreler ile steril edilirler. Besi yerine fetal buzağı serumu (FCS) eklenmesinde ise filtreden geçirilmeksizin pipet aid yada steril cam pipet kullanılır. Çünkü fetal buzağı serum içindeki tüm moleküller yapılarından dolayı 0.20 µm’lik filtreden geçemezler. Hassas terazi vazgeçilmez ekipmanlardan biridir. Doğru bir tartım için gereklidir ve temiz kullanılmalıdır. pH metre çalışmadan 30 dakika önce açılmalı ve kalibrasyonu daima yapılmalı. Çalışmalarda kullanılacak tüm sarf malzemeleri saf, taze moleküler biyolojik grade olmalıdır. Hücre kültürü laboratuvarında su ve suyun kalitesi de çok önemlidir. Daima otoklavlanmış bidistile su kullanılmalı. Sıcaklık 36.5-37 C, pH 7.2-7.4 ortamın nemi doygun olmalı.

2.4.5. Kontaminasyon Riski

Bakteriler, mayalar ve funguslar, mold ve mikoplazmalar hücre kültürleri için bilinen kontaminasyon etkenleridir. Kültürdeki herhangi bir bakteriyel kontaminasyonu engellemek için besiyerine uygun dozda antibiyotikler eklenir. Fungal kontaminasyon riski için ise amfoterisin B ilave edilir. Kontamine olmuş bir kültürün pH’sı, makroskopik ve mikroskopik görünümü değişir. Besiyeri bulanık hale gelir ve berraklığı kaybolur. Bakteriler pH’yı düşürürken funguslar yükseltir. Böylece besiyerinin rengi kırmızı ise (bazik) fungal kontaminasyon, sarı ise (asidik) bakteriyel kontaminasyondan şüphe edilir. Bu yüzden çalışmanın her aşamasında aseptik kurallara uyulmalıdır. Özellikle aktif enfeksiyon bulgusu olmayan hücrelerin kültürlerindeki değişikliklerde akla mikoplazma enfeksiyonu gelmeli.

2.4.6. Hücrelerin İnkübasyonu Ve Bakımı:

Hücreler karanlıkta inkübe edilmelidirler çünkü ışık besiyerindeki ve hücre yapısındaki bazı organik yapıları bozarak hücre için toksik hale gelebilir.

Hücre kültürleri günlük olarak kontrol edilir, morfolojik görünüm, medium rengi ve hücrelerin yoğunluğu incelenir. Büyüme kontrolü invert mikroskopla, canlılık testleri trypan blue ile yapılırsa ışık mikroskobuyla, etidyum bromür-akridin oranj ile yapılırsa floresan mikroskopta kontrol edilir.

2.4.7. Farklı Canlı Türlerinde Hücre Kültürleri

Memeli hayvan hücrelerinin kültürü, hücrenin tipine göre bazı farklılıklar göstermekle birlikte temelde aynıdır. Hücrelerin in vitro şartlarda üretilebilmesi için, vücut içi koşulların vücut dışında da sağlanması gereklidir. Bunun için vücut sıvılarına uygun pH değeri ve ozmotik basınçları olan vasatlar hazırlanır. İnkübasyonda bu hayvanların vücut sıcaklıkları ile aynı olacak şekilde hazırlanır. Bu nedenle aynı gruptaki canlılar benzer koşullara gereksinim duyarlar.

2.4.8. Primer Kültür Nasıl Hazırlanır?

Primer kültür hayvan dokuları veya tüm embriyodan, tripsin veya kollagenaz gibi enzimler yardımıyla ya da mekanik olarak ayrılarak hazırlanabilir ve canlı kalabilen, üreyebilen hücrelerin heterojen kültür seleksiyonu ile sonuçlanır. Hücre soyları (cell line) primer kültürlerin subkültürlerinin yapılması ve üretilmesi ile elde edilebilirler. Bu stoğun büyütülmesi ve karakterizasyonunu olduğu kadar, aynı zamanda kullanılmaya hazır çok daha fazla hücre elde edilmesini ve dolayısıyla deneylerin istenildiği kadar tekrarlanmasını sağlar. Bununla beraber hücre çoğalması predominant özellikte olduğu için seleksiyonla yavaş üreyen ya da hiç üremeyen hücreleri elimine edecektir. Sonuç olarak dokuya özel farklılaşma ortadan kalkacak, selektif vasat ya da selektif kültür şartları uygulandığı takdirde bazı özel hücre tipleri ortaya çıkacaktır.

Primer hücre kültürlerinin kullanıldığı en uzun geçmişe sahip alan viral aşuların üretimidir. Zaman içerisinde gelişen teknolojiyle paralel olarak hormon, büyüme faktörleri, interferonlar, immunoregülatörler gibi biyokimyasalların üretimi, antikor üretimi, tanı testleri, implant üretimi, yapay doku ve organ üretimi gibi pek çok konuda kullanılmaya başlanmıştır.

2.4.9. Hücrelerin Birbirinden ve Destek Yüzeyden Ayrılmasında Kullanılan Yöntemler

Canlı organizmada pek çok hücre birbirleri ile çeşitli hücresel bağlarla sıkıca temas halindedir. Ekstrasellüler matriks, salgılanan proteinler ve karbonhidratlardır ve hücrelerarası boşlukları doldurur. Çeşitli hayvan dokularındaki hücre dışı matriks genel komponentleri içerir.

Bunlar;

- Fibröz kollagen proteinler
- Hyaluronik asit
- Büyük moleküllu mukopolisakkaritler
- Kovalent bağlı polisakkaritler
- Proteinler
- Glikoproteinler

Farklı dokularda matriksin kompozisyonu farklıdır. Böylece özel fonksiyonları oluşur. Örneğin bağ dokuda hücre dışı matriksin ana proteini kollagen formundadır ve yüksek gerilme direncine sahip çözünmeyen lifler oluşturur. Bağ dokunun temel hücresi olan fibroblastlar, diğer matriks komponentlerini olduğu kadar bu tip kollajeni de salgılar. Hücrelerin plazma membranlarındaki reseptör proteinleri çeşitli matriks elemanlarını bağlar ve böylece dokunun dayanıklılığını sağlar.

Hayvan hücrelerinin in vivo birbirleri ile ve hücre dışı matriks ile etkileşimi kültür ortamında üremeleri sırasında taklit edilirler. Bakteri ve maya hücrelerinin aksine pek çok hayvan hücresi cam yüzeyine tutunur ve ürer, veya özel olarak (-) yüklü gruplarla (örneğin; SO_3^{2-}) muamele edilmiş plastik yüzeylere tutunarak ürerler. Kültürlerdeki hücre, kollagenler ve diğer matriks komponentlerini salgılar. Bunlar yüzeye bağlanır ve hücreler ile yüzey arasında köprü rolü oynar. Hücreler arası bağlanma, hücre-hücre tutunma molekülleri (CAMs

cell-cell adeshion molecule) ve kalsiyum iyonlarına bağımlı moleküller (cadherins) aracılığı ile gerçekleşir. Hücrelerin destek materyali (örneğin kültür kabı yüzeyine) tutunmasında ayrıca yüzey yüklerinin de rolü vardır. Hücre-matriks ilişkisinde rol alan komponentler: polilizin, kollagen, hücre dışı matriks, laminin, heparan sülfat, vb.

2.4.10. Divalan Katyonların Rolü

Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları hücre dışı matriksin stabilitesini artırır. Vertebralılarda, Ca^{2+} un varlığına bağımlı hücreler arası tutunmada rol oynayan pek çok hücre yüzey glikoproteinleri immunglobulin süperfamilyasına dahildir. Bunların yanında sadece hücre dışı Ca^{2+} varlığında etkin olan başka familyalara ait hücre yüzey proteinleri de hücreler arası tutunmada rol oynamaktadır. Ergin vertebralıların aksine, embriyonik vertebralı dokuların birbirinden ayrılması kolaydır. Bu amaçla düşük konsantrasyonda proteolitik enzim (Örn: tripsin) tek başına veya hücre dışı Ca^{2+} iyonlarının uzaklaştırılması için etilendiamintetraasetikasit (EDTA) ile kullanılır. Bu maddeler protein-protein bağlarını koparır ve hücrelerin tek tek ayrılmasını sağlarlar.

2.4.11. Primer hücre kültürünün Hazırlanmasında Genel Prensipler

Disseke edilerek organizmadan ayrılan doku veya organ mekanik ve enzimatik parçalanma ile hücrelerine ayrılır, yıkama işleminin ardından kültür ortamına aktarılırlar. Organ veya doku, organizmadan asepsi-antisepsi kurallarına uygun olarak çıkartılmalıdır, daha sonraki işlemlerin tümü steril koşullarda vertikal laminar akımlı kabinlerde yapılmalıdır. Diseksiyon sırasında yağ ve nekrotik dokular tamamen ayrılmalıdır. Doku dikkatle olabildiğince küçük parçalara kıyılmalıdır. İşlevleri bittiğinde sindirim enzimleri, nötralize edilmeli ve santrifügasyon ile uzaklaştırılmalıdır, kültüre başlarken hücre konsantrasyonu normal olarak subkültürlerdekenden çok daha yüksek olmalıdır. Aksi önerilmedikçe fetal buzağı serum ilaveli nutritif değeri yüksek zengin bir besi ortamı kullanılmalıdır. Mümkünse embriyonik dokular tercih edilmelidir.

2.4.12. Primer kültürlerin Hazırlanmasında Kullanılan Enzim ve Kimyasallar

Primer kültür hazırlamak veya yüzeye tutunmuş hücreleri ayırmak için tripsin veya diğer proteazlar yardımı ile hücreler arasındaki bağlardaki proteinlerin yıkılması gerekir. Bu amaçla bazı enzim ve bazı kimyasallardan yararlanılır.

Tripsin (%0.1-0.5): Pankreatik enzimdir, proteaz, nükleaz, lipaz, ve polisakkaritlerin karışımıdır. Bazik aminoasitlerin amin grupları ile karboksil grupları arasındaki bağları hidrolize eder.

Pronaz (% 0.05): Streptomyces griceus'dan elde edilir. Tripsinden daha aktif bir enzimler grubudur. Daha iyi seperasyon sağlar. Fibroblastlar için önerilir.

Kollajenaz (% 0.01-0.15): Prolin ile diğer aminoasitler arasındaki bağları hidrolize eder. Hücre membranına değil extrasellüler matrikse etkir. Serum ile inhibe edilmez o yüzden serum varlığında kullanılabilir. Epitelial hücrelerin fibroblastlardan ayrılmasına yardımcı olur. Aktive olması için Ca^{2+} iyonları gerekir. Bu nedenle EDTA ile kullanılamaz. Tip I; yağ hücreleri ve adrenal dokular için, tip II; karaciğer, kemik, tiroid, kalp, tükürük bezi için; tip III; meme dokusu için, tip IV; ise pankreatik hücreler için uygundur.

Elastaz (% 0.05): Pankreatik bir enzimdir. Elastin'e etkilidir, serum tarafından nötralize edilir.

Hyalüronidaz (% 0.1): Bir polisakkaridazdır. Hyalüronik asit ve kondroitin sülfat A ve C arasındaki bağları hidrolize eder. Kollajenaz ile birlikte kullanıldığında epitelial hücrelere daha iyi etkir.

EDTA (etilen diamin tetraasetikasit): Ca^{2+} , Mg^{2+} iyonlarını etkiler.

EGTA (diaminoetoksietan tetraasetikasit): Ca^{2+} iyonlarına etkiler (173).

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. Her izolasyonda aynı cinsten sıçanlar kullanıldı. Endotel hücre izolasyon ve kültürü Ülker ve arkadaşları tarafından daha önce uygulanan yöntemine göre hazırlandı (175).

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 perfüzyat atıldı. Hazırlanan 10 ml Ca²⁺ ile aktive kollagenaz solüsyonu 5'er ml her iki rezervuara eklendi. Bundan sonra kalpler kollajenaz ile 30 dakika resiküle edilerek sindirildi. 30 dk sonra kalpler aortalarından kesildi. Reperfüzyon borularının içinden enfluent alındı.

Daha önce tartılan 200 mg sığır serum albümini (Bovin Serum Albumin, BSA), resirküle olan kollagenazlı Krebsten 10 ml konup sığır serum albümini (BSA) eritildi. Kalplerin atriumları ve yağ dokuları ayrılarak ventriküllerin içleri temizlendi. Ventrikül dokusu parçalandı. Parçalanan ventrikül miyosit hücreleri sığır serum albümini (BSA)+kollajenazlı tüp içine kondu. Bu tüp 37 °C'de 15 dakika oksijenlendirildi. Bu süre içinde ortama sığır serum albümininin eklenmesinin sebebi kollajenazı inaktive etmektir.

Diğer yandan elde edilen koroner perfüze 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+} süz 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 solüsyonu 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 gūnaşırı değiştirilerek konfluent olana kadar Kūltür ortamı-2'de bekletildi. Daha sonra konfluent olan flasklar tripsinizasyon işleminde sonra pasajlanarak çoğaltıldı ve 3.pasajdaki hücreler deneyler için kullanıldı.

3.1.1.Tripsinizasyon ve pasajlama işlemleri

Endotel hücre izolasyonu sonrası primer kūltürü 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 işlemleri sonrası uygun sayıda flaska pasajlanarak yeniden ekildi.

Tripsinizasyon işlemleri için seçilen flaskların kūltür ortamları uzaklaştırılarak flasklar serum fizyolojik ile yıkandı. Bu yıkama işlemleri sonrasında hücreler Tripsin+etilendiamintetraasetikasit (EDTA) solüsyonu ile muamele edilerek tutundukları yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmalari sağlanmış oldu.

Tripsin, proteolitik bir enzimdir ve hücreler arası protein-protein bağlarını koparır. Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları hücre dışı matriksin stabilitesini artırır. Hücreler arası tutunmada rol oynayan hücre yüzey glikoproteinleri Ca^{2+} varlığında etkindir. EDTA, Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarını etkiler (176).

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 Tripsin-EDTA ilavesinden sonra karbondioksitsiz 37°C ortamda yaklaşık 10-15 dakika kadar bekletildi.

Bu bekletme işlemlerinden sonra tripsin+hücre olan flasklar medium ile (Kūltür 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 içlerine Kültür ortamı-2 konmuş flaslara eşit miktarlarda ekilerek pasajlama işlemi tamamlandı.

3.2. Deney Gruplarının Hazırlanması

3.2.1. Nitrit-Nitrat Serileri

Konfluent olan 3. pasaj koroner mikrovasküler endotel hücreleri mediumları alınarak serum fizyolojik ile iyice yıkandıktan sonra 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 200 mM L-Glutamin) renksiz ve serum içermeyen besiyeri ilave edildi.

Nitrit-nitrat serileri 2 grupta toplandı.

1. grup: Üremeleri durdurulan hücreler gece boyu (16 saat) bazal şartlarda bekletildikten sonra mediumlarında nitrit-nitrat tayini yapıldı.

2. grup: Üremeleri durdurulmuş hücreler gece boyu (16 saat) $10^{-5}M$ Y-27632 inkübe edildikten sonra mediumlarında nitrit-nitrat tayini yapıldı.

Flasklar içinde hiç medium kalmayana kadar iyice mediumdan arındırıldıktan sonra bir gece $-20^{\circ}C$ 'de bekletildi. Ertesi sabah buz ısısında serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra üzerine her flaska 350 µl homojenizasyon tamponu [lizis tampon ; TrisHCl (pH 7.4) 50 mM, NaCl 400 mM, EGTA 2 mM, EDTA 1 mM, dithiothreitol (DDT) 1 mM, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) 10 µM, leupeptine 10 µg/ml, pepstatin 1 µg/ml, benzamidine 1 mM] konuldu. Tampon direkt hücrelerin üzerine sıkıldı. Daha sonra flasklar hücre sıyrıcı (cell scraper) ile iyice sıyırılarak elde edilen hücreler ependorflar içinde kaynatıldıktan sonra homojenize edildi. Homojenize edilen hücreler 13.000 rpm'de $+4^{\circ}C$ 'de 5 dakika santrifüj edildi.

Alınan supernatanın 10'ar mikrolitresi (μl) Lowry yöntemi ile protein tayini için kullanıldı.

3.2.2. Rho-Kinaz Ekspresyonlarının İncelendiği Seriler

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 $\mu\text{g/ml}$, amfoterisin B 5 $\mu\text{g/ml}$ 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 5 Ü/ml trombin ile gece boyu (16 saat) stimüle edilmiş hücreler.
- 3. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra gece boyu (16 saat) 10^{-7} M ve 10^{-6} M A23187 ile inkübe edilmiş hücreler.
- 4. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra gece boyu (16 saat) 5 Ü/ml trombin varlığında 10^{-7} M ve 10^{-6} M A23187 ile inkübe edilmiş hücreler.
- 5. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra gece boyu (16 saat) 10^{-8} M ve 10^{-7} M GTN (gliseril trinitrat) ile inkübe edilmiş
- 6. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra gece boyu (16 saat) 5 Ü/ml trombin varlığında 10^{-8} M ve 10^{-7} M GTN (gliseril trinitrat) ile inkübe edilmiş hücreler.
- 7. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra gece boyu (16 saat) 10^{-8} M ve 10^{-7} M SNP (sodyum nitroprussiyat) ile inkübe edilmiş hücreler.
- 8. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra gece boyu (16 saat) 5 Ü/ml trombin varlığında 10^{-8} M ve 10^{-7} M SNP (sodyum nitroprussiyat) ile inkübe edilmiş hücreler.
- 9. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra gece boyu (16 saat) 10^{-4} M ve 10^{-3} M NaNO_2 (sodyum nitrit) ile inkübe edilmiş hücreler.
- 10. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra gece boyu (16 saat) 5 Ü/ml trombin varlığında 10^{-4} M ve 10^{-3} M NaNO_2 (sodyum nitrit) ile inkübe edilmiş hücreler.
- 11. grup:** DMEM'li medium içine alındıktan sonra 8 saat 10^{-6} M ve 10^{-5} M DETA-NO ile inkübe edilmiş hücreler.

12. grup: DMEM’li medium içine alındıktan sonra 8 saat 5 Ü/ml trombin varlığında 10^6 M ve 10^{-5} M DETA-NO ile inkübe edilmiş hücreler.

Bu gruplarda 16 saatin sonunda (ve bazılarında 8 saat sonrasında) flaskların mediumları alındı. Daha sonra flasklar hücre sıyrıcı (cell scraper) ile sıyırılıp hücrelerin mekanik olarak zeminden ayrılması sağlanmış oldu. Flasklardan elde edilen hücreler ependorflarda toplandı. Bu ependorflar 1200 rpm’de 10 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. İlk santrifüjden sonra supernatant atıldı. Pelletlerin üzerine 150 µl homojenizasyon buffer [lisis tampon ; TrisHCl (pH 7.4) 50 mM, NaCl 400 mM, EGTA 2 mM, EDTA 1 mM, dithiothreitol (DDT) 1 mM, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) 10 µM, leupeptine 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 Lowry 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 bovin serum, newborn calf serum, medium 199 Earle, Dulbecco’s MEM (Biochrom) (Leonorenstr., Berlin), trombin bovine (Calbiochem), diethylene triamine/nitric oxide (DETA-NO), sodium nitroprusside, (Sigma), NaNO₂ Merck (Almanya), Gliseril trinitrat (Perlinganit ampül, Melusin İlaç ve Sağlık Mad. Paz. Ltd. Şti., İstanbul) Y-27632 (Tocris Cookson Ltd. Bristol, UK), ECL (Enhanced chemiluminescence) Advance Kit (Amersham Biosciences, Freiburg Germany), anti-ROCK antikorları Santa Cruz Biotechnonolgy Inc,CA, (A.B.D.), A23187 Alomone Labs’dan (Kudüs, İsrail) temin edildi. A23187 dimetilsülfoksit (DMSO) içinde ve diğerleri serum fizyolojik içinde çözüldü.

3.4. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini

Hücre homojenatlarından elde edilen supernatantlarda protein tayini Lowry yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemde proteinlerin önce alkalın solusyon içerisinde bakır-peptid bağlı protein

komplekslerini oluşturmak üzere Cu (2) ile etkileşmesi sağlanır. Folin-Ciocalteu reajanı (fosfotungustik asit-fosfomolibdik asit) eklendiğinde bakır-protein kompleksleri tirozin ve triptofan rezidüleri ile indirgenme reaksiyonu için bağlanır. Fosfotungustik asit-fosfomolibdik asit redükte olarak renk oluşturur. Oluşan renk % 75 oranında Cu (2) komplekslerine bağlıdır (177).

Bu yöntem için sırasıyla şu işlemler yapıldı;

Lowry A (%2'lik Na₂CO₃-0.1 M NaOH içinde), Lowry B (%1'lik CuSO₄ distile su içinde), Lowry C (%2'lik NaKC₄H₄O₆ 4H₂O-Sodyum potasyum tartarat), Lowry stok reajanı (%98 Lowry A, %1 Lowry B, %1 Lowry C), Folin-Ciocalteu reajanı (1/1 oranında distile su ile dilüe), Tampon çözelti olarak 50 mM Tris pH.8 ve standart solüsyonu (1 mg/ml konsantrasyonda sığır serum albümini distile su içinde) hazırlandı.

Standartlar için; 0, 10, 20, 30, 50, 75, 100 µl standart solüsyonu içeren ikişer adet tüpün üzerleri 50 mM Tris pH.8 100'er µl'ye tamamlandı.

Örnek tüpleri için yine çifteli olarak her tübe 10'ar µl örnek konarak üzerlerine 90 µl 50 mM Tris pH.8 ile 100'er µl'ye tamamlandı.

Bu işlemin ardından bütün tüplere 1'er ml Lowry stok reajanı ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Daha sonra tüm tüplere 100'er µl Folin-Ciocalteu reajanı ilave edilerek tekrar 30 dk inkübasyonun ardından spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbansları okundu. Daha sonra elde edilen absorbansların her örnek için ayrı ayrı ortalamaları alınarak Prism programında µl deki protein miktarları belirlendi.

3.5. Western-Blot Analizi.

Koroner mikrovasküler endotel hücrelerinden elde edilen protein karışımında hedef protein olan Rho-kinazın (160kDa) (ROCK-1 ve ROCK-2) varlığını göstermek amacıyla özel bir protein-protein hibridizasyon tekniği olan Western-Blotlama yöntemi kullanıldı.

Yöntem üç aşamada geręekleřtirildi;

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 %8'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 (178).

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

Membran ECL (enhanced chemiluminescence) Advance kit tozu (Amersham Biosciences , Freiburg Germany) veya yağsız süt tozu ve %20'lik Tween-20 içeren Tris solüsyonu (TBS-T) ile 1 saat bloklama işlemine tabi tutuldu. Bu sayede membranların proteinsiz kısımlarının spesifik olmayan bir proteinle tutunması sağlanarak protein yapıda olan primer antikorun bir sonraki aşamada membrana non-spesifik bağlanması engellenmiş oldu.

Bir saatlik bu bloklama işleminden sonra membranlar 3 kez 10'ar dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandıktan sonra ROCK enzimine özgü ROCK-1 (ROK β) veya ROCK-2 (ROK α) (Polyclonal IgG,Santa Cruz Biotechnonolgy Inc.CA, A.B.D.) antikorları ile 1:200 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 (1:1000 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) Advance Kit (Amersham Biosciences , Freiburg Germany) görüntüleme solüsyonu ile 10 dakika karanlıkta muamele edildikten sonra görüntülendi.

3.6. Nitrit-Nitrat Tayini

Nitrit/nitrat düzeyleri Griess yöntemi ile tayin edildi. Bunun için ayrılan flaskların mediumları alındı. Medium içindeki nitrat, nitrat redüktaz varlığında redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH) ile nitrite redükte edildi. Oluşan nitrit sülfonilamid ve N-(1-naphthyl) ethylene-diamin dhydrochloride ile reaksiyona sokularak kırmızı menekşe renk oluşumu sağlandı.

Bu işlem için (NaNO_2)'nin 7.5 g'ı 10 ml dH_2O 'da çözündürülerek 500 mg nitrit/L konsantrasyonda stok solüsyon hazırlandı. Daha sonra bu stok solüsyondan 5-2.5-1.25-0.5-0.25-0.125-0.05 mg/L olacak şekilde dilüsyonlar elde edilerek standartlar hazırlandı.

Total nitrit-nitrat ölçümü için 125'er μl örnekler üzerine 62.5 μl potasyum fosfat tamponunda çözündürülmüş NADPH çözeltisi eklendi. Daha sonra bu karışım içine 5 μl nitrat redüktaz çözeltisi (dH_2O 'da çözündürülmüş) eklendi ve 15-25 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Böylece nitratın nitrite redükte olması sağlanmış oldu. Bu işlemin ardından örneklerin absorbansları 540 nm'de okundu. (A_1). Daha sonra örnekler color reagent 1 ve 2'den her birinden 62.5 μl eklenerek bu kez 15-25° C'de 10-15 dakika karanlıkta inkübe edildi. 540 nm de ikinci kez okutuldu. (A_2).

Birinci ve ikinci okumalardan sonra elde edilen absorbanslardan kör değerleri çıkarıldıktan sonra fark absorbansları hesaplandı.

$$y=[A_2-\text{kör}]-[A_1-\text{kör}]=\text{Fark absorbanslar}$$

$$x=\text{konsantrasyon}$$

$$y=0.0076.x$$

$$x=y/0.0076$$

Bu elde edilen x değeri potasyum nitrata göre hesaplanmıştır. Potasyum nitrat dönüşüm faktr=62.005/101.11=0.613 elde edilen sonuçlar bu değer ile çarpılarak nitrat değerleri bulundu. Sonuçlar standart eğriye göre değerlendirildi.

3.7. Bulguların Değerlendirilmesi

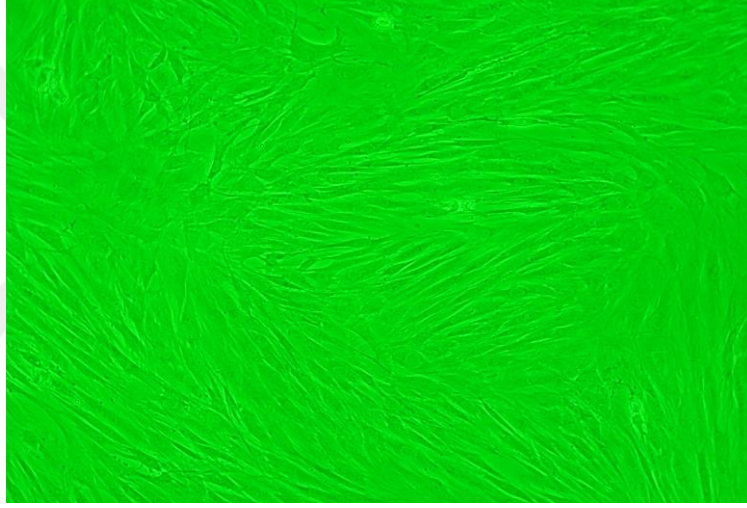
Western Blot tekniği ile elde edilen bantların analizi için Scion Image programından faydalanıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirilme için ANOVA ve Dunnet post hoc testi kullanıldı. $p<0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.



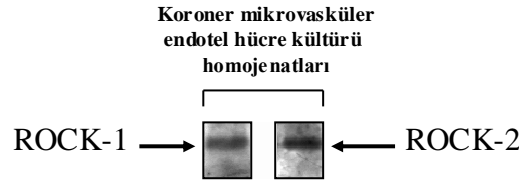
4. BULGULAR

4.1. Kültüre Edilmiş Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücrelerde Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları

Koroner mikrovasküler endotel hücreleri başarılı bir Şekilde izole edilip kültürü gerçekleştirildikten sonra (Şekil 4.1) bazal Şartlarda Rho-kinaz enzimini eksprese edip etmedikleri araştırıldı. Western blot yöntemiyle koroner endotel hücrelerinin her iki Rho-kinaz izoformunu (ROCK-1 ve ROCK-2) da eksprese ettiği tespit edildi (Şekil 4.2).



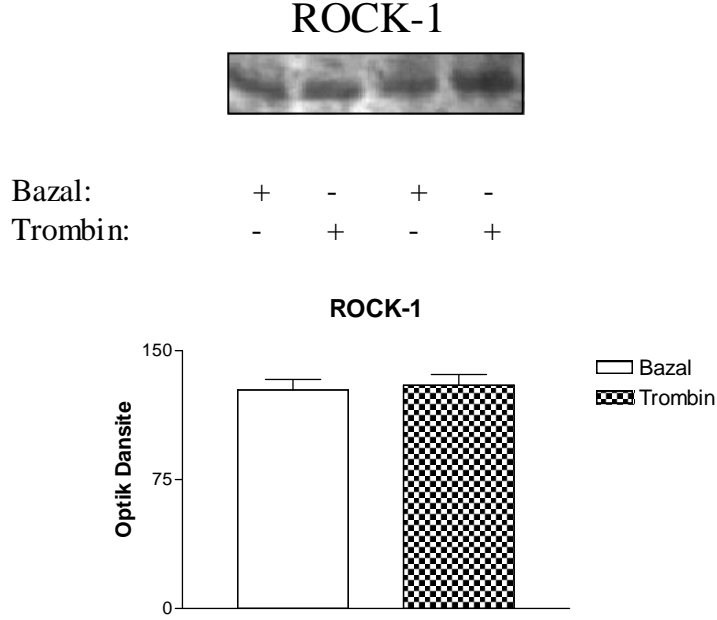
Şekil 4.1 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinin kültür ortamında konfluent olduğunu gösterir bir fotoğraf. Primer hücreler iki sıçan kalbinden elde edildi ve uygun besi ortamında çoğaltıldı. Hücrelerin kaldırım taşı görüntüde olmasına dikkat ediniz. Detaylar için metne bakınız. X10 büyütme.



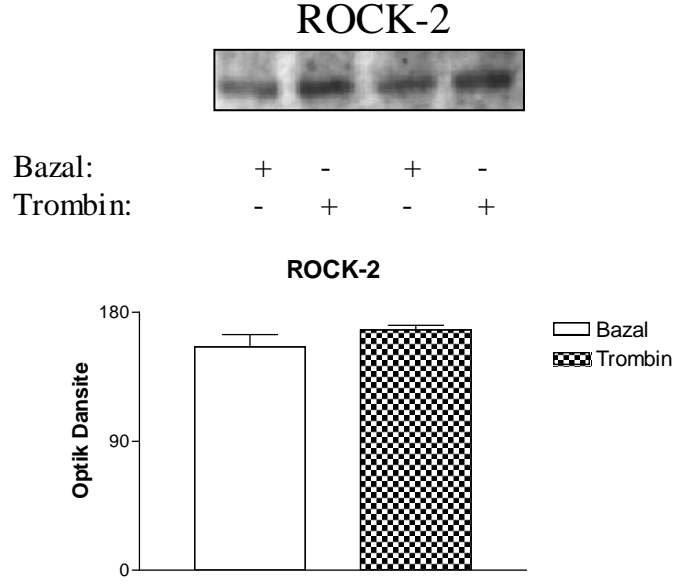
Şekil 4.2 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında Rho-kinaz enzim ekspresyonlarının Western blot yöntemiyle gösterilmesi. Hücreler lizis tamponu ile homojenize edildi. Bunu takiben total protein konsantrasyonları Lowry yöntemiyle hesaplandı. Daha sonra % 8 akrilamid olacak şekilde hazırlanmış jel kuyucuklarına yüklenen endotel hücre homojenatları uygun voltta (genellikle 150 V) elektroforeze tabi tutuldu. Dansitelerine göre ayrışan proteinler nitroselüloz membrana sabit akım altında (genellikle 100 mA) transfer edildi. Güçlendirilmiş kemilüminesans tayin kitinin (ECL) bloklama tozu ile 1 saat boyunca membranlar bloklandı, daha sonra önce ROCK proteinlerine karşı geliştirilmiş primer özgül antikorlar ile (ROCK-1 ve ROCK-2, 1:200) ve daha sonra HRP ile konjüge edilmiş sekonder antikorla 1'er saat inkübe edildi. Tween-20 içeren Tris baz solüsyonu (TBS-T) ile yıkamayı takiben geliştirilmiş ECL görüntüleme kiti yardımıyla radyolojik filimler üzerinde görüntüleme yapıldı. Proteinlerin dansiteleri bir program (Scion image, ABD) yardımıyla sayısal olarak ölçüldü.

4. 2.Rho Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Trombinin Etkileri

Trombin 1 U/ml (veri gösterilmemiştir) ve 5 U/ml konsantrasyonlarında kültüre edilmiş koroner mikrovasküler endotel hücrelerindeki her iki tip Rho-kinaz enzim ekspresyonları üzerinde anlamlı bir değişiklik yapmamıştır (Şekil 4.3 ve 4.4).



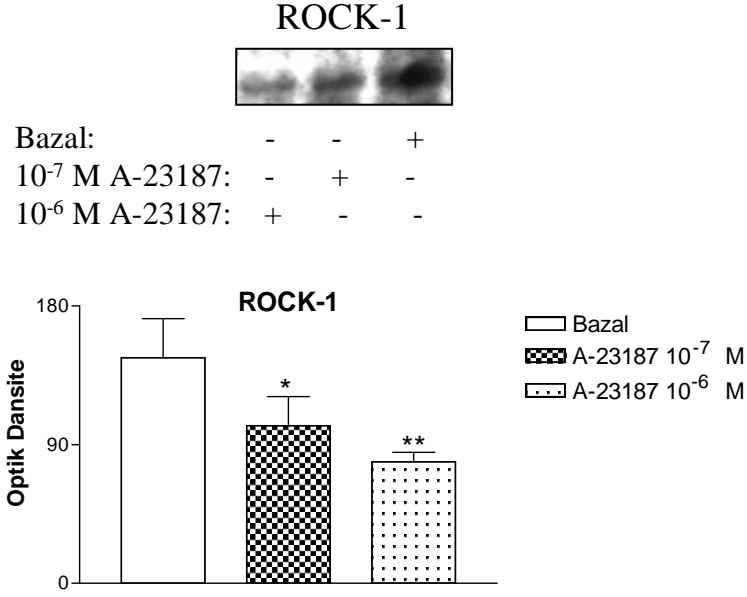
Şekil 4.3 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında bazal şartlarda ve trombin (5 U/ml) ile inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Bir gece boyunca (16 saat) inkübe edilen trombin, ROCK-1 ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedir. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için eşleştirilmiş *t* testi kullanılmıştır.



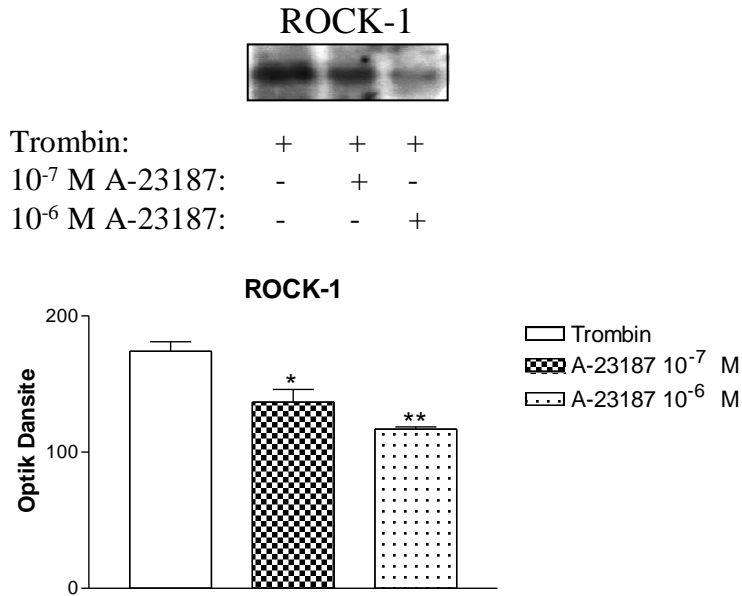
Şekil 4.4 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında bazal şartlarda ve trombin (5 U/ml) ile inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Bir gece boyunca (16 saat) inkübe edilen trombin, ROCK-2 ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedir. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için eşleştirilmemiş *t* testi kullanılmıştır.

4. 3.Rho Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine A-23187'nin Etkileri

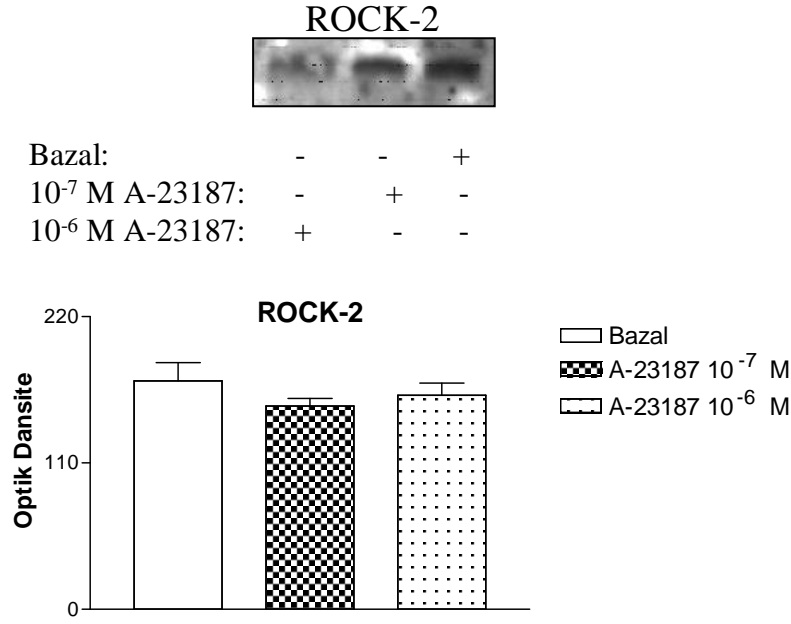
A-23187 (10^{-7} ve 10^{-6} M) hem bazal şartlarda hem de trombin ile stimüle edilmiş şartlarda sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde ROCK-1 ekspresyonlarını doz bağımlı bir şekilde azaltmıştır (Şekil 4.5 ve 4.6). Buna karşılık, A-23187 bazal şartlarda ROCK-2 ekspresyonlarını istatistiksel olarak değiştirmezken (Şekil 4.7) trombin stimülasyonu yapılmış hücrelerde ROCK-2 ekspresyonlarını belirgin olarak baskılamıştır (Şekil 4.8).



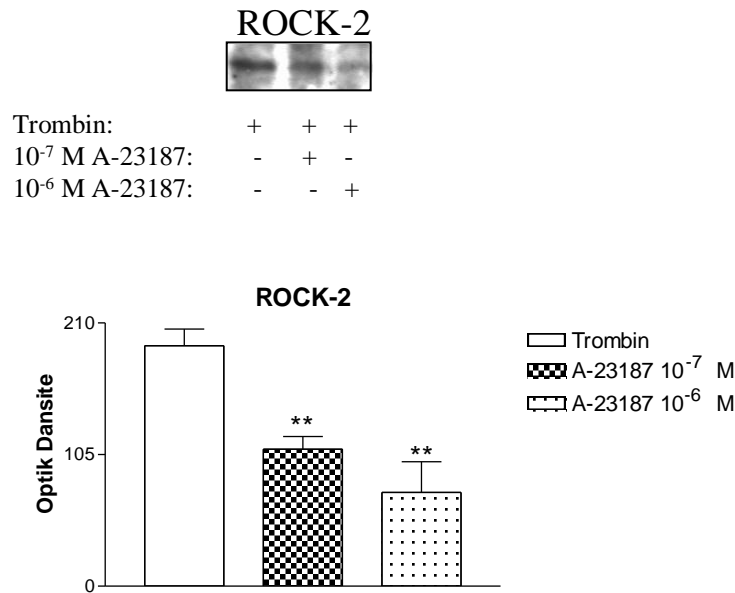
Şekil 4.5. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında bazal şartlarda A-23187 (10⁻⁷ ve 10⁻⁶ M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-1) ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama ±standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$.



Şekil 4.6 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında trombin (5 U/ml) ile stimülasyon yapılmış şartlarda, A-23187 (10⁻⁷ ve 10⁻⁶ M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-1) 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. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$.



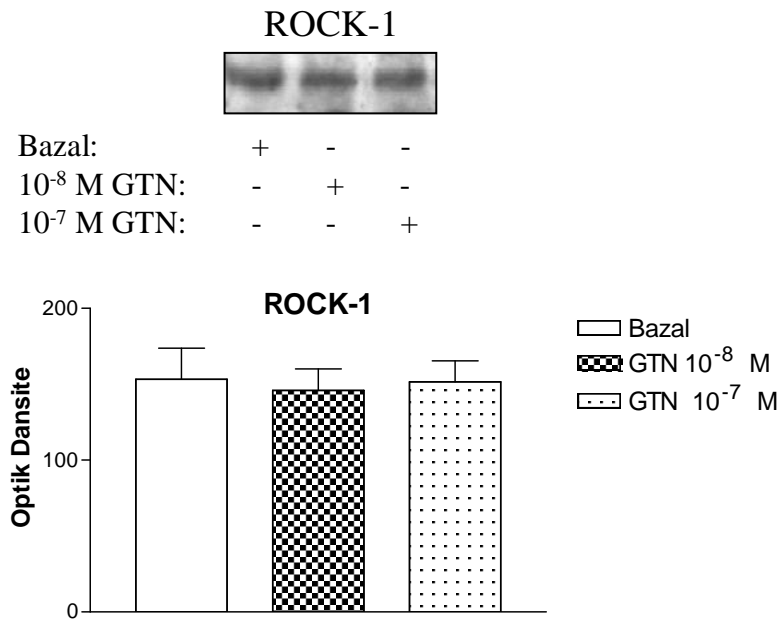
Şekil 4.7 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında bazal şartlarda A-23187 (10^{-7} ve 10^{-6} M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-2) ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır.



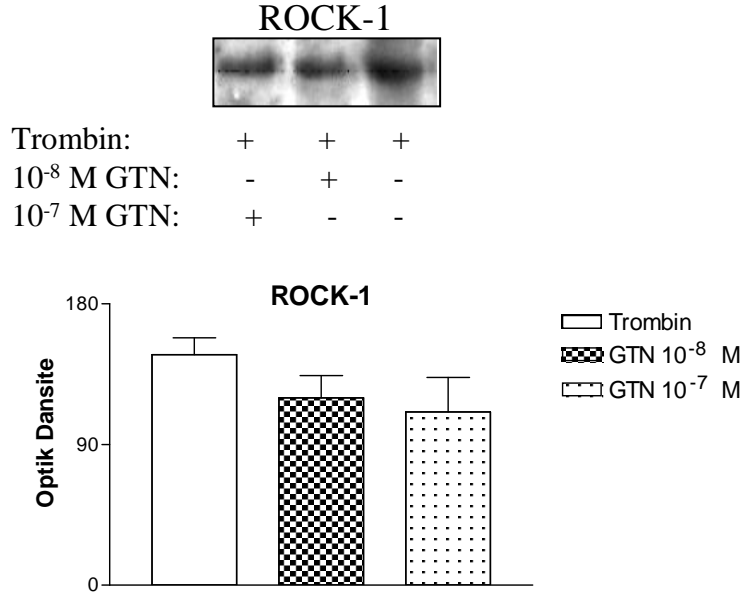
Şekil 4.8 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında trombin (5 U/ml) ile stimülasyon yapılmış şartlarda, A-23187 (10^{-7} ve 10^{-6} M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-2) ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

4.4. Rho Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Gliseril Trinitratın (GTN) Etkileri

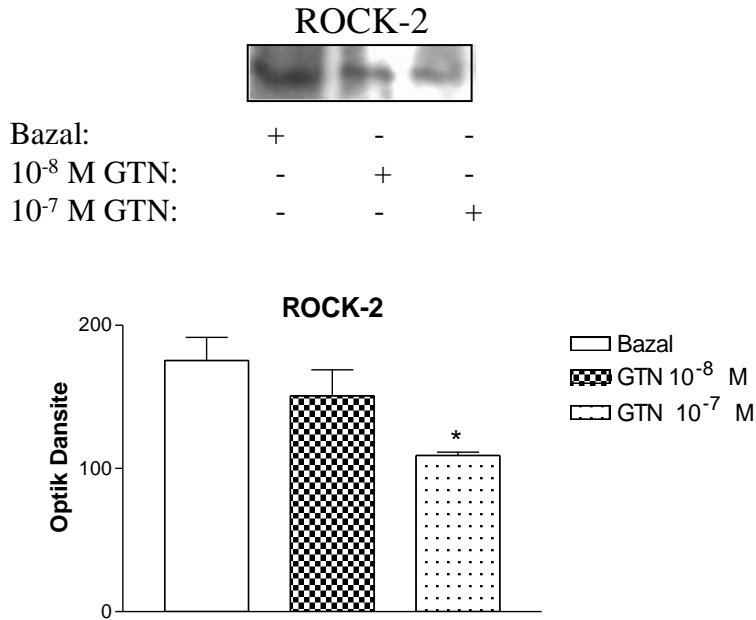
GTN (10^{-8} ve 10^{-7} M), sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde gerek bazal şartlarda gerekse trombin stimülasyonu altında ROCK-1 ekspresyonlarını anlamlı olarak etkilemedi (Şekil 4.9 ve 4.10). Diğer taraftan GTN, trombin ile koroner endotel hücrelerin stimüle edildiği şartlarda ROCK-2 ekspresyonlarını etkilemezken bazal şartlardaki ROCK-2 ekspresyonlarını ancak yüksek dozda anlamlı olarak baskılamıştır (Şekil 4.11 ve 4.12).



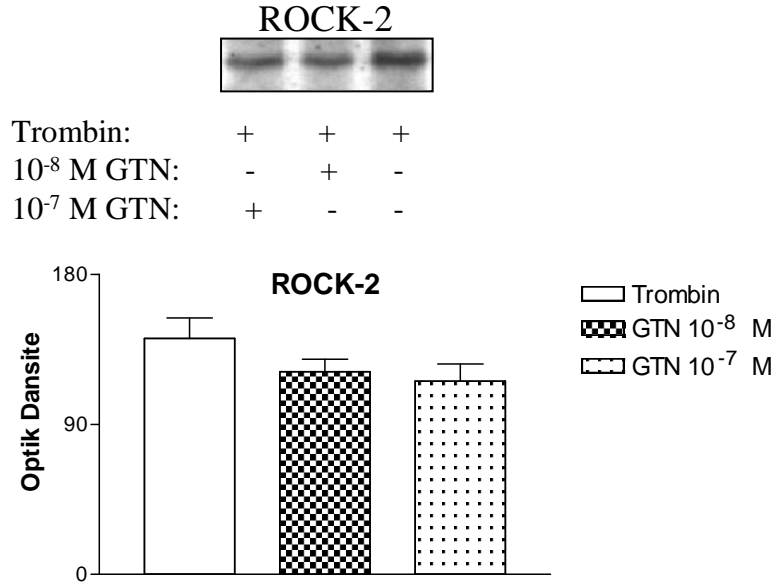
Şekil 4.9 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında bazal şartlarda gliseril trinitrat (GTN, 10^{-8} ve 10^{-7} M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-1) ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır.



Şekil 4.10 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında trombin (5 U/ml) ile stimülasyon yapılmış şartlarda, gliseril trinitrat (GTN, 10^{-8} ve 10^{-7} M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-1) 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.



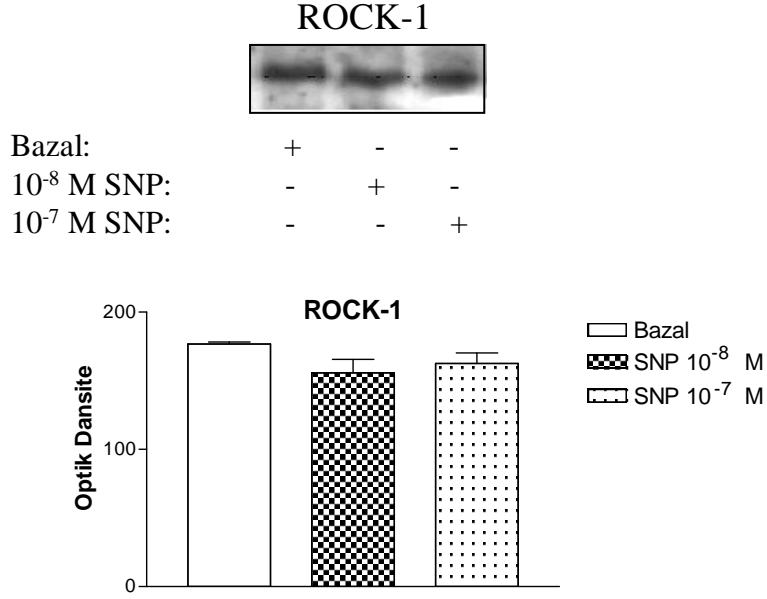
Şekil 4.11 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında bazal şartlarda, gliseril trinitrat (GTN, 10^{-8} ve 10^{-7} M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-2) ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. *: $P<0.05$.



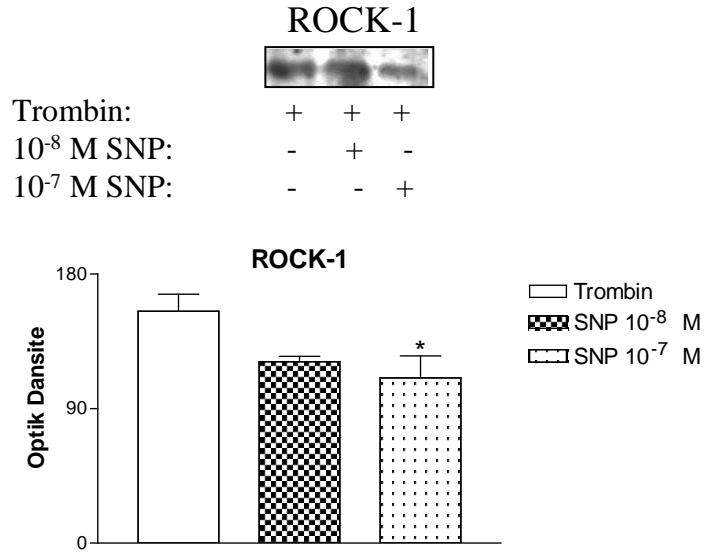
Şekil 4.12 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında trombin (5 U/ml) ile stimülasyon yapılmış şartlarda, gliseril trinitrat (GTN, 10⁻⁸ ve 10⁻⁷ M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-2) ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama ±standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır.

4.5. Rho Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Sodyum Nitroprussiyatın (SNP) Etkileri

SNP (10⁻⁸ ve 10⁻⁷ M), sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde bazal şartlarda altında ROCK-1 ekspresyonunu etkilemedi (Şekil 4.13) ancak trombin stimülasyonu yapılan hücrelerde ROCK-1 ekspresyonunu 10⁻⁷ M konsantrasyonunda anlamlı olarak süprese etti (Şekil 4.14). Benzer bir şekilde bazal şartlarda altında ROCK-2 ekspresyonunu etkilemedi (Şekil 4.15) ancak trombin stimülasyonu yapılan hücrelerde ise daha düşük konsantrasyonda (10⁻⁸ M) ROCK-2 ekspresyonlarını anlamlı olarak baskılamakta, yüksek konsantrasyonda ekspresyonları azaltmasına rağmen bu azalma anlamlı bulunmadı (Şekil 4.16).



Şekil 4.13 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında bazal şartlarda, sodyum nitroprussiyat (SNP, 10⁻⁸ ve 10⁻⁷ M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-1) 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.

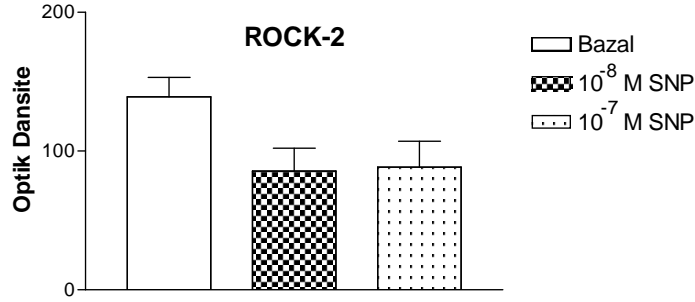


Şekil 4.14 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında trombin (5 U/ml) ile stimülasyon yapılmış şartlarda, sodyum nitroprussiyat (SNP, 10⁻⁸ ve 10⁻⁷ M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-1) ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. *: $P < 0.05$.

ROCK-2



Bazal:	+	-	-
10 ⁻⁸ M SNP:	-	+	-
10 ⁻⁷ M SNP:	-	-	+

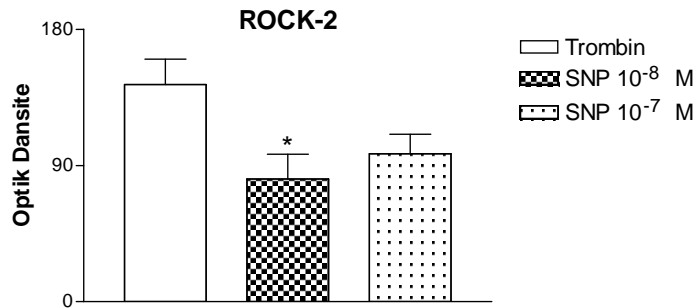


Şekil 4.15 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında bazal şartlarda, sodyum nitroprussiyat (SNP, 10⁻⁸ ve 10⁻⁷ M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-2) ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Dunnet testi kullanılmıştır.

ROCK-2



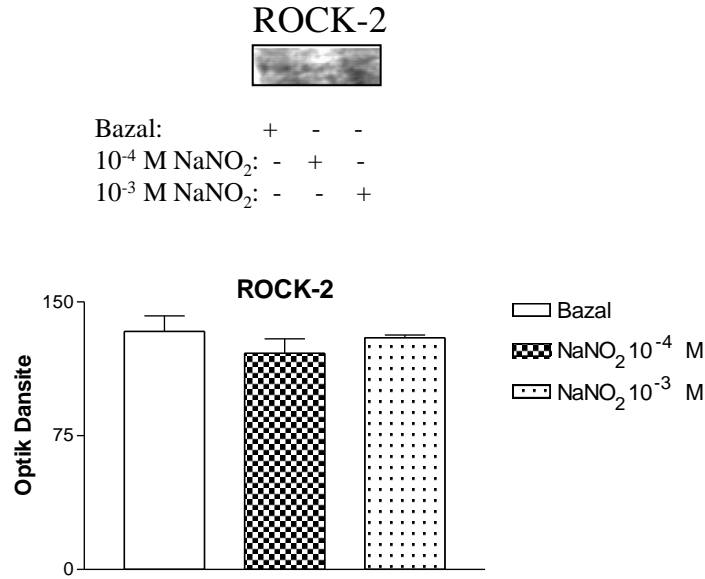
Trombin:	+	+	+
10 ⁻⁸ M SNP:	-	+	-
10 ⁻⁷ M SNP:	-	-	+



Şekil 4.16 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında trombin (5 U/ml) ile stimülasyon yapılmış şartlarda, sodyum nitroprussiyat (SNP, 10⁻⁸ ve 10⁻⁷ M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-2) 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. *: $P<0.05$.

4.6. Rho kinaz enzim ekspresyonları üzerine sodyum nitritin (NaNO_2) etkileri

NaNO_2 (10^{-4} ve 10^{-3} M), kültüre koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde bazal şartlarda ROCK-2 enzim ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde etkilemedi (Şekil 4.17). Bu deney serisinde, hem bazal hem de trombin stimülasyonu yapılmış hücrelerde ROCK-1 ekspresyonları incelenmedi.



Şekil 4.17 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında bazal şartlarda, sodyum nitrit (NaNO_2 , 10^{-4} ve 10^{-3} M, n=3) ile bir gece (16 saat) inkübasyonu 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.

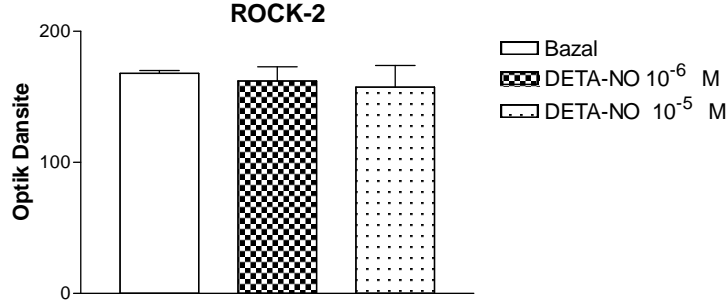
4.7. Rho Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine DETA-NO'nun Etkileri

DETA-NO (10^{-6} ve 10^{-5} M), kültüre koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde bazal şartlarda ROCK-2 enzim ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde etkilemedi (Şekil 4.18). DETA-NO'nun hücreler üzerine toksik etkisinden dolayı koroner endotel hücreleri ile en fazla 8 saat inkübasyona bırakıldı. Bu deney serisinde, hem bazal hem de trombin stimülasyonu yapılmış hücrelerde ROCK-1 ekspresyonları incelenmedi.

ROCK-2



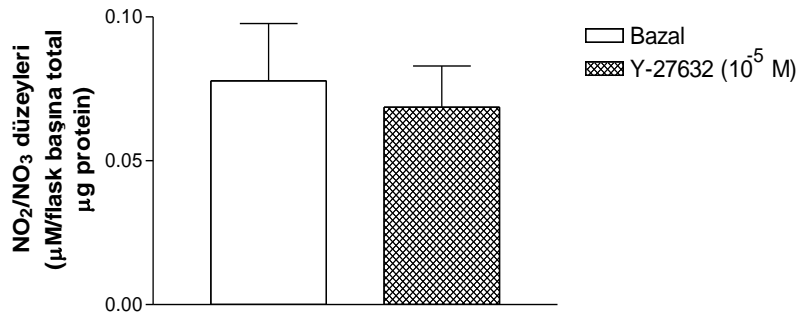
Bazal:	-	-	+
10 ⁻⁶ M DETA-NO:	-	+	-
10 ⁻⁵ M DETA-NO:	+	-	-



Şekil 4.18 Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında bazal şartlarda, NO salıverici bir ajan olan DETA-NO (10⁻⁶ ve 10⁻⁵ M, n=3) ile 8 saat inkübasyonu takiben Rho-kinaz enzim (ROCK-2) 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.

4.8. Y-27632'nin Endotelial Nitrit/Nitrat Düzeyleri Üzerine Etkisi

Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632, 10⁻⁶ M (veri gösterilmemiştir) ve 10⁻⁵ M konsantrasyonlarda endotel hücreleri tarafından kültür ortamına salıverilen NO metabolitlerinin (NO₂/NO₃) düzeylerini etkilememiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Bazal şartlarda ve Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632 (10⁻⁵ M) inkübasyonu sonrasında, sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültür ortamında ölçülen nitrit/nitrat düzeyleri. Kültür flakları Y-27632 ile gece boyunca (16 saat) inkübe edildi (kontrol grubuna Y-27632'nin çözücüsü uygulandı), daha sonra kültür ortamı (medium) alınarak burada Griess yöntemi ile total nitrit+nitrat düzeyleri ölçüldü. Çıkan sonuçlar µM/flask başına total µg protein olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırma için eşleştirilmemiş *t* testi uygulandı.

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada kültüre edilmiş sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde nitrik oksit (NO) vericileri, gliseril trinitrat (GTN), sodyum nitroprussiyat (SNP), DETA-NO ve NaNO₂ ile intrasellüler kalsiyum düzeyini yükselterek endotel hücrelerde NO sentezini ve salıverilmesini artıran kalsiyum iyonofor, A-23187'nin gerek bazal şartlarda gerekse trombin ile stimülasyonun yapıldığı şartlarda kontraktıl bir protein olan Rho-kinaz (ROCK) enziminin şimdiye kadar bilinen iki izoformunun (ROCK-1 ve ROCK-2) ekspresyonları üzerine olan muhtemel etkisini test ettik.

Antianjinal ilaçlar koroner damarlarda vazodilatasyon yaparak, sistemik kan basıncını azaltarak ve ayrıca kalbin iş yükünü dolayısıyla oksijen tüketimini azaltarak antianjinal etki oluştururlar (17). Bu ilaçların bazıları damar düz kaslarında (koroner ve sistemik) güçlü bir gevşetici ajan olan NO salıverirler. Nitrik oksit, vasküler düz kas hücrelerinde çözünür guanilil siklaz enzimini aktive eder ve bunun sonucunda sGMP düzeyleri yükselir. sGMP, kendine duyarlı protein kinazlar (protein kinaz G) üzerinden vasküler düz kas hücresinde intrasellüler Ca²⁺ düzeylerinin düşürür (25).

Ancak NO salıvererek etki yapan antianjinal ilaçların kardiyovasküler düz kas hücresi üzerinde olası başka etkileri hakkında fazla bilgi yoktur. NO'nun hücre içi kalsiyum düzeylerini azaltmasının yanı sıra başka kontraktıl yolakları da baskı altında tutabileceği bildirilmiştir; bu kontraktıl yolaklardan biri de Rho/Rho-kinaz yolağı olabilir (179,180).

Küçük molekül ağırlıklı (yaklaşık 20 kDa) bir G proteini olan Rho, bir çok dokuda Ca²⁺-duyarlaşmasına aracılık eder. Bu fenomen, myozin hafif zincir fosforilasyonunun ve bunu takiben oluşan kasılma gücünün, intrasellüler Ca²⁺ konsantrasyonundan bağımsız olması olarak tanımlanır. Diğer bir ifadeyle, hücre içi Ca²⁺ düzeyleri sabit olduğu zaman bile, agonistle indüklenen kasılmanın yeterli bir şekilde sürdürülmesi esasen Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağı ile sürdürülür (6).

Heterotrimerik G proteinleri ile kenetli çeşitli reseptörlerin aktive edilmesi, hücre içi Ca²⁺ düzeylerini artırabilir. Kalsiyum, kalmoduline bağlanarak myozin hafif zincirini fosforile etmek için myozin hafif zincir kinazını stimüle eder (154,181). Düz kasların kasılma

mekanizmasında Ca^{2+} hayati öneme sahip olmasına rağmen, myozin hafif zincir fosforilasyonunun ve dolayısıyla kasılma gücünün intrasellüler Ca^{2+} düzeylerinden bağımsız olarak da sürdürülebileceği son zamanlarda bildirilmektedir. Bir küçük GTPaz olan Rho ve onun aktive ettiği Rho-kinaz (ROCK-1 ve ROCK-2), söz konusu kalsiyum duyarlaşmasına neden olabilmektedir. Bu etkideki ana mekanizmanın myozin hafif zincir kinazının stimülasyonundan ziyade, myozin fosfotazın Rho-kinaz tarafından fosforile edilerek inhibe edilmesi olduğu iddia edilmektedir (5, 182). Rho-kinazın, Y-27632 veya fasudil ile antagonize edilmesi, vazodilatasyona (183) uterus kontraksiyonlarının inhibisyonuna (185) mide düz kasının gevşemesine (167), kalpte (-) inotropik etkiye (186), iskemik beyin hasarında sitoproteksiyona (187), penis ereksiyonuna (165, 166, 188), üreter düz kas kasılmasının inhibisyonuna (164), koyun (189) ve insan (190) safra kesesinde spazmolitik etkiye neden olmaktadır.

Damar endotel hücreleri, aynı düz kas hücresi gibi kontraktıl elementlere sahiptir. Dolayısıyla bu hücreler çeşitli stimuluslara yanıt olarak kontraktılite şeklinde yanıt verebilir. Endotel hücrelerinin kasılması kapiller permeabilite artışının tetiğini çekmektedir. Bunun sonucunda ödem ve inflamatuvar yanıt oluşabilir (13). Damar endotel hücrelerinin kasılması ve dolayısıyla kapiller permeabilite artışına ve ödem formasyonuna bu hücrelerdeki kalsiyum duyarlaştırıcı yolak olan Rho/Rho-kinaz yolağı aracılık edebilmektedir (191).

Bu çalışmada, endotel hücrelerinde gerek bazal gerekse trombin stimülasyonu varlığında ROCK ekspresyonları araştırıldı. Trombinin endotel hücrelerinde Gq reseptörleri üzerinden kasılmaya ve böylece endotelyal permeabilite artışına neden olduğu gösterilmiştir (192). Diğer taraftan trombin Rho proteinlerini ve onların alt efektörü olan Rho-kinaz enzimini de aktive ettiği gösterilmiştir(193).

Bu çalışmada Rho-kinaz enzim aktivitesi incelenmemiştir ancak uzun süreli trombin maruziyeti sonrasında sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde Rho-kinaz enzim düzeyleri araştırıldı ve trombinin ROCK protein düzeylerini anlamlı olarak artırmadığı tespit edildi. Normal olarak uzun süreli trombin uygulamasının ROCK ekspresyonlarını artırabileceği beklenir zira trombinin neden olduğu endotelyal kontraktılite Rho/Rho-kinaz yolağını içermektedir. Gerçi yapılan çalışmaların tümü RhoA translokasyonu ve Rho-kinaz enzim aktivasyonuna yöneliktir (12). Görünüşte trombin ile ROCK ekspresyonu artmaktadır

ancak bu fark anlamlı bulunamadı. Olasılıkla, endotel hücre kontraktilesini kompanse etmek için başka mekanizmalar devreye girmektedir. Nitekim, trombinin endotel hücrelerden NO sentez ve salıverilmesini artırdığı bilinmektedir (13), bu da Rho-kinaz ekspresyonlarını baskılamış olabilir. İlginç olarak, trombinin 15-24 saatlik inkübasyonunun insan umbilikal endotel hücre kültürlerinde eNOS proteinini “downregüle” ettiği gösterilmiştir (194).

Diğer taraftan NO salıvericisi olan SNP ve GTN, Rho-kinaz ekspresyonlarını süprese etmiştir. Ayrıca, endotel hücrelerde eNOS’u aktive edip NO sentez ve salıverilmesine neden olan kalsiyum iyonoforu, A-23187 (195), gerek bazal gerekse trombin varlığında ROCK ekspresyonunu belirgin olarak baskılamıştır. Ancak bu etkinin NO ile ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir, zira uzun süreli A-23187 inkübasyonu endotel hücrelerde apoptozisi tetikliyor da olabilir (196) ve ROCK ekspresyonunun azalması belki de buna bağlıdır. Söz konusu durumun aydınlatılması için daha ileri çalışmalara gerek vardır. NaNO₂ ve DETA-NO gibi NO açığa çıkaran bileşiklerin ROCK ekspresyonlarını etkilememesi deneysel bir artefakt olabilir. Bu serilerin tekrarlanması gerekmektedir, çünkü diğer NO donörleri GTN ve SNP kısmen bile olsa ROCK ekspresyonlarını baskılıyorsa, bu söz konusu iki ajanın da şayet bilinmeyen başka etkileri yoksa ROCK protein düzeylerini azaltması gerekir.

Sonuç olarak, bulguların bütününe tam bir tutarlılık hakim olmasa da, bazı NO salıveren ajanlar, ROCK ekspresyonlarını baskılamaktadır. Bu da, NO donörlerinin antianjinal etkisine katkı sağlayabilir. Diğer taraftan selektif Rho-kinaz inhibitörü Y-27632, bu çalışmada hücre kültür ortamında NO metabolitlerinin düzeyini değiştirmedir. Oysa, Chitale ve Webb (197) sıçan aortasında Rho-kinaz inhibisyonunun damar endotel hücrelerinden NO salıverilmesine neden olduğunu bildirmişlerdir. Ancak daha önceki çalışmamızda (184) ve bu çalışmada Rho-kinaz inhibisyonunun böyle bir etkiye neden olmadığını gösterdik. Bu fark olasıyla önceki araştırmacıların kullandığı dokunun makrovasküler yapıyı temsil etmesinden buna karşılık bizim her iki çalışmamızın da mikrovasküler yapıyı temsil etmesinden kaynaklanabilir; şöyle ki, kapasitans damarlarda NO primer önemli vazodilatör bir ajan iken, mezenterik damar yatağı ve koroner mikrovasküler dolaşım gibi rezistans damarlarda NO’nun yanı sıra başka mediyatörlerin de (örneğin EDHF’nin) önemli katkısı olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular, bütünüyle tutarlı olmasa da, NO dönörlerinin kontraktıl bir protein olan Rho-kinaz enzim ekspresyonunu azaltabileceğine işaret etmektedir. Eğer bu doğruysa, söz konusu durum, NO salıvererek antianjinal etki oluşturan terapötik ajanların yeni bir etki mekanizmasını gündeme getirmektedir. ROCK inhibisyonu sadece vazodilatasyonla sonuçlanmaz, aynı zamanda ateroskleroz gelişmesine aracılık eden olaylardan biri olan kapiller permeabilite artışı, ödem oluşumu ve inflamasyonun başlaması gibi kritik olayları da baskılayabilir.



7.KAYNAKLAR

1. **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.
2. **Cain AE and Khalil RA.** Pathophysiology of essential hypertension: Role of the pump, the vessel, and the kidney. *Semin Nephro*, **2002**; 22: 3-16.
3. **Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T.** Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1992**; 89: 6348-6352.
4. **H Al-Sa'doni and A Ferro.** S-Nitrosotriols: a class of nitric oxide donor drugs. *Clinical Science*, **2000**; 98: 507-520.
5. **Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K.** Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*, **2001**; 22: 32-39.
6. **Somlyo AP and Somlyo AV.** Signal transduction and regulation in smooth muscle, *Nature*, **1994**; 372: 231-236.
7. **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.
8. **Bolz SS, Vogel L, Sollinger D, Denward R, deWitC, Loirand G, Pohl U.** Nitric oxide induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. *Circulation*, **2003**; 107: 3081-3087
9. **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.

10. **Hordijk PL, Anthony E, Mul FP, Rientsma R, Oomen LC, Ross D.** Vascular endothelial cadherin modulates endothelial monolayer permeability. *J Cell Sci*, **1999**; 112: 1915-1923.
11. **Shasby DM, Stevens T, Ries D, Moy AB, Kamath JM, Kamath AM.** Thrombin inhibits myosin light chain dephosphorylation in endothelial cells. *Am J Physiol*, **1997**; 272: L311-L319.
12. **Amerongen GPV, Van Delft S, Vermeer MA, Collard JG, Van Hinsberg VWM.** Activation of RhoA by thrombin in Endothelial Hyperpermeability. Role of Rho kinase and Protein tyrosine kinases. *Circ Res*, **2000**; 87: 335-340.
13. **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.
14. **Stemermann MB, Morrel EM, Burke KR, Colton CK, Smith KA, Less RS.** Local variation in arterial wall permeability to low-density lipoprotein in normal rabbit aorta. *Arteriosclerosis*, **1986**; 6: 64-69.
15. **Raines EW and Ross R.** Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy. *Bioessays*, **1996**; 4: 271-82.
16. **Kumar V, Cotran R, Robbins SL.** *Basic pathology 6. edition* **2000**; 11; 311. Çev.Edit. Prof Dr. Uğur Çevikbaş
17. **Kayaalp O.** Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji **2002**; 10. baskı Hacettepe-Taş Kitapçılık Ankara s. 473-496.
18. **Yamamoto T, Takeda K, Harada S, Nakata T, Azuma A, Sasaki S, Nakayama M.** HMG-CoA reductase inhibitor enhances inducible nitric oxide synthase expression in rat vascular smooth muscle cells: involvement of the Rho/Rho-kinase pathway. *Atherosclerosis*, **2003**; 166: 213-222.
19. **Mooradian DL, Hutsell TC, Keefer LK.** Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol*, **1995**; 25: 674-678.
20. **Emerk K.** Endotel Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD -TTB İzmir tabip odası Tıpta temel bilimler kolu Sonbahar okulu 16-21 Ekim **1994**.

21. **Rubio AR and Morales–Segura MA.** Nitric Oxide, an Iceberg in Cardiovascular Physiology: Far Beyond Vessel Tone Control, *Archives of Medical Research*, **2004**; 35: 1-11.
22. **Ülker S.** Vasküler Endotel ve Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültürü. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı IV- Endotel Kaynaklı Vazoaktif Maddeler, Editör: T.A.Bökesoy, Ankara, **1997**.
23. **Guyton AC and Hall JE.** Text book of Medical physiology Hemostaz ve Kan pıhtılaşması sayfa 425 (Çeviri Editörü Prof.Dr. Hayrünnisa Çavuşoğlu.) **2001**.
24. **Hare JM and Colucci WS.** Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. *Progress Cardiovasc.Diseases*, **1995**; 38 (2): 155-166.
25. **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs.** Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, **1991**; 109-142
26. **Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwards P, Gath I, Kleinert H.** Nitric oxide synthase izoenzymes: characterization, molecular cloning and functions. *Hypertension*, **1994**; 23: 1121-1131.
27. **Nathan CF, Hibbs J B.** Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol*, **1991**;3: 65-70.
28. **Kuyumcu A, Düzgün AP, Özmen MM, Besler T.** The role of nitric oxide in trauma and infection. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*, **2004**; 10 (3): 149-159.
29. www.bentham.org/.../cpd8-3/cirino/cirino-ms.htm Nitric Oxide Related Therapeutic Phenomenon: A Challenging Task Giuseppe Cirino*¹, Vincenzo Santagada and Giuseppe Caliendo.
30. **Förstermann U.** Handbook of experimental pharmacology Regulation of Nitric Oxide Synthase Expression and activity. Chapter 3, 71-83.
31. **Bredt DS and Synder SH.** Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzym. *Proc Natl Aca . Sci USA*, **1990**; 8: 682-685.

32. **Mayer B, John M, Böhme E.** Purification of calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Co factor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett*, **1990**; 277: 215-219.
33. **Schmidt HHHW, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Förstermann U, Murad F.** Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**.
34. **Dun NJ, Dun SL, Förstermann U, Tseng LF.** Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. *Neurosci Lett*, **1992**; 147: 217-220.
35. **Dun NJ, Dun SL, Wu SY, Förstermann U.** Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands. *Neurosci Lett*, **1993**; 158: 51-54.
36. **Sheng H, Gagne GD, Matsumoto T, Miller MF, Förstermann U, Murad F.** Nitric oxide synthase in bovine superior cervical ganglion. *J Neurochem*, **1993**; 61: 1120-1126.
37. **Hassal CJ, Saffrey MJ, Belai A, Hoyle CH, Moules EW, Moss J, Schmidt HH, Murad F, Förstermann U, Burnstock G.** Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase activity in a subpopulation of intrinsic neurones of the guinea-pig heart. *Neurosci Lett*, **1992**; 143: 65-68.
38. **Saffrey MJ, Hassal CJ, Hoyle CH, Belai A, Moss J, Schmidt HH, Förstermann U, Murad F, Burnstock G.** Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in cultured myenteric neurones. *Neuroreport*, **1992**; 3: 333-336.
39. **Sheng H, Schmidt HH, Nakane M, Mitchell JA, Pollock JS, Förstermann U, Murad F.** Characterization and localization of nitric oxide synthase in non adrenergic non-cholinergic nerves from bovine retractor penis muscles. *Br Journal Pharmacol*, **1992**; 106: 768-773.
40. **Schmidt HHHW, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F.** Mapping of neuronal nitric oxide synthase in the rat suggest frequent colocalization with NADPH-diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneuronal functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem*, **1992**; 40: 1439-1456.
41. **Schmidt HHHW, Warner TD, Ishii K, Sheng H, Murad F.** Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-Arginine derived nitrogen oxides. *Science*, **1992**; 255: 721-723.

42. **Nakane M, Schmidt HHHW, Pollock JS, Förstermann U, Murad F.** Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett*, **1993**; 316: 175-180.
43. **Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS.** Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, **1994**; 372: 546-548.
44. **Gath I, Closs EI, Gödtel-Armbrust U, Schmidt S, Nakane M, Wessler I, Förstermann U.** Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea-pig skeletal muscle: Implications for contractile function. *FASEB J*, **1996**; 10: 1614-1620.
45. **Gath I, Gödtel-Armbrust U, Förstermann U.** Expressional down regulation of neuronal-type NO synthase I in guinea-pig skeletal muscle in response to bacterial lipopolysaccharide. *FEBS Lett*, **1997**; 410: 319-323.
46. **Lam HH, Hanley DF, Trap BD, Saito S, Raja S, Dawson TM, Yamaguchi H.** Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw. *Neurosci Lett*, **1996**; 210: 201-204.
47. **Calza L, Giardino L, Poza M, Micera A, Aloe L.** Time course changes of nerve growth factor, corticotropin-releasing hormone, and nitric oxide synthase isoforms and their possible role in the development of inflammatory response in experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1997**; 94: 3368-3373.
48. **Lumme A, Vanhatalo S, Sadeniemi M, Soinila S.** Expression of nitric oxide synthase in hypothalamic nuclei following axonal injury or colchicine treatment. *Exp Neurol*, **1997**; 144: 248-257.
49. **Sharma HS, Westman J, Alm P, Sjoquist PO, Cervos Navarro J, Nyberg F.** Involvement of nitric oxide in the pathophysiology of acute heat stress in the rat. Influence of a new antioxidant compound H-290/51. *Ann N Y Acad Sci*, **1997**; 813: 581-590.
50. **Reiser PJ, Kline WO, Vaghy PL.** Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J Appl Physiol*, **1997**; 82: 1250-1255.
51. **Förstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Ishii K, Schmidt HH, Heller M, Murad F.** Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Mol Pharmacol*, **1990**; 38: 7-13.

52. Hecker M, Mülsch A, Buse R. Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem*, **1994**; 62: 1524-1529.
53. Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase, Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem*, **1991**; 266: 22789-22791.
54. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokin-induced macrophage nitric oxide synthase:an FAD and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**; 88: 7773-7777.
55. Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leucocyte Biol*, **1994**; 55: 227-233
56. McCall TB, Palmer RM, Moncada S. Interleukin-8 inhibits the induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.*,**1992**; 186: 680-685.
57. Di Rosa M, Radomski M, Carnuccio R, Moncada S. Glucocorticoids inhibits the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, **1990**; 172: 1246-1252.
58. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1990**; 87: 10043-10047.
59. Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HHHW, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**; 88: 1788-1792.
60. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F. Purification and characterisation of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**; 88: 10480-10484.
61. Pollock JS, Nakane M, Buttery LK, Martinez A, Springall D, Polak JM, Förstermann U, Murad F. Characterization and localization of endothelial nitric

oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *Am J Physiol*, **1993**; 265: C1379-C1387.

62. **Myatt L, Brockman DE, Eis AL, Pollock J.** Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta*, **1993**; 14: 487-495.
63. **Tracey WR, Pollock JS, Murad F, Nakane M, Förstermann U.** Identification of a type III (endothelial-like) particulate nitric oxide synthase in LLC-PK1 kidney tubular epithelial cells. *Am J Physiol*, **1994**; 266: C22-C26.
64. **Xue C, Pollock J, Schmidt HHHW, Ward SM, Sanders KM.** Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity by interstitial of the canine proximal colon. *J Auton Nerv Syst*, **1994**; 49: 1-14.
65. **Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowmann A, Snyder SH.** Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci US*, **1994**; 91: 4214-4218
66. **Nishida K, Harrison DG, Nivas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ.** Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest*, **1992**; 90: 2092-2096.
67. **Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH.** Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res*, **1994**; 74: 349-353.
68. **Ziesche R, Petkov V, Williams J, Zakeri SM, Mosgoller W, Knofler M, Block LH.** Lipopolysaccharide and interleukin 1 augment the effects of hypoxia and inflammation in human pulmonary arterial tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**; 93: 12478-12483.
69. **Dai A, Zhang Z, Niu R.** The effects of hypoxia on nitric oxide synthase activity and mRNA expression of pulmonary artery endothelial cells in pigs. *Chung Hua Chieh Ho Ho Hu Hsi Tsa Chih*, **1995**; 18: 164-166.
70. **Liao JK, Zulueta JJ, Yu Fs, Peng HB, Cote CG, Hassoun PM.** Regulation of bovine endothelial constitutive nitric oxide synthase by oxygen. *J Clin Invest*, **1995**; 96: 2661-2666.

71. **Arıcıoğlu F.** Türk Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı. Nitrik Oksidin Farmakolojisi Seminer Özetleri Programı.
72. **Balligand JL.** Handbook of experimental pharmacology regulation of cardiac function by nitric oxide. chapter 9: 207-234.
73. **Tanaka K, Hassal CJ, Burnstock G.** Distribution of intracardiac neurons and nerve terminals that contain a marker for nitric oxide, *Cell Tissue Res.* **1993**; 273: 293-300.
74. **Balligand JL, Kobzik K, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, Kelly RA, Smith TW, Michel T.** Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, **1995**; 270: 14582-14586.
75. **Balligand JL and Cannon PJ.** Nitric oxide synthases and cardiac muscle: autocrine and paracrine influences. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol*, **1997**; 17: 1846-185.
76. **Han X, Kobzik L, Balligand CJ, Kelly RA, Smith TW.** Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca²⁺ current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. *Circ Res*, **1996**; 78: 998-1008.
77. **Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T.** Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interaction with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem*, **1996**; 271: 22810-22814.
78. **Michel T and Feron O.** Nitric oxide synthases: which, where, how and why? *J Clin Invest*, **1997**; 100: 2146-2152.
79. **Garcia-Cardena G, Martasek P, Siler Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC.** Dissecting the interaction between nitric oxide synthase and caveolin. *J Biol Chem*, **1997**; 272: 25437-25440.
80. **Kelly RA, Balligand CJ, Smith T.** Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res*, **1996**; 79: 363-380.
81. **Habib FM, Springall DR, Davies GJ, Oakley CM, Yacoub MH, Polak JM.** Tumor necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy. *Lancet*, **1996**; 347: 1151-1155.
82. **Torre-Aminoe G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL.** Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection

fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol*, **1996**; 27: 1201-1206.

- 83. Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, Mann MS, Keeling PJ, Trindade PT, Lewis NP, Bryne CD, Rickenbacher PR, Bishopric NH, Cooke JP, McKenna WS, Fowler MB.** Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation*, 1996; 93: 1087-1094.
- 84. Fukuchi M, Hussain SNA, Giaid A.** Heterogenous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure: their relation to lesion site and β -adrenergic receptor therapy. *Circulation*. **1998**; 98: 132-139.
- 85. Thones M, Forstermann U, Tracey WR, Bleese NM, Nussler AK, Scholz H, Stein B.** Expression of inducible nitric oxide synthase in failing and non-failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*, **1996**; 28: 165-169.
- 86. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee HR.** Tumor necrosis factor down-regulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res*, **1995**; 73: 205-209.
- 87. Belhassen L, Kelly RA, Smith TW, Balligand JL.** Nitric oxide synthase (NOS3) and contractile responsiveness to adrenergic and cholinergic agonist in the heart: regulation of NOS3 transcription in vitro and in vivo by cAMP in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*, **1996**; 97: 1908-1915.
- 88. Hare JM, Kim B, Flavahan NA, Ricker KM, Peng X, Colman L, Weiss RG, Kass DA.** Pertussis-toxin-sensitive G proteins influence nitric oxide synthase-III activity and protein levels in rat heart. *J Clin Invest*, **1998**; 90: 1424-1431.
- 89. Harrison DG.** Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*, **1997**; 100: 2153-2157.
- 90. Pinsky DJ, Patton S, Mesaros S, Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, Malinski T.** Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ Res*, **1997**; 81: 372-379.
- 91. Kaye DM, Wiviott SD, Balligand JL, Simmons WW, Smith TW, Kelly RA.** Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res*, **1996**; 78: 217-224.

92. **Kanai AJ, Mesaros S, Finkel MS, Oddis CV, Birder LA, Malinski T.** B-adrenergic regulation of constitutive nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Am J Physiol*, **1997**; 273: C1371-1377.
93. **Gauthier C, Tavenier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H.** Functional β_3 -adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest*, **1996**; 98: 556-562.
94. **Gauthier C, Leblais V, Trochu JN, Balligand JL, Le Marec H.** The negative inotropic effect of β_3 adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest*, **1998**; 102: 1377-1384.
95. **Felder CC.** Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J*, **1995**. 9: 619-62.
96. **Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T.** Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1993**; 90: 347-351.
97. **Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T.** Modulation of the endothelial nitric oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes: implications for the autonomic regulation of heart rate. *J Biol Chem*, **1998**; 273: 30249-30253.
98. **Salvemini D, Korb R, Anggrad E, Vane J.** Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1990**; 87: 2593-2597.
99. **Roberts AB, Vodovotz Y, Roche NS, Sporn MB, Nathan CF.** Role of nitric oxide in antagonistic effects of transforming growth factor- β and interleukin- 1β on the beating rate of cultured cardiac myocytes. *Mol endocrinol*, **1992**; 6: 1921-1930.
100. **Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturezak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, Smith TW, Michel T.** Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem*, **1994**. 269: 27580-27588.
101. **Kinugawa K, Shimizu T, Yao A, Kohmoto O, Serizawa T, Takahashi T.** Transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Circ Res*, **1997**; 81: 911-921.

102. **Galione A, Lee HC, Busa WB.** Ca(2+) induced Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science*, **1991**; 252: 1143-1146.
103. **Joe EK, Schussheim AE, Ungureanu-Longrois D, Mäki T, Kelly RA, Smith TW, Balligand JL.** Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric oxide synthase (iNOS): mechanism of contractile depression by nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol*, **1998**; 30: 303-315.
104. **Hu H, Chiamvimonvat N, Yamagishi T, Marban E.** Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. *Circ Res*, **1997**; 81: 742-752.
105. **Shen W, Hintze TH, Wolin MS.** Nitric oxide: an important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption, *Circulation*. **1995**; 92: 3505-3512.
106. **Igarashi J, Nishida M, Hoshida S, Yamashita N, Kosaka H, Hori M, Kuzuya T, Tada M.** Inducible nitric oxide synthase augments injury elicited by oxidative stress in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol*, **1998**; 274: C245-C252.
107. **Smith JA, Shah AM, Lewis MJ.** Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J Physiol Lond*, **1991**; 439: 1-14.
108. **Brady AJ, Warren JB, Poolle-Winson PA, Williams TJ, Harding SE.** Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol*, **1993**; 265: H176-H182.
109. **Grocott-Mason R, Fort S, Lewis MJ, Shah AM.** Myocardial relaxant effect of exogenous nitric oxide in isolated ejecting hearts. *Am J Physiol*, **1994**; 266: H1699-H1705.
110. **Paulus WJ, Vantrimpont PJ, Shah AM.** Paracrine coronary endothelial control of left ventricular function in humans. *Circulation*, **1995**; 92: 2119-2126
111. **Sherman AJ, Dawis CA 3rd, Klocke FJ, Harris KR, Srinivasan G, Yacoub AS, Quinn DA, Ahlin KA, Jang JJ.** Blockade of nitric oxide synthesis reduces myocardial oxygen consumption in vivo. *Circulation*, **1997**; 95: 1328-1334
112. **Laursen JB and Harrison DG.** Modulation of myocardial oxygen consumption through. ACE inhibitors. No effects? *Circulation*, **1997**; 95: 14-16

113. **Zhang X, Xie Y-W, Nasjletti A, Xu X, Wolin MS, Hintze TH.** ACE inhibitors promote nitric oxide accumulation to modulate myocardial oxygen consumption. *Circulation*, **1997**; 95: 176-182
114. **Gauthier C, Erfanian M, Baron O, Balligand JL.** Control of contractile and rhythmic properties of human atrial tissue by a NO pathway. *Circulation*, **1998**; 98: 170-3838
115. **Fei L, Baron AD, Henry DP, Zipes DP.** Intrapericardial delivery of L-arginine reduces the increased severity of ventricular arrhythmias during sympathetic stimulation in dogs with acute coronary occlusion: nitric oxide modulates sympathetic effects on ventricular electrophysiological properties. *Circulation*, **1997**;96: 4044-4049
116. **Keaney JF, Hare JM, Balligand JL, Loscalzo J, Smith TW, Colucci WS.** Inhibition of nitric oxide synthase augments myocardial contractile responses to β -adrenergic stimulation. *Am J Physiol*, **1996**;40: H2646-H2652
117. **Fukuchi M, Hussain SNA, Giaid A.** Heterogenous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure: their relation to lesion site and β -adrenergic receptor therapy. *Circulation*, **1998**; 98: 132-139
118. **Gray GA, Schott C, Juloy-Schaeffer G, Fleming I, Parratt JR, Stoclet JC.** The effect of inhibitors of the L-arginine pathway on L-arginine/NO pathway on endotoxin induced loss of vascular responsiveness in anesthetized rats. *Br J Pharmacol*, **1991**;103:1218-24.
119. **Walder CE, Thiermann C, Vane JR.** The involvement of endothelium derived relaxing factor in regulation of renal cortical blood flow in rat. *Br J Pharmacol*, **1991**;102:967-73.
120. **Buse R and Fleming I.** *Handbook of experimental pharmacology*. Volume 143
121. **Chen PF, Tsai AL, Berka V, Wu KK.** Mutation of Glu-361 in human endothelial nitric oxide synthase selectively abolishes L-Arginine binding without perturbing the behaviour of heme and other redox centers. *J Biol Chem*, **1997**; 272:6114-6118.
122. **Komalavilas P; Lincoln TM.** Phosphorylation of the inositol 1,4,5-Trisphosphate receptor-Cyclic GMP- dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem*, **1996**; 271: 21933-21938.

123. **Pfeilschifter J.** Signaling pathways of nitric oksid. *Kidney Blood Pres Res*, **2000**; 23:159-161.
124. **Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S.** Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, **1997**; 2:1057-1058.
125. **Rosenblum WI, Nelson GH, Povlishock JT.** Laser induced endothelial damage inhibits endothelium dependent relaxation in the cerebral microcirculation of the mouse. *Circ Res*, **1987**; 60:169-176.
126. **Andrews NP, Dakak N, Schenke WH, Quyyumi AA.** Platelet-endothelium interacts in humans: changes in platelet cyclic guanosine monophosphate content in patients with endothelial dysfunction. *Circulation*, **1994**; 90:I-397.
127. **Sawicki G, Salas E, Murat J, Mistza-Lane H, Radomski MW.** Release of gelatinase A from human platelets mediates aggregation. *Nature*, **1997**; 386:616-619.
128. **Radomski MW, Radomski AS.** Regulation of blood cell function by the endothelial cells In: vascular endothelium in human physiology and pathophysiology. **Eds, Vallance P, Webb D, Kluwer 1999.**
129. **Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S.** Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-Arginin. *Nature*.**1988.**
130. **Das I, Khan NS, Puri BK.** Elevated platelet calcium mobilization and nitric oxide synthase activity may reflect abnormalities in schizophrenic brain. *Biochem Biophys Res Commun*, **1995**; 212:375-380.
131. **Suzuki E, Yagi G, Nakaki T.** Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *J Affect Disord* , **2001**; 63:221-224.
132. **Savafli HA, Herken H, Yurekli M, Uz E, Tutkun H, Zoroglu SS, Ozen ME, Cengiz B, Akyol O.** Possible role of nitric oxide and adrenomedullin in bipolar affective disorder. *Neuropsychobiology*, **2002**; 45:57-61
133. **Herken H, Uz E, Ozyurt H.** Red blood cell nitric oxide levels in patients with schizophrenia. *Schizophr Res*, **2001**; 52: 289-290

134. **Zoroğlu SS, Yürekli M, Meram I.** Pathophysiological role of nitric oxide and adrenomedullin in autism. *Cell Biochem Funct* **2003**. 21:55-60.
135. **Shukla R, Barthwal MK, Srivastava N, Nag D, Seth PK, Srimal RC, Dikshit M.** Blood nitrite levels in patients with migraine during headache free period. *Headache*, **2001**; 41: 475–481.
136. **Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, and Wishnock JS.** Macrophage oxidation of L-arginin to nitrite and nitrate nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, **1988**; 27:8706-8711.
137. **Stuehr DJ, Gross SS, Sakuma I, Levin R and Nathan CF.** Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med*, **1989**; 169: 1011-1020.
138. **Stuehr DJ and Marletta MA.** Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell-lines. *Cancer Res*, **1987**; 47:5590-5594.
139. **Drapier JC, Pellat C, and Henry Y.** Generation of EPR-detectable nitrosyl - iron complexes in tumor target cells co-cultured with activated macrophages. *J Biol Chem*, **1991**; 266: 10162-10167.
140. **Butler AR and Williams DHL.** The physiological role of nitric oxide. *J Chem Soc*, **1993**; 22:233-241.
141. **McNaughton L, Radomski A, Sawick G, Radomski W.** in *Handbook of Experimental Pharmacolgy* . Nitric oksit in *Handbook of Experimental Pharmacolgy* . Ed. Mayer B. **2000**.pp 235-257.
142. **Rand MJ.** Nitregic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **1992**; 19,147-169.
143. **Kone BC and Baylis C.** Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol*, **1997**; 272,F561-F578
144. **Bachmann S and Mundel P.** Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization and function. *Am J Kidney Dis*, **1994**; 24,112-129.

145. Edited by **John C Foreman, DSc, PhD, Torben Johansen, MD.** *Text book of Receptör Pharmacology.*
146. **Bourne HR, Sanders DA, and McCormick F.** The GTP'ase superfamily: a coserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **1990**; 348:125-132.
147. **Hall A.**The cellular fuctions of small GTP binding proteins. *Science*, **1990**; 249:635-640.
148. **Takai Y, Kaibuchi K, Kikuchi A, and Kawata M.** Small GTP- binding proteins. *Int Rev Cytol*, **1992**; 133:187-230.
149. **Madaule P and Axel R.** A novel ras-related gene family. *Cell*, **1985**; 41:31-40.
150. **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.
151. **Bishop AL and Hall A.** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* **2000.** 348:241-255.
152. **Nina Wettschureck, Stefan Offermans.** Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med*, **2002**; 80:629-638.
153. **Solmyo AP and Solmyo AV.** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, **1994**; 372:231-236.
154. **Solmyo AP and Solmyo AV.** Signal transduction by G-Proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle miyosin II. *J Physiol (Lond)*, **2000**; 522:177-185.
155. **Mac Donald JA, Borman MA, Muranyi A, Solmyo AV, Hartshorne DJ, Haystead TA.** Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2001**; 98:2419-2424.
156. **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.

157. **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.
158. **Bradley AB, Morgan KG.** Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity porcine coronary artery contractions as detected by aequorion. *J Physiol (Lond)*, **1987**; 385:437-448.
159. **Fukata Y, Amono M, Kiabuchi K.** Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*, **2001**; 22:32-39.
160. **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 myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase) *Science*, **1996**; 273:245-248.
161. **Cario-Toumaniatz C, Evellin S, Maury S, Baron O, Pacaud P, Loirand G.** Role of Rho-kinase signalling in healthy and varicose human saphenus veins. *Br J Pharmacol*, **2002**; 137: 205-212.
162. **Nakamura K, Nishumura 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.
163. **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.
164. **Levent A and Büyükafşar K.** Expression of Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) and its substantial role in the contractile activity of the sheep ureter. *Br J Pharmacol*, **2004**;143(3):431-437.
165. **Chitaley K, Wingard CJ, Webb RC, Branam H, Stoper VS, Lewis R.W., Mills TM.** Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penil erection via a nitric oxide independent pathway. *Nat. Med*, **2001**; 7:119-122.
166. **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.

167. **Büyükafşar K and Levent A.** Involvement of Rho-Rho-kinase signalig in the contractile activity and neurotransmitter release in the mouse gastric fundus. *Biochem Biophys Res Commun*, **2003**; 303,777-781.
168. **Büyükafşar K, Levent A, Ark M.** Expression of Rho-kinase and its functional role in the contractile activity of Mouse vas deferens. *B J Pharmacol*, **2003**; 140:743-749.
169. **Mukai Y, Shimokawa H., Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, Kiabuchi K, Takeshita A.** İnvolveıment of Rho-kinase in hipertansif vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *Faseb J*, **2001**; 15:1062-1064.
170. **Olofsson B** Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cell signaling. *Cell Signal*, **1999**; 11:545-554.
171. **Zheng Y.**Db1 family guanine nucleotide Exchange factors. *Trends Biochem Sci*, **2001**; 26:724-732.
172. **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
173. **Uçar F ve Ovalı E.** Hücre Kültüründe Temel İlkeler, Hücre Kültüründe Temel İlkeler Uygulamalı *Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı-1*, **2003**
174. **Freshney R. L.** Culture of Animal Cells : *A Manual of Basic Technique*. John Wiley and Sons, Newyork **1994**
175. **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 reseach*, **2001**; 50;589-596.
176. **Deliloğlu-Gürhan Sİ.** Çeşitli Organlardan Hazırlanan Hücre Kültürü Teknikleri. *Hücre Kültüründe Temel İlkeler Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı-1*, **2003.**
177. Tietz Textbook of Clinical Chemistery. Edited by Carl A Burtis, Edward R Aswood.
178. **Coşkun FF.** Western-Blotlama yöntemi ile protein tespiti *Hücre Kültüründe Temel İlkeler Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı-1*, **2003**; 189-198.

179. **Begum N, Sandu OA, Dudy N.** Negative regulation of Rho signaling by insulin and its impact on actin cytoskeleton organization in vascular smooth muscle cells. Role of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate signaling pathways. *Diabetes*, **2000**; 51;2256-2263
180. **Sandu OA, M Ito, Begum N,** Signal Transduction in Smooth Muscle Selected Contribution: Insulin utilizes NO/cGMP pathway to activate myosin phosphatase via Rho inhibition in vascular smooth muscle. *J Appl Physiol*, **2001**; 91;1475-1482.
181. **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.
182. **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.
183. **Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S.** Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, **1997**; 389: 990–994
184. **Büyükafşar K, Arıkan O, Ark M, Kubat H, Özveren E.** Upregulation of Rho-kinase (ROCK-2) expression and enhanced contraction to endothelin-1 in the mesenteric artery from lipopolysaccharide-treated rats. *Eur J Pharmacol*, **2004**; 498-211-217.
185. **Tahara M, Morishige K, Sawada K, Ikebuchi Y, Kawagishi R, Tasaka K, Murata Y.** RhoA/Rho-kinase cascade is involved in oxytocin-induced rat uterine contraction. *Endo-crinology*, **2002**; 143:920–929
186. **Anderson G GO, Qvigstad E, Schiander I, Aass H, Osnes JB, Skomedal T.** Alpha(1)-AR-induced positive inotropic response in heart is dependent on myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2002**; 283(4): H1471-1480).
187. **Satoh, S., Utsunomiya, T., Tsurui, K., Kobayashi, T., Ikegaki, I., Sasaki, Y. & Asano T.** Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life Sci*, **2001**; 69, 1441-1453.
188. **Rees, R.W., Ralph, D.J., Royle, M., Moncada, S. & Celletk, S.** Y-27632, an inhibitor of Rho-kinase, antagonizes noradrenergic contraction in the rabbit and human penile corpus cavernosum. *Br J Pharmacol*, **2001**; 133, 455-458.,

- 189. Şahan FS, Tiftik RN, Nacak M, Büyükafşar K.** Central role of Rho-Rhokinase pathway in the neurogenic contractile activity of the sheep gall bladder smooth muscle.4.Ulusal Sinirbilimleri Kongresi 75.abstact. **2005.**
- 190. Büyükafşar ve diğ.,** yayımlanmamış bulgu.
- 191. Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Kaibuchi K, Garcia JG, Verin AD** Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvasc Res*, **2004**; 67(1):64-77.
- 192. Grand RJA, Turnel AS, Grabham PW.** Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J*, **1996**; 313: 353-368.
- 193. Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC, Aepfelbacher M,** Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho-kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem*, **1998**; 273: 21867-874.
- 194. Eto M, Barandier C, Rathgeb L, Kozai T, Joch H, Yang Z, Luscher T F.** Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. *Circ Res*, **2001**; 89:583-59.
- 195. Lau CW, Chen ZY, Wong CM, Yao X, He Z, Xu H, Huang Y.** Attenuated endothelium-mediated relaxation by acteoside in rat aorta: Role of endothelial [Ca²⁺]_i and nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Life Sci*, **2004**; 75(10):1149-57.
- 196. Peiretti F, Alessi MC, Henry M, Anfosso F, Juhan-Vague I, Nalbone G. .** Intracellular calcium mobilization suppresses the TNF-alpha-stimulated synthesis of PAI-1 in human endothelial cells. Indications that calcium acts at a translational level. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, **1997**; 17(8):1550-60.
- 197. Chitale K and Webb RC.** Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signaling. *Hypertension*, **2002**; 39:438-42.

ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Nürnberg-Almanya’da doğdum. İlkokul ,ortaokul ve lise öğrenimimi Mersin’de tamamladım. 1995 yılında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum. 1995-2003 yılları arasında Diyarbakır Merkez Ben-u Sen Sağlık Ocağı ile Mersin Merkez 11 Nolu Sağlık Ocağında görev yaptım. 2003 yılı Eylül ayında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Farmakoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladım. 2004 yılı Ağustos ayından itibaren de Sağlık Bilimleri Enstitüsünde araştırma görevlisi kadrosunda çalışmaktayım. Yabancı dilim İngilizcedir. (KPDS-64). Evli ve bir çocuk annesiyim.

