

158276

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

**Sıçan Mezenterik Arterinde Rho-kinaz Enzim  
Ekspresyonu ve Damar Yatağı Perfüzyon Basıncının  
Kontrolüne Rho/Rho-kinaz Yolağının Katkısı**

Ecz. Onur ARIKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
158276

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kansu BÜYÜKAŞAR

MERSİN – 2004

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

**Sıçan Mezenterik Arterinde Rho-kinaz Enzim  
Ekspresyonu ve Damar Yatağı Perfüzyon Basıncının  
Kontrolüne Rho/Rho-kinaz Yolağının Katkısı**

Ecz. Onur ARIKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez No: 16..

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kansu BÜYÜKAŞAR

MERSİN – 2004

## Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi programı çerçevesinde yürütülmüş olan “**Sıçan Mezenterik Arterinde Rho-kinaz Enzim Ekspresyonu ve Damar Yatağı Perfüzyon Basıncının Kontrolüne Rho/Rho-kinaz Yolağının Katkısı**” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi *19.12* 2003




Başkan

Doç. Dr. Kansı BÜYÜKAŞAR

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Farmakoloji Anabilim Dalı



Üye

Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi

Farmakoloji Anabilim Dalı



Üye

Yard. Doç. Dr. Mustafa ARK

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Farmakoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki tez, Enstitü Yönetim Kurulunun *17.02.2004*.....tarih ve *2004.1.25*.... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Canan ERDOĞAN



## TEŞEKKÜR

Tezimin başlangıcından itibaren değerli fikirleri ve sarsılmaz prensipleriyle bana yol gsteren ve farmakolojinin heyecan ve zevkini ilk günden itibaren bana gsteren Anabilim Dalı Başkanımız ve Tez Danışmanım Sn. Doç. Dr. Kansu BÜYÜKAFŐAR'a teşekkür ederim.

Tezim ve diğer çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımız Öğretim Üyesi Sn. Yrd. Doç. Dr. Mustafa ARK'a, mesai arkadaşım Dr. Adnan LEVENT'e, Dr. İsmail ÜN'e, Dr. Havva KUBAT'a ve katkılarından dolayı diğer hocalarım ve çalışma arkadaşlarım ile teknik ve idari personele teşekkür ederim.

Sonsuz destek, sabır ve anlayışları ve sevgileri için aileme sonsuz teőekkürler.

Bu çalışma Türkiye Bilimler Akademisi tarafından desteklenmiştir (K.B./TÜBA-GEBİP, 2002-1-5).



## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Düz kas kasılmasında Rho/Rho-kinaz yolağının rolü .....	3
2.1.1. Rho-kinaz aktivitesinin düzenlenmesi.....	4
2.1.2. Rho-kinaz.....	5
2.1.3. Siklik nükleotidler aracılığıyla Rho/Rho-kinaz sinyalizasyonunun inhibitör modülasyonu .....	8
2.1.4. Myozin Fosfatazın Myozin Bağlayıcı Alt Ünitesi.....	9
2.1.5. Düz kastaki Rho/Rho-kinaz yolağı.....	9
2.1.5.1. Rho ve Ca <sup>2+</sup> duyarlaşması Rho ve duyarlaşması .....	10
2.1.5.2. Rho/Rho-kinaz yolağı ile düz kas kasılmasının düzenlenmesi.....	10
2.1.5.3. Düz kas hücresinde Rho/Rho-kinaz yolağının reseptör aracılı düzenlenmesi .....	12
2.1.5.4. Kas olmayan hücrelerin fonksiyonlarındaki Rho/Rho-kinaz yolağı.....	13
2.2. Rho-Rho-kinaz Yolağının Çeşitli Hastalıktaki Patolojik Rollerini.....	13
2.2.1. Rho/Rho-kinaz ve anormal damar düz kas kontraktilesi.....	16
2.2.1.1. Hipertansiyon.....	16
2.2.1.2. Vazospazm.....	17
2.2.1.3. Bronşiyal astım.....	18
2.2.1.4. Preterm eylem, erektil disfonksiyon ve glokom.....	18
2.2.1.5. Myokard hipertrofisi.....	19
2.2.2. Rho-kinaz ve anormal düz kas hücre proliferasyonu.....	20
2.2.3. Rho/Rho-kinazın yolağının kas dışı hücrelerdeki fizyoloji	

ve patofizyolojiye katkısı.....	20
2.2.3.1. Tümör hücre göçü ve metastaz.....	20
2.2.4. Hidroksimetil glutaril Ko-enzim A (HMG-KoA) redüktaz inhibitörleri ve Rho/Rho-kinaz aracılı sinyal iletimi .....	21
2.2.4.1. Endotel disfonksiyonu.....	21
2.2.5. Rho/Rho-kinaz Yolağının Diğer Rollerini.....	22
2.3. Kan Basıncının Düzenlenmesinin Fizyolojik Kontrolü.....	23
2.3.1. Kalp Debisi.....	23
2.3.2. Total periferik damar direnci.....	24
2.3.3. Kan Akımının Dokular Tarafından Lokal Kontrolü ve Hümorale Düzenleme.....	24
2.3.3.1. Lokal Kontrol.....	24
2.3.3.2. Hümorale Kontrol.....	25
2.3.4. Vazokonstriktör Ajanlar.....	25
2.3.4.1. Noradrenalin ve Adrenalin .....	25
2.3.4.2. Anjiyotensin.....	26
2.3.4.3. Vazopressin.....	26
2.3.4.4. Endotelin.....	26
2.3.5. Vazodilatatör Ajanlar.....	27
2.3.5.1. Nitrik oksid.....	27
2.3.5.1.1. Vasküler sistem.....	27
2.3.5.1.2. Kalp.....	28
2.3.5.1.3. Trombositler.....	28
2.3.5.1.4. NO ve vasküler tonusun düzenlenmesi.....	29
2.3.5.2. Prostaglandin.....	30
2.3.5.3. Bradikinin.....	30
2.3.5.4. Histamin.....	30
2.3.5.5. Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör.....	31
2.3.5.6. Asetilkolin.....	31
2.4. Dolaşımın sinirsel Düzenlenmesi.....	32

2.4.1. Otonomik Sinirler.....	32
2.4.1.1. Sempatik Sinir Sistemi.....	32
2.4.1.2. Parasempatik Sinir Sistemi.....	33
2.4.2. Hipotalamus.....	33
2.4.3. Arter Basıncının Hızlı Kontrolünde Sinir Sisteminin Rolü.....	33
2.4.4. Normal Arter Basıncının Korunmasında Refleks Mekanizmalar.....	34
2.4.4.1. Arteriyel Baroreseptör Kontrol Sistemi.....	34
2.5. Arter Basıncının Uzun Süreli Düzenlenmesi ve Hipertansiyonda Böbreklerin Rolü.....	35
2.6. Hipertansiyon (Yüksek Kan Basıncı).....	36
2.6.1. Renin-Anjiyotensin Sistemi.....	37
2.6.2. İnsanda Esansiyel Hipertansiyon.....	38
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>40</b>
3.1. Perfüzyon deneyleri.....	40
3.2. Western Blot Deneyleri.....	41
3.3. Kimyasal Ajanlar.....	41
3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz.....	42
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>43</b>
4.1. Fenilefrin ve Endotelin-1 (ET-1)'in perfüzyon basıncı üzerindeki etkileri.....	43
4.2. Rho-kinaz inhibitörlerinin (Y-27632 ve fasudil) perfüzyon basıncı üzerindeki etkileri.....	43
4.3. Saponin perfüzyonunun asetilkolin ve Y27632 ile oluşturulan vazodilatasyon üzerine etkisi.....	43
4.4. Sıçan mezenterik arterinde Rho-kinaz ekspresyonunun Western blot analizi ile gösterilmesi .....	44
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>54</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>57</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>58</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>70</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1.....	45
Şekil-2.....	46
Şekil-3.....	47
Şekil-4.....	48
Şekil-5.....	49
Şekil-6.....	50
Şekil-7.....	51
Şekil-8.....	52
Tablo-1.....	53

## ÖZET

### **Sıçan Mezenterik Arterinde Rho-kinaz Enzim Ekspresyonu ve Damar Yatağı Perfüzyon Basıncının Kontrolünde Rho/Rho-kinaz Yolağının Katkısı**

Rho-kinaz enziminin sıçan mezenterik arterindeki ekspresyonu ve onun inhibitörleri olan Y-27632 ve fasudilin,  $\alpha$  adrenerjik reseptör agonisti olan fenilefrin ile  $ET_A$  ve  $ET_B$  reseptör agonisti olan endotelin-1 (ET-1) ile artırılmış perfüzyon basıncı üzerindeki etkileri araştırıldı. Servikal dislokasyonla öldürülen sıçanların karınları süratle açıldı, süperior mezenterik arteri hızla kanüle edilip izole edildikten sonra sıcaklığı 37 °C'de sabit tutulmuş bir hazne içine yerleştirildi ve bir perfüzyon pompası aracılığıyla sabit hızda (5-5.5 ml/dk) perfüze edildi. Damar yatağı perfüzyon basıncı fenilefrinle veya ET-1 ile artırıldı. ET-1, fenilefrine göre daha düşük konsantrasyonlarda vazokonstriksiyon oluşturdu. Y-27632 ve fasudil, perfüzyon basıncında konsantrasyon bağımlı bir azalma meydana getirdi. Fenilefrinle artırılan perfüzyon basıncı üzerinde bu inhibitör ajanlar daha belirgin bir vazodilatasyon oluşturdu. Fenilefrinle kastırılmış mezenterik damar yatağı  $10^{-5}$  M konsantrasyonda Y-27632 ile % 85.8±3.7 oranında gevşerken, ET-1 ile perfüzyon basıncı artırılmış damar yataklarında  $10^{-5}$  M konsantrasyonda Y-27632 ile % 48.1±5.4 oranında vazodilatasyon meydana geldi ( $P<0.001$ ). Vasküler endoteliumu uzaklaştırmak için mezenterik damar yatağı saponin (100 mg/l, 10 dk boyunca) ile perfüze edildi ve endoteliuma bağımlı asetilkolin gevşemeleri önemli ölçüde azaldı. Buna karşılık endoteliumu uzaklaştırılmış damarlarda Y-27632 ile oluşturulan gevşeme, endotelium varken elde edilen gevşemeden farklı değildi. Western blot deneyleri, yaklaşık 160 kDa ağırlığında olan Rho-kinazın sıçan mezenterik arterinde eksprese edildiğini göstermiştir. Bu sonuçlar sıçan mezenterik arterinde Rho-kinaz enziminin eksprese edildiğini ve vasküler direncin kontrolüne katkı sağladığını gösterir. Dahası, endoteliumun uzaklaştırılması Y-27632 ile oluşan vazodilatasyon üzerinde belirgin bir etki göstermemiştir. Ayrıca, ET-1 ile indüklenen vazokonstriksiyonun Rho-kinaz inhibitörlerine olan duyarlılığı fenilefrine oranla daha azdı ve bu durum olasılıkla endotelin-1 reseptörleri ( $ET_A$  ve  $ET_B$ ) ve  $\alpha$ -adrenerjik reseptörlerin bu sinyal transdüksiyon yolağı ile farklı düzeylerde ilişkili olabileceğini önerilir.

## ABSTRACT

### **Expression of Rho-kinase and Its Contribution to the Control of Perfusion Pressure in the Isolated Perfused Rat Mesenteric Vascular Bed**

Rho-kinase expression was investigated in the rat mesenteric artery and effects of its inhibitors, (+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl) cyclohexanecarboxamide dihydrochloride monohydrate (Y-27632), fasudil (HA-1077) were examined on the perfusion pressure which was elevated by two different receptor agonists, namely  $\alpha$ -agonist, phenylephrine and,  $ET_A$  and  $ET_B$  receptor agonist, endothelin-1. Y-27632 and fasudil produced concentration dependent decrease in perfusion pressure. There was no difference between concentration-response lines of these two inhibitors. Maximum decrease in the perfusion pressure induced by  $10^{-5}$  M Y-27632 was  $85.8 \pm 3.7$  % when the tone was increased by phenylephrine. However it was  $48.1 \pm 5.4$  % ( $P < 0.001$ ) following the perfusion pressure was elevated by endothelin-1. Saponin perfusion (100 mg/l, for 10 min), which abolished acetylcholine-induced relaxation, did not significantly modify Y-27632-elicited relaxation. Western blot analysis revealed that rat mesenteric artery expresses Rho-kinase protein with the molecular weight of approximately 160 kDa.

These results show that Rho-kinase enzyme is expressed in rat mesenteric artery and it contributes to the control of vascular resistance. Moreover, endothelium removal had no marked effect on the vasodilatation induced by Y-27632. In addition, endothelin-1 induced vasoconstriction was more resistant to the Rho-kinase inhibitors than that by phenylephrine, probably since endothelin-1 receptors may be associated with this signal transduction pathway with different level compared to  $\alpha$ -adrenergic receptors.



# 1. GİRİŞ

Artmış vasküler direnç, esansiyel hipertansiyonun temel bulgularından biri olabilmektedir. Hipertansiyon patojenezine bir çok yolağın katkıda bulunduğu gösterilmiş olmasına rağmen, vasküler direnci arttıran temel mekanizma hala tam olarak bilinmemektedir. Vasküler düz kasta kasılma artışı ve/veya gevşeme azalması, hipertansiyonda görülen artmış vasküler dirençten sorumlu olmaktadır. Damar ve damar dışı düz kasların kasılmasını kontrol eden 2 temel mekanizma vardır. Bunlar: 1) Hücre içi kalsiyum düzeylerindeki artış, 2) Hücre içi kalsiyum duyarlılığında meydana gelen artıştır.

$Ca^{2+}$  duyarlaştırıcı bir mekanizma olan Rho/Rho-kinaz sinyalizasyonu, vasküler düz kas tonusunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabilir ve bu yolağın inhibisyonu, hipertansiyonun tedavisinde yeni bir terapötik hedef olabilir (1).  $Ca^{2+}$  duyarlaşması, myozin hafif zinciri fosforilasyonun ve kontraktıl gücün intraselüler kalsiyum düzeylerindeki değişikliklerden bağımsız olması olarak tanımlanır (2). Buna göre, hücre içi kalsiyum düzeyleri sabit olduğunda bile düz kasın kasılma gücü artarak devam edebilir. Heterotrimetrik G proteini ile kenetli reseptörlerin agonistler tarafından aktivasyonu sonucu sinyal, küçük bir G proteini olan RhoA'ya iletilir. Aktive olan RhoA, alt efektörü olan Rho-kinazı ( $ROK\alpha$ ,  $ROK\beta$ ) stimüle eder. Rho-kinaz ise, myozin fosfatazı fosforilleyerek onu inhibe eder ve düz kasılmasını kolaylaştırır. Dolayısıyla bu enzimin inhibisyonu düz kas gevşemesi ile sonuçlanabilir (3). Y-27632 ve fasudil (4) gibi bazı Rho-kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir. Ayrıca C-3 eksoenzimi de RhoA proteinini spesifik olarak inhibe etmektedir. Bu farmakolojik ajanlar hücrelerde Rho/Rho-kinaz yolağının incelenmesine olanak sağlamaktadırlar. Nisbeten yeni keşfedilmiş olan bu yolak, hücre motilitesi, migrasyonu, fokal adezyon oluşumu, membranal olaylar, sitokinezis, düz kas hücre proliferasyonu ve nörit kasılması gibi bir çok biyolojik olaylarda rol alır (5, 6, 7, 8, 9). Dahası, bu yolağın antagonize edilmesinin, vazodilatasyona (10, 11), spazmolitik etkiye (12, 13), penis ereksiyonuna (14, 15), nörotransmitter salınımının inhibisyonuna (16) ve vas deferensin myojenik ve

elektriksel aktivitesinin inhibisyonuna (17) ve daha bir çok etkinin meydana gelmesine neden olduğu bildirilmektedir.

Vasküler tonusun dzenlenmesinde, Rho/Rho-kinaz sinyalizasyonunun onemi, mineralokortikoid ile indüklenmiş hipertansif sıçanlardan (18) ve spontan hipertansif sıçanlardan (19) elde edilen mezenterik arter halkalarında şimdilerde araştırılmıştır. Ancak bu yolağın, ilaçların antihipertansif etkilerinin daha iyi araştırıldığı bir model olan ve rezistans arteriollerden oluşan mezenterik arter yatağının (20) perfüzyon basıncının kontrolüne olan katkısı, henüz araştırılmamıştır. Ayrıca mezenterik arterin Rho-kinaz enzimini eksprese edip etmediğı de gösterilmemiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Düz kas kasılmasında Rho/Rho-kinaz yolağının rolü

Anormal vasküler düz kas kasılması, hipertansiyonun ana nedeni olabilir. Düz kas kasılma mekanizmasının iyi bir şekilde anlaşılması bir çok hastalığın tedavisinde ilerleme kaydedilmesi açısından katkı sağlayabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, küçük GTPaz olan Rho ve onun efektörü olan, Rho ile ilişkili kinaz (Rho-kinaz)'ın kalsiyumdan bağımsız düz kas kasılmasında önemli rollere sahip olduğunu göstermiştir. Rho/Rho-kinaz yolağı, myozin II'nin myozin hafif zincirinin (MHZ) fosforilasyon düzeylerini modüle eder ki, bunu myozin fosfatazın inhibisyonu üzerinden gerçekleştirir ve bu fenomene agonistle indüklenen  $Ca^{2+}$  duyarlaşması adı verilir. Rho/Rho-kinaz mekanizmasının rolü, kas olmayan bir çok yapıların hücrenel göç, stres liflerinin oluşumu gibi hücrenel fonksiyonlarında da yer alır (3). Hem çizgili kas hem de düz kasta sitoplazmik serbest kalsiyum düzeyindeki artış, kasılma için majör bir tetikleyicidir (21). Ancak, çizgili kastakinin aksine, düz kasın agonist stimülasyonu ile kasılması, büyük ölçüde membran potansiyelinden bağımsız olarak gerçekleşir (Şekil-1).

5-Hidroksitriptamin (5-HT, serotonin) ve fenilefrin gibi agonistler, fosfatidil inozitol kaskadını aktive ederek sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesini artırırlar. İntraselüler kalsiyum düzeyindeki artış sonucunda kalmodulin aktive edilir. Kalsiyum kalmodulin kompleksi, myozin hafif zincir kinaz enzimini (MHZK) aktive ederek myozin-II'nin MHZ'ni fosforile eder (22). MHZ fosforilasyon derecesinin düz kas kasılmasında hayati bir öneme sahip olduğu anlaşılmıştır. MHZ fosforilasyonunun düz kas kasılmasını artırır, oysa MHZ'nin defosforile edilmesi, düz kasta gevşeme ile sonuçlanır (Şekil-1). Bununla birlikte kalsiyum indikatörleriyle hücre içi kalsiyum düzeyinin ölçüldüğü deneylerde kalsiyum konsantrasyonu ile MHZ fosforilasyon derecesi ve kasılma gücünün her zaman paralellik göstermediği tespit edilmiştir. MHZ fosforilasyonunun veya agonist uyarısıyla indüklenen kasılma gücünün derecesi, depolarizasyon ile indüklenen kalsiyum konsantrasyonundaki artışın oluşturduğu

kasılma derecesinden daha yüksektir ki, buna kalsiyum duyarlaşması denir. Böylece  $Ca^{2+}$  konsantrasyonundan bağımsız olarak çalışan ve MHZ fosforilasyonu ve bunu takiben oluşan kasılma derecesini düzenleyen başka bir takım yolların var olabileceği hipotezlenmiştir. Hakikaten, daha sonra yapılan çalışmalar, agonistle indüklenen  $Ca^{2+}$  duyarlaşması için bir GTP bağlayıcı proteine ihtiyaç olduğunu göstermiştir (23). Daha da önemlisi, GTP bağlayıcı bir protein tarafından MHZ fosforilasyonundaki artışın, MHZK aktivasyonundan ziyade myozin fosfatazın (MF) inhibisyonuna bağlı olabileceği anlaşılmıştır (2, 24).

Monomerik GTP'azların Ras üst ailesinin Rho alt ailesi üyesi olan küçük GTPaz Rho, agonist stimülasyonu ile indüklenen  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasından sorumludur ve myozin fosfataz aktivitesini inhibe ederek fonksiyon gösterir. Rho/Rho-kinaz yoluyla, stres fibrillerinin oluşumu, trombosit agregasyonu, lenfosit ve fibroblast adezyonu, sitokinez ve hücre göçü, düz kas kasılması, aktin hücre iskeleti reorganizasyonu, hücre şekil değişikliği, proliferasyon ve hipertrofi gibi değişik hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde önemli roller oynayabilir (3).

Yakın zamana kadar, Rho'nun düzenlediği düz kas kasılmasının moleküler mekanizması bilinmiyordu. Buna rağmen, Rho'nun alt efektörü olan ve sinyalizasyon yolunda yer alan Rho ile ilişkili kinazın yani Rho-kinazın, düz kas kasılmasının  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasında hayati bir rolü olduğu gösterilmiştir. Rho-kinazın spesifik inhibitörlerinin kullanılmasıyla yapılan daha ileri çalışmalarda, hipertansiyon ve koroner arter spazmı gibi hastalıklar sırasında Rho-kinaz ile oluşturulan  $Ca^{2+}$  duyarlaşması gerçekleşebilmektedir ki, bu da Rho-kinaz'ın bu tip hastalıklar için terapötik hedef olabileceğini göstermektedir (25, 26).

### **2.1.1. Rho-kinaz aktivitesinin düzenlenmesi**

Memelilerde GTPazların Rho ailesinden olan yaklaşık 10 üyesi bulunur. Rho (A, B, C, D, E ve G izoformları), Rac (1 ve 2 izoformları), Cdc42 ve TC10. Rho, Rac1 ve Cdc42 özellikleri en çok karakterize edilmiş olanlardır. RhoA, RhoB ve RhoC

(bundan böyle bu türlerin tamamı, genel olarak Rho şeklinde tanımlanacaktır) aynı aminoasit dizilimine sahiptirler ve bu GTPaz'ların benzer hücresel fonksiyonları olduğu anlaşılmaktadır. Diğer GTP bağlayıcı proteinler gibi Rho da, hem GDP/GTP bağlayıcı aktivite ve hem de GTPaz aktivitesi oluşturabilir. Moleküler bir mekik gibi GDP bağlı inaktif durum ile GTP bağlı aktif durum arasında sürekli gider gelir. Rho aktivitesi bu sıklısta düzenlenir. İstirahat halindeki hücrelerde Rho-GDP disosiyasyon inhibitörü (Rho GDI), GDP-Rho'ya bağlanır ve GDP-Rho'yu membrandan sitozole geçmesini sağlar. Hücreler bazı agonistlerle stimüle edildiğinde, GDP Rho GTP-Rho'ya dönüşür bu da GTP-GDP değişim reaksiyonunu stimüle eden guanin nukleotid değişim faktörünün (GEFler) aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir (27)

GTP-Rho, daha sonra geranil geranillenmiş C terminal kuyruğunu aracılığı ile hücre membranına yönlendirilir ve özgül (spesifik) hedefleriyle etkileşir. GTPaz aktive edici proteinler (GAPs) negatif regülatörler olarak Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini azaltarak Rho'yu inaktif hali olan Rho-GDP'ye dönüştürürler. Rho, heterotrimetrik G proteinleri ile kenetli reseptörleri olan agonistlere yanıt olarak bir takım fonksiyonlar görür.  $G_{\alpha 12}$  ve  $G_{\alpha 13}$ , stres fibrillerinin oluşumu gibi Rho ile oluşturulan bir çok etkide yer alır. Lizofosfatidik asid, trombin, tromboksan  $A_2$  gibi agonistler, kas olmayan hücrelerde  $G_{\alpha 12}$  ve  $G_{\alpha 13}$  proteinleri üzerinden Rho'ya bağımlı bir tarzda hücre iskelet sisteminde değişikliklere neden olurlar (28).  $G_{\alpha 13}$ 'ten Rho'nun aktive edilmesine uzanan sinyalizasyon yolağı daha önceden açıklığa kavuşturulmuştur. Agonist uyarıyı takiben aktive edilmiş  $G_{\alpha 13}$ , Rho için spesifik GEF'lerden olan p115RhoGEF'e bağlanarak onu aktive eder ve Rho üzerindeki nukleotid değişimini katalize eder (29, 30)

### 2.1.2. Rho-kinaz

Rho'nun stres fibrillerinin düzenlenmesinde, fokal adezyon oluşumunda, hücre morfolojisinde, hücre agregasyonunda, sitokineziste, membranal olaylarda, nörit retraksiyonunda, mikrovillus oluşumunda ve düz kas kasılmasında rolü vardır. Rho-kinaz, protein kinaz N (PKN), myozin fosfatazın myozin bağlayıcı alt ünitesi (MBA),

rhofilin, rhotekin, sitron, p140 mDia ve sitron kinaz dahil olmak üzere Rho efektörleri olarak bilinen çok sayıda protein tanımlanmıştır. Düz kas kasılmasında Rho-kinaz ve MBA, Rho'nun alt uyararı olarak yer alır (31, 32). Serin/treonin kinaz olan Rho-kinaz, afinite kolon kromatografisi yoluyla sığır beyininden elde edilen GTP-Rho bağlayıcı protein olarak tanımlanır. Rho-kinaz enziminin 2 izoformu bulunmaktadır. Bunlar, ROK $\alpha$  (ROCK-2 olarak da tanımlanır) ve ROK $\beta$  (ROCK-1 olarak da bilinir) (33, 34)'dir

Rho-kinaz N-terminal kısmında kinaz bölgesini, orta kısmında kıvrılmış sarmal bölgesini ve C terminal kısmında kuramsal plekstrin homoloji bölgesi bulunur. Rho-kinaz, myotonik distrofi kinazın kinaz bölgesi ile % 72 aminoasit ardışımı açısından homoloji gösterir. Rho-kinazın Rho bağlayıcı bölgesi kıvrılmış sarmal bölgenin C-terminal kısmında lokalize olmuştur ve Rho-kinaz aktivitesi GTP-Rho bağlanması ile artırılmıştır. C terminal kısmının yokluğunda plekstrin homoloji ve sarmal yapılar, Rho-kinazı yapısal olarak aktive eder. Rho-kinazın C-terminal kısmının nokta mutasyonları takiben Rho bağlanma aktivitesini kaybetmiş Rho bağlayıcı (RB) bölgesi ve plekstrin homoloji (PH) bölgesi, Rho-kinazı spesifik olarak inhibe eden dominant negatif form gibi çalışırlar. Rho-kinaz'ın bu negatif dominant fragmanlarına ek olarak, Y-27632 ve fasudil gibi bazı bileşikler geliştirilmiştir. Bu ajanlar, ATP ile yarışmalı bir şekilde Rho-kinazın kinaz aktivitesini spesifik olarak inhibe ederler. Bu inhibitörler, Rho-kinazın hücresel fonksiyonlarını değerlendirmek açısından çok yararlı olabilirler (35, 36, 37, 38).

İlk Rho geni 1985'te *Aplysia* dan bir ras homologu olarak klonlanmıştır (39). Hemen ardından üç insan homologu olan RhoA, RhoB ve RhoC keşfedildi. Rac1, Rac2, Cdc42 ve diğerleri, monomerik GTPazların Ras üst-sınıfının Rho alt-ailesini oluştururlar (40). Bu proteinler inaktif GDP ve aktif GTP siklusunun moleküler anahtarlarıdır. Aktive olabilmek için Rho, geranil-geranillenmiş C terminali ile membrana tutunmalıdır. Guanin nükleotid değişiminden sonra Rho, Rho-kinaz, protein kinaz N, Rhofillin, Rhotekin, sitron, p140mdia ve fosfolipaz D gibi efektörlerle etkileşmeye girer (41). Özellikleri en çok tanımlanmış Rho efektörlerinden olan Rho-kinaz'ın iki izoformu vardır: ROK $\alpha$  (ROCK-2) ve ROK $\beta$  (ROCK-1). Rho-kinazlar,



serin/treonin protein kinazlardır ve bir amino-terminal katalitik kinaz bölümü, Rho-GTP'nin bağlandığı sarmallanmış orta bölümü ve sisteinden zengin bir bölgeyle ayrılan C terminalindeki plekstrin homoloji bölgesinden oluşur (34, 42). Rho kinazlar sadece Rho ile değil aynı zamanda düz kaslardan salınan araziidonik asit ile de aktive edilebilir (43). Rho-kinazı bloke etmek için Y-27632 ve bir izokinolin sülfonil türevi olan HA-1077 (daha sonra fasudil olarak tanımlanmıştır) gibi bazı maddeler geliştirilmiştir (44, 45).

Rho-kinazın en önemli substratlarından birisi de myozin hafif zincir fosfatazıdır (MHZF) ki, bu da myozin bağlayan bölgesinden Rho-kinaz tarafından fosforile edilerek inaktive edilir (46). Düz kas myozin fosfatazı (MF); 11-130 kDa myozin bağlayıcı alt ünite, 37 kDa'lık katalitik alt ünite ve 20 kDa'lık görevi bilinmeyen bir alt ünite içeren tip I serin/treonin fosfatazıdır. MF, myozin bağlayan bölgesinden fosforile olmuş MHZ'yi bağlar ve onu defosforile eder. MF, sadece Rho-kinazla değil fakat diğer ZIP-benzeri kinazlarla da inaktive edilir (47). Myozin fosfatazın inaktive etmenin indirekt bir yolu da, protein kinaz C ile aktive olmuş fosfataz inhibitörü, CPI-17 dir (48, 49, 50, 51). Yakın geçmişte gösterilmiştir ki, Rho da efektörü olan protein kinaz N ile CPI-17'nin fosforilasyonuna neden olabilir (52). Ek olarak, Rho-kinazın MHZ'yi direkt olarak fosforile ettiği gösterilmiştir (53), ancak bu etkinin fizyolojik içeriği çok açık değildir. Rho-kinaz için diğer bir hedef ise, LIM kinazdır ki, bu da fosforillendiği zaman kofilini fosforilleyip onu inaktive edebilir (54). Kofilin aktin depolimerizasyonuna neden olduğu için RhoA'nın bu yoldaki net etkisi, aktin filamanı stabilizasyonudur (55). Rho-kinazın diğer hüresel hedefleri, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> değiş-tokuş proteini, addusin ve ezrin/radiksin/moesin ailesi proteinleridir (41).

Rho'nun aktivitesi her yerde bulunan üç grup protein tarafından ayarlanır. Birincisi GTPaz aktive edeci proteinler (GAPs). Bu proteinler Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini arttırarak aktif GTP bağlı Rho'nun inaktivasyonunu güçlendirirler. İkincisi GTPaz disosiyasyon inhibitörleri (GDI). Bunlar bazı Rho ailesi GTPaz'ların membrana bağlanmasını inhibe ederler, nükleotid disosiyasyonunu önlerler ve dolayısıyla Rho aktivasyonunu önlerler. Üçüncüsü Rho'ya spesifik guanin nükleotid değiş tokuş faktörleri (RhoGEF) (56). Bu faktörler GDP disosiyasyonunu ve müteakiben GTP

bağlanmasını kolaylaştırarak Rho aktivasyonunu artırır. Şu an için Rho GEF proteinleri Rho aktivitesinin başlıca düzenleyicileridir. GEF aktivitesi, protein kinazlar, fosfatidilinozitol kinazlar gibi sinyal ileti molekülleri ile düzenlenebildiği gibi sadece dimerizasyonla da düzenlenebilir (57, 58). Rho aktivitesi, çok çeşitli G proteini ile kenetli reseptörler tarafından da ayarlanmaktadır. Çok iyi bilinmektedir ki  $G_{12}$  türü G proteini ailesinin üyeleri olan ve hemen hemen her yerde eksprese edilen proteinler ( $G_{12}$  ve  $G_{13}$ ), G proteiniyle ilişkili reseptörler ile kenetlidirler ve Rho'yu aktive ederler (59, 60). Şu an için bu Rho-GEF protein grubunun üç üyesinin olduğu kabul edilmektedir.

- p115RhoGEF/1sc,
- PDZRhoGEF ve
- LARG.

p115RhoGEF/1sc esasen hematopietik hücrelerde bulunurken diğerleri daha bir çok yerde eksprese olduğu görünmektedir (61, 62, 63, 64). Gösterilmiştir ki, aktive olmuş  $G_{\alpha 13}$ 'ü p115RhoGEF/1sc ye bağlanması, onun GEF aktivitesini artırmaktadır buna karşılık p115RhoGEF/1sc, aynı anda onların GTPaz aktivitesini artırarak  $G_{\alpha 12}$  ve  $G_{\alpha 13}$ 'ü inaktive edebilir (29, 30). Rho nun  $G_q$  ve  $G_i$  ailelerinden bazı G proteinleri ile de aktive olabildiği konusunda bazı kanıtlar da bulunmaktadır ancak, bunlara ait sinyal ileti yolları tam olarak anlaşılammıştır (65, 66).

### **2.1.3. Siklik nükleotidler aracılığıyla Rho/Rho-kinaz sinyalizasyonunun inhibitör modülasyonu**

Siklik nükleotidler, düz kas gevşemesi için gerekli olan hücre içi mesajlardır ve bir çoğunun aktivitesi siklik nükleotidlerle ayarlanan kinazlarla sağlanır. Bu kinazlar için bir çok substrat tanımlanmış olsa da, cGMP/cAMP bağımlı kinazlarla ilgili etkilerdeki önemleri henüz çok açık değildir. MHZ fosforilasyonunu kontrol eden hem  $Ca^{2+}$  aracılı hem de Rho/Rho-kinaz aracılı yollar, cAMP ile inhibe edilmektedir. cAMP bağımlı protein kinaz A, MHZK'yı fosforiller ve böylece aktivasyonu için gerekli olan  $Ca^{2+}$ /CaM miktarını artırır (67). Fakat bu etkinin in vivo ortamlarda da geçerli olup olmadığı açık değildir (68, 69).

cGMP bağımlı kinaz I, sitozolik  $Ca^{2+}$  düzeylerinde bir düşüşe neden olur ki, bu da azalmış inozitol 1,4,5 trifosfat sentezi, inositol 1,4,5 trifosfat-duyarlı depolardan kalsiyum salınımının inhibisyonu veya  $Ca^{2+}$  ve  $K^+$  kanallarının fosforilasyonundan kaynaklanır (70). cGMP bağımlı kinaz I in Rho'yu fosforilediği ve böylece inhibe ettiği de gösterilmiştir (71, 72). Ayrıca myozin fosfatazın myozin bağlayan alt ünitesini de fosforiller ki, bu da enzim aktivasyonuna neden olur. Böylece siklik nükleotidlerin Rho/Rho-kinaz aracılı sinyal iletiminin inhibisyonu üzerinden hücre fonksiyonlarını etkilediği konusunda deliller her geçen gün artmaktadır.

#### **2.1.4. Myozin Fosfatazın Myozin Bağlayıcı Alt Ünitesi**

Myozin II'nin MHZ defosforilasyonundan fizyolojik olarak sorumlu olan myozin fosfataz enzimi 3 alt üniteye ayrılır.

- 37-kDa tip I fosfataz katalitik altünite
- 130-kDa'lık MBA (myozin fosfataz hedef altünite, MFHA)
- Henüz fonksiyonu tam olarak bilinmeyen bir 20 kDa'lık alt ünite (73).

Myozin fosfataz, MBA yoluyla fosforillenmiş MHZ'ye bağlanır ve MHZ'yi fosforiller. MBA'nın C-terminal bölgesi, GTP bağlı Rho ile etkileşir. GTP-Rho'nun MBA ile etkileşiminin myozin fosfataz aktivitesinde herhangi bir etkiye neden olmadığı saptanmıştır. MBA, Rho-kinaz'ın bir substratı olarak da tanımlanmıştır. Aktive olmuş Rho-kinaz, MBA'yı fosforilleyerek myozin fosfataz aktivitesini inhibe eder. Rho-kinaz ve MBA'nın, MHZ fosforilasyon düzeylerini birlikte düzenlediği ve bu düzenleyici mekanizmanın, özellikle düz kas kasılması gibi bir takım hücresel fonksiyonlarda önemli roller oynarlar. (34, 46)

#### **2.1.5. Düz kastaki Rho/Rho-kinaz yolağı**

### 2.1.5.1. Rho ve Ca<sup>2+</sup> duyarlaşması

Rho'nun düz kasta agonistle indüklenen Ca<sup>2+</sup> duyarlaşmasındaki rolü ortaya konmuştur. Dolayısıyla, agonistlerin ve GTP<sub>γ</sub>S (hidroliz edilemeyen GTP analogu)'in Ca<sup>2+</sup> duyarlaştırıcı etkisi, Clostridium botulinum C3 ve Stafilokokal toksin EDIN (epidermal farklılaşma inhibitörü) gibi Rho için spesifik inhibitör toksinlerle tamamen bloklanır. GTP<sub>γ</sub>S-Rho ya da Rho'nun yapısal olarak aktif formunun permeabilize düz kas hücrelerine verilmesi, Ca<sup>2+</sup> duyarlaşmasını indükler (74, 75). Dahası, sabit Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonlarında aktif Rho ile oluşturulan MHZ fosforilasyon oranındaki artış, fosforilasyon oranındaki artıştan değil de, defosforilasyon oranındaki azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Böylece Rho'nun myozin fosfataz aktivitesi aracılığıyla Ca<sup>2+</sup> duyarlaşmasının düzenlendiği varsayılmaktadır (76).

### 2.1.5.2. Rho/Rho-kinaz yolu ile düz kas kasılmasının düzenlenmesi

Rho, düz kastaki Ca<sup>2+</sup> duyarlaşması esnasında myozin fosfataz aktivitesinin inhibisyonuna nasıl aracılık eder? Rho efektörlerinin fonksiyonel analizleri ve tanımlanmaları, myozin fosfataz aktivitesinin düzenlenmesine katkı sağlayan Rho sinyalizasyon yoluna ışık tutar (Şekil-1). Agonistler heterotrimetrik G proteinleriyle kenetli reseptörün aktivasyonu üzerinden Rho'yu aktive eder ve aktive olan Rho, Rho-kinaz ile etkileşir. Aktif olan Rho-kinaz daha sonra MBA'yı fosforile eder ve myozin fosfataz aktivitesini inhibe eder (46). Aynı anda Rho-kinaz MHZ'i direkt olarak fosforiler ki, bu normalde MHZK enzimi tarafından gerçekleştirilir (53). Yapısal olarak aktif Rho-kinazın ileri derecede permeabilize edilmiş düz kas hücrelerine verilmesi, MHZK inhibitörü wortmanninden etkilenmeyen MHZ fosforilasyonu üzerinden kasılmaya neden olmuştur (77). Böylece, Rho-kinaz MHZ fosforilasyonu ve kasılmasını iki prosese bağlı olarak düzenleyebilmektedir (myozin fosfatazın inaktivasyonu ve direkt MHZ fosforilasyonu). Bununla birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalar, Rho-kinaz tarafından MHZ'nin direkt fosforilasyonununun ziyade Rho-kinazla oluşturulan myozin fosfataz inaktivasyonunun düz kasta oluşan Ca<sup>2+</sup>



duyarlaşmasından sorumlu olabileceğini göstermiştir (78). Bu iki prosesin fizyolojik katkısının tam olarak açıklanması terapötik açıdan önemli kullanım alanı sağlayabilir. Y-27632 ve fasudil gibi spesifik Rho-kinaz inhibitörlerinin varlığında intakt düz kasta Rho-kinazın fizyolojik rollerinin değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Y-27632 bir piridin türevidir ve esasen düz kas gevşeticisi olarak geliştirilmiştir. Bu bileşik selektif olarak  $Ca^{2+}$  duyarlaşma mekanizmasını tamamen inhibe ederek agonistle indüklenen vasküler ve bronşiyal düz kas kasılmasını inhibe eder (4). Bu sonuçlar Rho-kinazın açıkça, düz kas hücrelerinde agonistle indüklenen  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasında yer alan majör bir efektör olduğunu gösterir (Şekil-1). Daha önceden açıklandığı gibi, düz kastaki  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasının önemini vurgulayan majör mekanizma MBA'nin fosforilasyonu ve sonuç olarak Rho-kinaz tarafından myozin fosfatının aktivitesinin inhibisyonudur. MBA'de Ser849/854 fosforilasyon bölgesine özgü spesifik bir antikorun kullanılmasıyla hücrelerde Rho/Rho-kinaz aktivasyonu ve myozin fosfatının olası inhibisyonu direkt olarak değerlendirilmiştir (79).

GTP bağlayıcı proteinlere ek olarak, araşidonik asid ve protein kinaz C (PKC)'nin de, fizyolojik rollerinin in vivo şartlarda belirtilmemesine rağmen, düz kas kasılmasındaki  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasında mediyatör olarak rol alabilir (2, 23). Bu bileşikler myozin fosfatın aktivitesinin inhibisyonu üzerinden  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasına aracılık eder. Son zamanlarda, araşidonik asidin in vitro şartlarda Rho kinazı Rho'dan bağımsız ve direkt bir şekilde aktive ettiği gösterilmiştir (80). Araşidonik asidin C terminal düzenleyici kısma bağlandığı görünmektedir. C terminal düzenleyici kısım ve katalitik kısım arasındaki intramolekül-intermolekül etkileşimi üzerinden Rho-kinazın otoinhibisyonuna neden olur (37). Permeabilize düz kasta araşidonik asid ile indüklenen  $Ca^{2+}$  duyarlaşması, Y-27632 tarafından spesifik olarak inhibe edilmiştir. (81, 82). Bu sonuçlar, agonistlerin Rho-kinazı inhibe etmek için en az iki sinyalizasyon yolağını kullandığını ve  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasını indüklediğini gösterebilir. PKC, myozin fosfatının fosforilasyon bağımlı bir inhibitörü olan CPI-17'yi fosforilleyerek aktive eder, böylelikle myozin fosfatın inhibe edilir ve  $Ca^{2+}$  duyarlaşması gerçekleşir (52, 83).

MBA, MHZ ve CPI-17'ye ek olarak bazı kuramsal Rho-kinaz substratları aydınlatılmıştır (32, 84). Son zamanlarda, kalponinin de Rho-kinazın kuramsal substratı

olabileceği gösterilmiştir. Kalponin, esasen düz kasta aktin filamenti ilişkili bir protein olarak bulunmuştur. Kalponinin aktin filamentlerine bağlanması, aktinle aktive edilen myozin ATPaz aktivitesi üzerinde bir inhibitör etki oluşturur. Bu inhibisyon PKC ve kalmodulin bağımlı protein kinaz-II gibi kinazlar tarafından kalponinin fosforillemesiyle geri çevrilir. Ayrıca Rho-kinaz, kalponini fosforilleyerek onun aktin filamentlerine bağlanma aktivitesini azaltır (85). Rho/Rho-kinaz yolağının, MHZ fosforilasyonuna paralel olarak kalponinin fosforilasyonu üzerinden de düz kas kasılmasına katkı sağlayabileceğini ileri sürmek oldukça ilginç bir spekülasyon gibi görünmektedir.

### **2.1.5.3. Düz kas hücresinde Rho/Rho-kinaz yolağının reseptör aracılı düzenlenmesi**

Son gözlemlere göre fenilefrin, asetilkolin, bir tromboksan analogu olan U44619, endotelin, histamin ve tromboksan A<sub>2</sub> gibi agonistlerin indüklediği bir çok kasılmalar sadece MHZK'nın Ca<sup>2+</sup> bağımlı aktivasyonu ile değil, Ca<sup>2+</sup> dan bağımsız Rho/Rho-kinaz yolağı ile düz kas kasılmasına aracılık eder (23, 25). Bu agonistlerin reseptörleri heterotrimetrik G proteinlerinin G<sub>q</sub> familyasına kenetidirdir. Bu reseptörlerin uyarılması sonucunda fosfotidilinozitol kaskadı aktive edilir ve müteakiben hücre içi kalsiyum düzeyleri yükselir. Ca<sup>2+</sup>, kalmodulin aktivasyonu üzerinden MHZK'yi stimüle eder ve böylece kasılma prosesi tetiklenmiş olur. Yukarıda belirtildiği gibi, bazı kas olmayan hücrelerde de Rho aktivasyonunun bir çok heterotrimetrik G proteinleri (örneğin G<sub>12,13</sub>) ile bağlantılı olabileceği iddia edilmektedir (28). Son zamanlarda yapılan bir çalışma, vazokonstriktör agonistlerden anjiotensin II, endotelin ve vazopressin reseptörlerinin G<sub>q</sub> kadar G<sub>12, 13</sub> ile de kenetli olabileceğini göstermiştir (86). G<sub>12, 13</sub>, Rho/Rho-kinaza bağımlı bir şekilde düz kas kasılmasını tetikler. Düz kasta hangi GEF'lerin G<sub>12, 13</sub>'ü ve dolayısıyla Rho'yu aktive ettiği belirsiz kalmıştır. Halihazırda belirtildiği gibi agonist-G protein kompleksi aracılığı ile aktive edilmiş Rho'nun olasılıkla geranil-geranillenmiş kuyruğu üzerinden plazma membranlarına bağlandığı düşünülmektedir. Diğer taraftan Rho'nun tetiklediği olaylar sonucunda inhibe edilen myozin fosfataz myozin filamentlerine bağlanır ve

dolayısıyla Rho-kinaz hücre membranı ile kontraktil aparatı arasında bir ulak vazifesi görebilir (38, 87, 88).

#### **2.1.5.4. Kas olmayan hücrelerin fonksiyonlarındaki Rho/Rho-kinaz yolağı**

Kas olmayan hücrelerdeki myozin II'nin aktivitesi de, MHZ'nin fosforilasyonu ve defosforilasyonu ile düzenlenmektedir. Rho/Rho-kinaz yolağı, MHZ fosforilasyonu üzerinden trombositlerin agregasyonu, nörit retraksiyonu, endotel hücrelerin kasılmasını, tümör hücrelerinin göçünü, hepatosit büyüme faktörü ya da forbol esterleri ile indüklenen hücre motilitesini ve fokal adezyonların ve stres fibrillerinin oluşumunda hayati bir rol oynayabilir. MBA'nin Rho-kinaz tarafından fosforilasyonu, bir çok durumda geçerlidir. MBA ve MHZ'nin dışında, Rho-kinaz diğeri bir çok proteinleri de fosforilleyebilir (38, 46, 89, 90, 91). Örneğin;

- 1-ERM (ezrin, radixin, moesin) familyasındaki proteinlerin fosforilasyonu üzerinden mikrovilüs oluşumu,
- 2-Adducin üzerinden membranlar olayları ve hücre göçü
- 3-Glial fibriller asidik protein üzerinden sitokinezis
- 4-Kollapsin yanıt mediyatörü (CRMP) üzerinden lizofosfatidik asit (LPA) vasıtasıyla nöronal büyüme konisi kollapsını düzenler (92)
- Rho-kinaz,  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  değiş-tokuş proteinini fosforile ederek aktive eder (93).

Kofilini fosforilleyen ve böylece onun aktin filamentlerini depolimerize etme yeteneğini inhibe eden LIM-kinaz Rho-kinaz tarafından fosforillenerek aktive edilir. Rho-kinaz aynı zamanda hücre iskeleti aktininin yeniden düzenlenmesini sağlayabilir.

#### **2.2. Rho-Rho-kinaz Yolağının Çeşitli Hastalığıdaki Patolojik Rollerini**

Y-27632 gibi spesifik Rho-kinaz inhibitörleri kullanarak Rho-kinazın fizyolojik ve patolojik rolleri değerlendirilmiştir. Y-27632 karşılaştırılabilir dozlarda normal kan basıncında herhangi bir etkisi olmadığı halde, hipertansif sıçanlarda doza bağımlı bir şekilde yüksek kan basıncını azaltmaktadır (25). Bu bulgu, Rho/Rho-kinaz ile oluşturulan düz kas kasılmasındaki  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasının, hipertansiyona neden olabileceğini gösterir. Bu tarz inhibitörler, hipertansiyon tedavisinde ilerleme sağlanması açısından faydalı gözükmektedirler. Rho-kinaz yolağının fizyolojik rolü domuz koroner arterinin spastik bir modelinde detaylı olarak araştırılmıştır. Bu modelde, arterin adventisya tabakası bir inflamatuvar sitokin olan interleukin-1 $\beta$  ile lokal olarak muamele edilerek adventisyal inflamatuvar lezyonu ve sonucunda aterosklerotik yapılanma indüklenmiştir. Histamin, serotonin ve trombosit aktive edici faktörü IL-1 $\beta$  ile tedavi edilen kısımda koroner hiperkonstriksiyona neden olmuştur. Serotonin ile indüklenen kasılmada, MHZ fosforilasyonu artmış olup MHZ fosforilasyonu ile vazokonstriksiyon arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur (94). Fasudilin bir metaboliti olan hidroksifasudilin, Rho-kinaz üzerinde spesifik bir inhibitör etkisi vardır. Hidroksifasudil serotonin ile indüklenen koroner hiperkontraksiyonu doza bağımlı bir şekilde inhibe etti. Bu spazmın inhibisyonu serotonin ile indüklenen MHZ fosforilasyonun inhibisyonu eşliğinde gerçekleşir (95). Bu sonuçlar, Rho/Rho-kinaz yolağıyla artmış MHZ fosforilasyonunun koroner arter spazmında hayati bir öneme sahip olduğunu gösterir. Dahası, Rho-kinaz tarafından MBA'nın Ser849/854 fosforilasyonuna spesifik bir antikorun kullanılması, MBA'nin fosforilasyonunun spastik bölgede kontrol bölgesine oranla daha büyük olduğunu gösterdi. Ek olarak fosforilasyon derecesi kasılma gücü ile anlamlı bir şekilde koreledir. MBA'nin artmış fosforilasyonu, Y-27632 ile inhibe edilmiştir. İlginç olarak spastik bölgede ROK $\beta$  mRNA ekspresyonu anlamlı bir şekilde artmıştır (26). Rho-kinazın spastik bölgede upregüle olduğu ve MBA fosforilasyonu üzerinden myozin fosfataz aktivitesinin inhibisyonuyla hiperkonstriksiyona neden olduğu öne sürülmüştür. Köpek serebral vazospazmı (deneysel subaroknoid hemorajiyi takiben) modelinde hiperkontraksiyon ve artmış MHZ fosforilasyonu, Y-27632 tarafından inhibe edilmiştir (96). Bu bulguların hasta insanlara uyarlanabildiğinde, Rho-kinaz anormal düz kas kasılmasından kaynaklanan bir çok hastalık için terapötik hedef olabilir. Rho/Rho-kinaz yolağı, ateroskleroz, vazospazm ve hipertansiyonun temel nedeni olabilir.



Aterosklerozun patojenezi, kronik proliferasyon, migrasyon, düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve makrofajların göçüyle neointimal formasyon ve patolojik vasküler oluşumlar gibi histolojik değişiklikleri içerir. Rho Rho-kinaz yolağının aterosklerotik lezyonların oluşumunda rolü vardır. Rho-kinazın, spesifik inhibitörlerle inhibisyonu, anjiyoplastiyi takiben neointimal formasyonu inhibe ettiği gözlenmiştir. Rho-kinaz, makrofajların ve vasküler düz kas hücrelerinin adventisya tabakasından media tabakasına ya da arterlerin intima tabakasına göçü ve migrasyonunun düzenlenmesinde yani neointimal formasyonda rol alır (97, 98, 99).

Rho-Rho-kinaz yolağı, stres fibrillerinin oluşumu, fokal adezyonları, sitokineziste, hücre motilitesinde ve hücre göçü gibi bir çok hücre fonksiyonlarında da önemli rol oynar. Rho-kinaz sadece düz kas kasılması üzerinden değil, çeşitli kas olmayan hücrelerin (non-muscle) fonksiyonlarının düzenlenmesiyle de aterosklerozisin patogeneziinde yer alabilir. Bu gözlemler birlikte değerlendirildiğinde, Rho-kinaz aktivitesinin düzenlenmesinin hipertansiyon ve spazma ek olarak, aterosklerozis tedavisinde de yeni bir yaklaşım sağlayabilir. Küçük bir GTPaz olan Rho, hücre adezyonu, hücre hareketliliği ve göçü, büyüme kontrolü, hücre kasılması ve sitokinez gibi bir çok hücre faaliyetinde rol almaktadır. Başlıca efektörlerden birisi olan Rho-kinaz, myozin II'nin regülatör zincirinin defosforilasyonunu (myozin fosfataz inhibisyonu üzerinden) inhibe ederek düz kas yapısında olan ve olmayan hücrelerdeki aktomyozin köprülerinin güç ve veriminin ayarlanmasında önemli rol oynamaktadır. Rho/Rho-kinaz sinyalizasyonundaki anormal aktivasyonun, hipertansiyon ve bronşiyal astım gibi hastalıklarda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (100) (Tablo-1). Kas hücresi kontraktilesi ve kas olmayan hücrenin hücre iskeletindeki kasılmanın ana komponenti, myozin II dir. Myozin hafif zincirin 19. serin aminoasidi fosforilasyon, myozinin intrinsik ATPaz aktivitesini artırarak aktomyozin karşı bağlanma döngüsünün ("crossbridging cycle") oranını ve gücünü artırır (2, 51). MHZ'nin fosforilasyon durumu, fosforilasyonu artıran serin/treonin protein kinaz ve fosforilasyonu azaltan myozin fosfataz ile ikili olarak ayarlanmaktadır. Hakkında en çok şey bildiğimiz protein kinaz, myozin hafif zincir kinazdır (MHZK). Bu da  $10^{-6}$  M'dan daha yüksek sızozolik  $Ca^{2+}$  değerleriyle aktive olmaktadır. MHZ-20 fosforilasyonu kalsiyum yokluğunda da olmaktadır ve hala bunun bazal MHZK aktivitesi sonucu mu yoksa

diğer kinazlar sonucu mu olduğu tartışma konusudur (101, 102). Son zamanlarda, integrin ilişkili kinazın MHZ'yi  $Ca^{2+}$  dan bağımsız bir şekilde fosforile ettiği gösterilmiştir (103).

$Ca^{2+}$  aracılı bu yolağın myozin hafif zincir fosforilasyonunun düzenlendiği başlıca mekanizma olduğu uzun süreden beri kabul edilirken düz kas hücresinde  $Ca^{2+}$  duyarlaşması fenomeni analiz edilirken MHZ fosforilasyon derecesini ayarlayan ikinci bir yolak keşfedilmiştir. Çeşitli fizyolojik stimulusların sitozolik serbest kalsiyum konsantrasyonlarındaki bir artışın yokluğunda bile düz kas kasılmasını indükleyebildiği iyi bilinmektedir. (104, 105, 106). Çeşitli çalışmalar göstermiştir ki, bu kalsiyumdan bağımsız regülasyon myozin fosfatının inhibisyonuyla olmaktadır ve bir monometrik GTP bağlayan protein olan RhoA'yı içermektedir (2, 74, 75, 87, 107). RhoA'nın aktivasyonu, Rho-kinazı da aktive eder. Rho-kinaz daha sonra, myozin fosfatının regülatuar myozin bağlayan alt ünitesini fosforile eder ve bu da enzimde inhibisyon neden olur (46, 53, 77). Böylece artmış aktomyozin aktivitesi,  $Ca^{2+}$  mediyatörlüğündeki MHZK aktivasyonu ve Rho bağımlı MHZ defosforilasyonunun inhibisyonuyla sağlanır (Şekil-1).

## **2.2.1. Rho/Rho-kinaz ve anormal damar düz kas kontraktilitesi**

### **2.2.1.1. Hipertansiyon**

Artmış damar direnci hipertansiyonun patogenezinin sorumludur ancak bunun moleküler mekanizması tam olarak tanımlanamamıştır. Vasküler tonusun Rho/Rho-kinaz aracılı regülasyonundaki değişiklikler, artmış damar direncinin nedeni gibi gözükmektedir. Spontan hipertansif sıçanlarda agonistlerle indüklenen  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasının artmış olduğu (108) hem Rho-kinaz mRNA düzeylerinin hem de Rho-kinaz aktivitesinin hipertansiyonun başlangıcında yüksek olduğu saptanmıştır (1) Bazı hipertansiyonlu sıçanlara Rho-kinaz inhibitörü olan Y-27632 uygulaması kan basıncını

düşürmüştür fakat normal kan basıncı üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (4). Diğer bir Rho-kinaz inhibitörü fasudilin uzun süreli kullanımında media tabakasındaki kalınlaşma ve perivasküler fibrozis inhibe olmuştur. Bu bilgi kuvvetle düşündürmektedir ki, Rho/Rho-kinaz aracılı sinyal iletimi, hipertansiyon patojenezinden sorumlu olabilir. İnsanlarda fasudil ön kol kan akımını artırır ve vasküler direnci düşürür. Bütün bunları hipertansif hastalarda, normotansiflerden daha fazla yapar (109). Bu da insan hipertansiyonunda da Rho-kinaz artmış damar direncinde rol oynadığını göstermektedir.

### **2.2.1.2.Vazospazm**

Subaraknoid hemoraji sonucu olan serebral vazospazm, subaraknoid hemorajinin neden olduğu morbidite ve mortalitenin başta gelen sebebidir. Fasudil'in subaraknoid hemorajiden sonra serebral vasospazmdaki faydalı etkileri bu maddenin bir Rho-kinaz inhibitörü olduğu bulunmadan önce de biliniyordu (110, 111). Subaraknoid hemoraji sonrası oluşan vazospazmdan artmış MHZ fosforilasyonunun sorumlu olduğuna ilişkin kuvvetli kanıtlar bulunmaktadır. Köpeklerin cisterna magnasına otolog kan enjeksiyonu basiler arterde hiperkontraksiyona, Rho-kinaz aktivitesinde ve MHZ fosforilasyonunda artışlara neden olmaktadır. Bütün bu etkiler, Rho-kinaz inhibitörü olan Y-27632 ile engellenmiştir (96). İnsanlarda fasudilin intraarteriyel infüzyonu, subaraknoid hemoraji sonrası olan vazospazmda anjiyografik olarak saptanan düzelme sağlamıştır (112). Fasudil Japonyada 1995 yılında subaraknoid hemoraji sonrası serebral vasospazm için geliştirilmiştir.

Koroner arter spazmı, anjina, akut miyokard enfarktüsü, ventriküler aritmiler ve ani ölüm gibi birçok iskemik kalp hastalığından sorumludur (113). Koroner spazmdaki MHZ fosforilasyonunun rolü, bir inflamatuvar sitokin olan interlökin-1 $\beta$ 'nin lokal uygulanmasıyla aterosklerotik değişiklikler ve adventisyal inflamatuvar lezyonların indüklendiği domuz koroner arterlerinde araştırılmıştır. Etkilenmiş segmentler serotonin uygulanmasına hiperkontraksiyon ve MHZ fosforilasyonda bir artış şeklinde

cevap vermiştir ve ROK $\alpha$ , mRNA düzeyleri artmıştır (26). Bu etkiler fasudil ve Y-27632 ile engellenmiştir (114, 115).

Efor anjinalı bir köpek modelinde hidroksifasudil bölgesel kan akımını artırarak myokardı iskemiden korumuştur (116). İnsanlardaki vazospastik anjina pektorisde fasudil uygulanması asetilkolinle indüklenen koroner spazmı engellemiş (117) ve oral olarak uzun süreli fasudil tedavisi alan hastalarda stabil efor anjinasındaki egzersize toleransı artmıştır (118). Bu bilgiler kuvvetli bir şekilde göstermektedir ki, Rho/Rho-kinaz aracılı sinyal iletimi, kan damarlarındaki spazmın neden olduğu bir çok hastalıkta önemli bir rol oynayabilmektedir.

### **2.2.1.3. Bronşiyal astım**

Bronşiyal astımı olan hastalarda genellikle havayolu düz kaslarında aşırı bir kontraktilite mevcuttur (119). Benzer bir durum antijen inhale etmiş olan sıçan modeli için de geçerlidir. Bu hayvanlar, reseptör dansitesinde ve afinitesinde bir artış olmaksızın asetilkoline karşı artmış bir bronşiyal kontraktilite gösterirler (120). Havayolu duyarlılığı olan hayvanlarda asetilkolin'e cevap olarak yüksek bronşiyal RhoA protein düzeyleri, artmış RhoA translokasyonu ve artmış kalsiyum duyarlılığı gösterilmiştir (121). Bütün bu olaylar, Rho inhibitörü C3 eksoenzimiyle bloke edilmiştir (122). Kobaylarda Y-27632 inhalasyonu, asetilkolin veya ovalbumin ile indüklenen hava yolu rezistans artışını inhibe etmiştir (123). Böylece Rho/Rho-kinaz aracılı sinyal iletiminin inhibisyonu bronşiyal astımdaki havayolu kontraktilesinin tedavisinde önemli bir rol üstlenebilecektir.

### **2.2.1.4. Preterm eylem, erektil disfonksiyon ve glokom**

Rho-kinaz ekspresyonunun hamilelik boyunca arttığı gösterilmiştir (124). Hamile sıçanlarda Y-27632, oksitosinin indüklediği uterin kasılmalarının inhibe etmektedir ve bu da preterm eylemde işe yarayabilir (125). Ancak insan uterusunda



spontan ve oksitosin ile indüklenen kasılmalarda Y-27632'nin etkisinin oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (126).

Rho/Rho-kinaz aracılı vazokonstriksiyon, penis sirkülasyonunun düzenlenmesinde de bir role sahiptir. Y-27632 enjeksiyonu intrakavernöz basıncı artırarak sıçanlarda ereksiyona neden olur. Bu etki NO/cGMP yolağından bağımsızdır ve erektil disfonksiyonda kullanılabilir (14, 127).

Glokomda göz içi basıncı, göziçi sıvısının artışı ya da bu sıvının tahliyesinin azalması ile artar. Kültürü yapılmış insan trabeküler ağ hücreleri ile Schlemm kanalı hücrelerinde Y-27632, hücreler şekil değişikliğine, aktin stres fibrillerinin azalmasına ve fokal adezyon odaklarında bir düşmeye neden olmuştur Tavşan gözüne Y-27632 uygulanması, göz içi basıncında azalma ve göz içi sıvısının tahliyesinde bir artış olmuştur. Bunun muhtemel sebepleri trabeküler ağdaki değişiklik ve silyer kastaki gevşeme olabilir (128, 129).

#### **2.2.1.5. Myokard hipertrofisi**

Myokard hipertrofisi arteriyel hipertansiyon ve kapak hastalıklarında olduğu gibi kalbin artmış iş yüküne olan adaptasyonudur. Myokard hipertrofisi aritmi, enfarktüs ve kalp durması gibi ikincil hastalıklara da sebep olabilir (130). Hipertrofik cevap, myosit boyutunda büyüme, kontraktıl proteinlerde kümeleşme ve ventriküler beta myozin ağır zinciri veatriyel natriüretik faktörün (ANP) genleri gibi bazı fetal genlerin reekspressyonu ile karakterizedir (131). Rho'nun myokard hipertrofisindeki rolü esasen, kültüre edilmiş neonatal sıçan ventriküler myositlerinde incelenmiştir. Bu modelde  $G_{q/11}$  türü G proteinleri ile kenetli reseptörü olan fenilefrin, endotelin veya anjiyotensin gibi agonistler hipertrofik bir cevap oluşturmuştur. Bu deneylerde C3 eksoenzimi ve dominant negatif Rho, fenilefrinin indüklediği hipertrofiyi, myofibril oluşumunu ve fetal genlerin reekspressyonunu inhibe etmiştir (132, 133). Ve bütün bunlar Y-27632 için de böyle olmuştur (134, 135). Rho'nun kardiyomyosit fonksiyonlarındaki etkisi karışık görünmektedir. Sıçanlarda RhoA'nın aşırı ekspresyonu kalpte hipertrofi yerine

atrial genişleme, sol ventrikül dilatasyonu ile sinus ve atrioventriküler iletiminde bir bozulmaya yol açmıştır (136).

### **2.2.2. Rho-kinaz ve anormal düz kas hücre proliferasyonu**

Hipertansiyon, ateroskleroz, postanjyoplasti restenozu, transplant arteriosklerozu gibi birçok damar hastalıklarının nedeni anormal vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve göçüdür. Trombinin indüklediği vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu in vitro olarak C3 ekzoenzimi ve bir Rho-kinaz inhibitörü olan Y-27632 ile engellenebilmektedir. Domuz koroner arterlerindeki ateroskleroz benzeri vasküler lezyonlar, adenovirüslerle transfer edilen dominant negatif Rho-kinaz ile (137) veya uzun süreli fasudil tedavisiyle gerilemiştir (115).

Vasküler düz kas hücre proliferasyonunu ilgilendiren diğer bir patolojik süreç de, perkütanöz translüminal koroner anjioplasti sonucu olan restenozdur ki, bu da bu tür hastaların % 30-40'ında morbidite ve mortalite sebebidir. Restenozda görülen en önemli durum dediferensiyasyon, migrasyon ve proliferasyon sonucu gelişen neointima oluşumdur (138). Sıçan karotisinde dominant negatif Rho-kinaz gen transferi ve Y-27632 verilmesinden sonra neo-intimal oluşumun azaldığı gösterilmiştir (99, 139).

### **2.2.3. Rho/Rho-kinazın yolağının kas dışı hücrelerdeki fizyoloji ve patofizyolojiye katkısı**

#### **2.2.3.1. Tümör hücre göçü ve metastaz**

Epitelyal orijinli birçok malign tümör, hastalık boyunca yerleşik yaşamdan hareketli ve göç eden bir yaşama kayabilirler. Bu dönüşüm tümörün hareketliğinde ve yayılmasındaki artıştan kaynaklanır ve böylece tümörün metastazı ve yayılmacılığı artar (140). Tümör hücre göçü, Rho aracılı bir süreci içerebilir. Sıçan hepatoma

hücrelerindeki invazyonun RhoA aktivasyonuna bağlı olduğu görülmüştür (141, 142). Bir çok modelde Rho-kinaz inhibitörlerinin tümör büyümesini ve metastazını engellediği görülmüştür (143, 144). Bu bulgular Rho/Rho-kinaz aracılı yolun yeni antikanser stratejilerinde önemli rol oynayacağını gösterir.

#### **2.2.4. Hidroksimetil glutaril Ko-enzim A (HMG-KoA) redüktaz inhibitörleri ve Rho/Rho-kinaz aracılı sinyal iletimi**

##### **2.2.4.1. Endotel disfonksiyonu**

Endotel disfonksiyonu terimi, ateroskleroz, hipertansiyon ve variant anjina gibi kalp hastalıkların patogenezinden sorumlu olan endoteldeki patolojik değişiklikleri tanımlar. Endotel disfonksiyonun önemli özellikleri nitrik oksid yaranlanımındaki azalma ve/veya endotelin-1, anjiotensin-2 ve oksidanlar gibi kastırıcı faktörlerle endotel kaynaklı gevşetici faktörler arasındaki dengesizliktir (145).

Endotel disfonksiyonun Rho'nun potansiyel rolü, L-mevalonik asit sentezini azaltarak kolesterol düzeylerini düşüren HMG-KoA redüktaz inhibitörlerinin (statinler) kullanıldığı klinik çalışmalarla ortaya konmuştur. Bazı hipotezlere göre statin tedavisi Rho GTPaz seviyelerini azaltmaktadır. Sığır aortasındaki endotelial hücrelerde statin tedavisi ile preproendotelin ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Statinlerin bu etkisi C3 eksoenzimi ve dominant negatif Rho'nun aşırı ekspresyonu ile ilgili olabilir. İnsan endotelial hücrelerinde nitrik oksid sentazın endotelial isoformunun ekspresyonu mevastatinle artmıştır ve bu etki geranil geranillenmiş pirofosfat ile de inhibe olmuştur (146). İnsan umbilikal ven endotelial hücrelerinde trombinle indüklenen nitrik oksid sentaz (eNOS)'in "down" regülasyonu, C3 eksoenzimi ve Y-27632 ile önlenmiştir (147). Statinlerin Rho proteinlerinin fonksiyonu ve prenilasyonu üzerindeki etkileri bu ajanların endotelial disfonksiyon gibi patolojik proseslerdeki bazı faydalı etkilerini açıklayabilir.

### 2.2.5. Rho/Rho-kinaz Yolağının Diğer Rollerini

Bazı alışmalar Rho/Rho-kinaz aktivasyonu agonistle indüklenen gastrointestinal düz kasın tonik kasılmaları için esansiyel olabileceğini göstermiştir (107, 148). Ayrıca sıçanlarda yapılan in vivo bir modelde Y-27632 nin gastrik motiliteyi inhibe ettiği gösterilmiştir (149).

Nötrofiller, lenfositler ve trombositlerin de içinde bulunduğu bazı hematopoetik hücrelerde Rho/Rho-kinaz yolağı aktin hücre iskeletinin regülasyonuna aracılık eder ve bu düzenleyici prosesin hücre aktivasyonu, kemotaksis ve trombosit şekil değişikliği gibi olaylarda rol oynadığı gösterilmiştir (150, 151, 152, 153, 154, 155).

Rho/Rho-kinaz'ın kemik oluşumunu negatif olarak düzenlediği ve Rho/Rho-kinaz yolağının inhibisyonunun, özellikle glukokortikoid kullanımıyla ortaya çıkan osteoporozu önleme açısından faydalı bir strateji olabilir (156). Rho/Rho-kinaz sinyal ileti yolunun nöronlarda da mevcut olabileceği ve dendritik paternin aksonal büyüme kon dinamikleri ve aksonal ilerleme gibi nöronal morfojenenezisin bir çok olaylarına aracılık edebileceği bildirilmiştir (157, 158, 159).

Sonuç olarak, RhoA ve onun en önemli efektörü olan Rho-kinaz hücreSEL ve biyolojik bir çok fonksiyonda önemli rol oynayabilir. Son yıllarda bu sinyalizasyon yolunun anlaşılmasında önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Bu yol hakkında hala pek çok şeyi bilmesek de, şu çok açıktır ki, Rho/Rho-kinaz yolağı düz kasta tonus artışıyla giden birçok hastalıkta önemli olabilir. Ayrıca düz kas olmayan hücrelerde de kaynaklanan birçok hastalıkta da rol oynayabilir. Bir çok hayvan modelinde Rho/Rho-kinaz sinyal iletiminin inhibe edilmesi bazı tür patolojilerin tedavisinde başarılı sağlamıştır. Bu gelişmeler, Rho/Rho-kinaz aracılı sinyal iletimi yolunun hipertansiyon ve astım gibi sık görülen hastalıklarda tedavi için hedef olabileceğini göstermiştir. Gelecekte göreceğiz ki, bu yolu inhibe ederek uygulanan pek çok tedavi yöntemi geliştirilecektir. İnsan hastalıklarında Rho/Rho-kinaz'ın inhibisyonunun güvenli ve faydalı olup olmayacağını görmek ilginç olacaktır.



## 2.3. Kan Basıncının Düzenlenmesinin Fizyolojik Kontrolü

### 2.3.1. Kalp Debisi

Kalbin bir dakikada aortaya pompaladığı kan miktarıdır. Bu aynı zamanda dolaşımda akan kan miktarı olup, maddelerin dokulara ve dokulardan taşınmasından sorumludur. Bundan dolayı kalp debisi, dolaşımla ilgili olarak göz önüne alınması gereken faktörlerin belki de en önemlisidir. Venöz dönüş venlerden sağ atriya da bir dakikada akan kan miktarıdır. Venöz dönüş ve kalp debisi, kanın kalpte veya akciğerlerde geçici olarak biriktiği veya uzaklaştırıldığı birkaç vuru dışında birbirine eşit olmak zorundadır. Kalp debisi vücudun aktivite düzeyiyle geniş ölçüde değişir. Bu nedenle, diğer faktörler kadar,

- 1-Vücut metabolizmasının düzeyi
- 2-Kişinin egzersiz yapması
- 3-Yaş
- 4-Vücut büyüklüğü gibi bazı faktörler kalp debisini etkileyebilir.

Kalp debisinin kontrolünde genellikle periferik faktörlerin daha önemli olmasının ana sebebi, kalbin, venlerle sağ atriya da gelen tüm kanın otomatik olarak pompalanmasını sağlayan bir mekanizmaya sahip olmasıdır. Kalbin Frank-Starling yasası denilen mekanizmasında temel olarak, kalbe gelen kan miktarı arttığı zaman kalp odacıklarının duvarının gerildiğini ifade eder. Gerilmenin bir sonucu olarak kalp kası, belirli sınırlar içerisinde olmak üzere daha güçlü kasılır ve genişlemiş odacıkları her zamanki kadar boşalır. Bundan dolayı, kalbe fazladan gelen kan otomatik olarak hiç gecikmeden aorta pompalanır ve tekrar dolaşıma katılır.

Periferik dolaşımın tüm bölümlerindeki lokal kan akımlarının toplamı, kalbe venöz dönüşü verir. Buna bağlı olarak, kalp debisi düzenlenmesinin tüm lokal kan

akımı düzenlenmelerinin toplamı olduğu anlaşılmaktadır. Pek çok dokunun kan akımı, başlıca o dokunun metabolizmasıyla orantılı olarak artar.

### 2.3.2. Total periferik damar direnci

Arteriyal basıncın normal tutulduğu zaman, uzun süreli kalp debisi düzeyi total periferik dirençteki değışikliklere tamamen karşıt olarak değışmektedir. Total periferik direnç tamamen normal olduğu zaman kalp debisi de normal düzeydedir. Arteriyel basınç ile total periferik direnç arasındaki ilişkinin kalp debisi üzerinde etkisi,

$$\text{Kalp debisi} = \text{Arteriyel basınç} / \text{Total periferik damar direnci}$$

formülü ile gösterilmiştir. Total periferik direnç arttığında kalp debisi düşer, tersine total periferik direnç azaldığında kalp debisi artar. Yüksek kalp debisi hemen hemen daima azalmış total periferik direnç nedeniyle görülür.

### 2.3.3. Kan Akımının Dokular Tarafından Lokal Kontrolü ve Hümorale Düzenleme

#### 2.3.3.1. Lokal Kontrol

Dolaşımın en temel kurallarından birisi, her dokunun kendi kan akımını metabolik gereksinimlerine göre yine kendisinin belirlemesidir. Dokuların kan akımına neden ihtiyacı vardır? Bu soruya cevap olarak aşağıdaki faktörleri sıralayabiliriz.

- 1- Oksijenin dokulara taşınması
- 2- Glikoz, aminoasitler, yağ asitleri gibi besin maddelerinin dokulara taşınması
- 3- Karbondioksidin dokulardan uzaklaştırılması
- 4- Hidrojen iyonlarının dokulardan uzaklaştırılması
- 5- Dokulardaki diğer iyonların konsantrasyonlarının dengelenmesi
- 6- Çeşitli hormonların ve spesifik moleküllerin farklı dokulara taşınması

Lokal kan akımı iki kısımda incelenebilir. Akut kontrol, arteriyoller, metarteriyoller ve prekapiller sfinkterlerin lokal kasılmalarındaki hızlı değişikliklerle gerçekleştirilir ve lokal doku için gerekli kan akımını sağlamak üzere dakikalar veya saniyeler içinde görülür. Kronik kontrol ise, günler, haftalar hatta aylar içerisinde akımda meydana gelen yavaş değişiklikler anlamına gelir. Genel olarak uzun sürede meydana gelen değişiklikler dokuların ihtiyacı olan kan akımının kontrolünde daha iyi sonuçlar verir. Bu değişiklikler dokuya kanı getiren damarların sayısında veya fiziksel boyutlarında artma veya azalma şeklinde kendini gösterir.

### **2.3.3.2. Dolaşımın Hümorale Kontrolü**

Dolaşımın humoral regülasyonu, vücut sıvılarına salgılanan veya absorbe edilen hormonlar ve iyonlar tarafından meydana getirilen regülasyon anlamına gelmektedir. Bu maddelerden bazıları özel salgı bezleri tarafından yapılarak kana verilerek bütün vücuda yayılmaktadır. Diğerleri ise lokal doku alanlarında oluşarak sadece lokal dolaşımı etkilemektedir. Hümorale faktörlerden dolaşım fonksiyonlarına en çok etkili olanları şunlardır.

### **2.3.4. Vazokonstriktör Ajanlar**

#### **2.3.4.1. Noradrenalin ve Adrenalin**

Özellikle noradrenalin güçlü bir vazokonstriktör maddedir. Adrenalinin (adrenalin), vazokonstriktör etkisi daha azdır çünkü bazı durumlarda zayıf bir vazodilatör etki gösterebilir (kalp aktivitesi arttığında koroner arterlerde dilatasyon). Egzersiz veya stres sırasında sempatik sinir sisteminin vücudun birçok veya tüm bölümlerinde uyarılması durumunda dokulardaki sempatik sinir uçlarından noradrenalin salıvererek arteriyollerin, venlerin ve kalbin uyarıldığı görülür. Adrenal medulladaki

sempatik sinirlerin uyarılması buradan da kana noradrenalin ve adrenalin salgılanmasına yol açmaktadır. Bu hormonlar vücudun bütün kısımlarına ulaşarak direkt sempatik stimülasyonun meydana getirdiği uyarıcı etkinin hemen hemen benzeri bir etki ile çift taraflı bir kontrol sistemi oluştururlar.

#### **2.3.4.2. Anjiotensin**

Anjiotensin bilinen vazokonstriktör maddelerin en güçlü olanlarından biridir. Anjiotensin etkisini küçük arteriyelleri güçlü bir şekilde kasarak gösterir. Eğer bu olay izole bir doku alanında görülürse bu alana giden kan akımı ciddi bir şekilde azalmış olur. Anjiotensinin asıl önemi, vucuttaki bütün arteriyollere aynı anda etkili olarak total periferik rezistansı artırıp kan basıncını yükseltmesi nedeniyle ortaya çıkar. Bu nedenle anjiotensin çeşitli renal ve adrenokortikal stimüle edici etkileri ile birlikte arteriyel basıncın regülasyonunda önemli bir rol oynar.

#### **2.3.4.3. Vazopressin**

Antidiüretik hormon olarak da adlandırılmakta ve vazokonstriktör olarak anjiotensinden bile güçlü olduğu kabul edilmektedir. Hipotalamusta oluşan vazopressin sinir aksonu boyunca taşınarak kana karıştığı yer olan arka hipofiz bezine ulaşmaktadır. Diğer taraftan yapılan deneysel çalışmalar ciddi kanama halinde dolaşımdaki vazopressin konsantrasyonunun kan basıncını 60 mmHg yükselterek birçok dokuda normal seviyeye getirilebilecek kadar yüksek olduğunu göstermektedir.

#### **2.3.4.4. Endotelin**

Anjiotensin ve vazopressinin, vazokonstriktör etkileri ile yarışabilecek bir diğer madde de, büyük bir peptid olan (21 amino asid) endotelindir. Endotelin sadece nanogram düzeylerinde bile güçlü bir vazokonstriktör etki oluşturabilir ve endotel



hücreleri ile hemen hemen bütün kan hücrelerinde bulunmaktadır. Endotelin salıverilmesinin doğal stimülatörü dokularda meydana gelen ezilme veya travmatize edici kimyasal bir maddenin enjeksiyonu ile oluşan endotel hücre hasarıdır. Kan damarında meydana gelen ciddi bir hasarı izleyerek lokal olarak salıverilen endotelin, vazokonstriksiyona neden olarak çapı 5 milimetreye kadar olan arterlerde yırtılma veya ezilme sonucu meydana gelen aşırı kanamayı engelleyebilir (160).

### **2.3.5. Vazodilatatör Ajanlar**

#### **2.3.5.1. Nitrik oksid**

Nitrik oksid doğada yüzmilyonlarca bulunan bileşikler içinde en küçük molekül ağırlığına sahip ilk on bileşikden birisidir. Proteinler gibi büyük moleküllerin biyolojik olarak aktif oldukları hücrelerde böylesine küçük moleküllu ve basit bir inorganik gaz olan NO'nun hücreyel etkiler oluşturması gerçekten çok ilginçtir. Bu maddenin hücreler için oldukça önemli bir yeri bulunmaktadır. NO vücutta L-arjinin aminoasidinden sentezlenir.

##### **2.3.5.1.1. Vasküler sistem**

Nitrik oksid, damar endoteliumundan çeşitli stimülan ajanlar tarafından salgılanır. Damar endoteliumundan NO salıverdiği düşünölen maddelerden bazıları şunlardır: Asetilkolin, P maddesi, histamin, trombin, araşidonik asid, serotonin, noradrenalin, anjiotensin, endotelinler, şarapta bulunan polifenoller, bradikinin, ATP, ultraviyole ışığı ve diğer bazı stimülanlar. Salıverilen NO, damar düz kasında guanilat siklaz enziminin  $Fe^{2+}$  atomuna bağlanarak bu enzimi aktive eder. Guanilat siklazın aktivasyonunu takiben bir takım biyokimyasal olaylar silsilesi başlar. Bu olaylar vasküler düz kasın gevşemesi ile sonuçlanır. Kalbin her pompalama fonksiyonunda

damar duvarının gerilmesi ile devamlı bir NO salıverilmesi bulunmaktadır. Salıverilen NO, hem damarların rezistansını ayarlar hem de trombositlerin kümelenmesini önler.

### **2.3.5.1.2. Kalp**

Kalbin endokardiyumundan nitrik oksid salıverilmesi gösterilmiştir. Salıverilen NO'nun kalbin kontraktilesini düzenleyebileceği bildirilmiştir. Ayrıca koroner damarlardan salıverilen NO, kalbin iyi beslenmesi için fonksiyon görmektedir. Koroner damarlarda tıkanmaya bağlı gelişen aritmi olayında NO sorumlu olabilir. İskemik bölgelerde hücre içi pH'sının azalması sonucunda intraselüler nitritten NO meydana gelir. Yüksek konsantrasyona çıkan NO, hücre içi hasarı artırılabilir. Buna ek olarak NO hücre membranındaki  $K^+$  kanallarını açarak hücre içinden dışarı mütemadiyen potasyum kaybına neden olur. Bu olay, myokard infarktüsü sırasında gelişen ölümcül aritmilerin gelişmesine katkıda bulunabilir. Sonuç olarak NO'ye bağımlı vazodilatör tonusun tamamıyla lokal olarak düzenlediği ve böylelikle kardiyovasküler sistemde en basit ve şimdiye kadar gösterilen en esaslı adaptif mekanizma olduğu bildirilmektedir. Yani bu sistemde NO oluşumuna bağlı aktif bir vazodilatasyon bulunmaktadır.

### **2.3.5.1.3. Trombositler**

L-arjinin-NO yolağı, trombositlerin agregasyonu ve adezyonunu inhibe eder. Bu inhibisyona intratrombositler cGMP düzeylerinin artışı arcılık eder. cGMP düzeyinin yükselmesi, trombositlerin hem damar duvarına yapışmasını (adezyon) ve hem de trombositlerin birbirlerine yapışıp kümelenmesini (agregasyon) önlerken, cAMP düzeylerinin artması ise sadece trombositlerin adezyonunu inhibe eder. Trombositlerin kümelenmesine aracılık eden en önemli basamak bu cisimlerin sitoplazmasına kalsiyumun girmesidir. NO, trombosit içine  $Ca^{2+}$  girişini bloke ederek bunların agregasyonunu ve adezyonunu engeller. Trombositlerin agregasyonu NO yanında prostasiklin ile de bloke edilir.

#### 2.3.5.1.4. NO ve vasküler tonusun düzenlenmesi

NO, bütün yüksek organizmalarda, kardiyovasküler sistem vital fonksiyonlar için gereklidir. Oksijen ve besinler dokulara taşınırken, metabolit ürünler ortadan kaldırılır. Dokuların değişen ihtiyaçlarına uyum sağlamak için dolaşım sistemi yeterli kan akımı sağlamak için merkezi ve lokal kontrol mekanizmalarına sahiptir. Verilen bir kan basıncında, her organa kan akımı o organın periferik vasküler direnci tarafından belirlenir. Periferik vasküler direnç ise resistan damarların, örneğin küçük terminal arterler ve büyük ve küçük arteriyoller, düz kas hücrelerinin tonusunu etkileyen çeşitli lokal mekanizmalar tarafından belirlenir. Son yıllarda, biriken deneysel ve klinik kanıtlar endotel hücrelerden salınan NO'nun arteriyel iletimde hayati bir düzenleyici olduğunu ve bu yolla doku perfüzyonu için yeterli düzenlenmenin yapıldığını göstermiştir.

Bir damarda akan kan, endotelin luminal yüzeyinde bir sürtünme kuvveti oluşturur. Bu kuvvet in vivo sürekli NO üretiminin ana uyarıcısı olup myo veya nörojenik olarak indüklenen damar kasılmasına fazlaca duyarlı bir sistemdir. Diğer bir takım endotel kaynaklı vazodilatör ve vazokonstriktör otakoidler (endotelin-1, prostasiklin, prostaglandin H<sub>2</sub>, superoksit anyon (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve endotelden türeyen hiperpolarize edici faktör) serbest radikal NO gibi vasküler tonus ve hemostaz düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaz.

İlginç olarak 60 yıldan daha fazla süre önce, Schretzenmayer (1933) akımla indüklenen dilatasyon için ilk deneysel kanıtı sağlamıştır. Anestezisi almış kedinin arka bacağına her kan akımı artışında, femoral arterin çapında bir artışı gözlemlemiştir. Araştırmacı, bu akıma bağlı dilatasyon yanıtının damar ağı boyunca dokudan türeyen sinyalle ilişkili olduğunu bildirmiştir. İleri çalışmalar yüksek doku oksijen ihtiyacı olduğunda arterlerde 'santral kaynaklı dilatasyon' kavramını gösterdi. Ancak, damarın daha sonraki segmentlerinde dilatasyon gösterilemedi, dolayısıyla gevşetici yanıt damar duvarının lokal olarak üretilen bir fenomeni idi; yani asendan bir sinyalle ilgisi yoktu. Furchgott ve Zawadski'nin endotelyumun, bir labil relaksan faktör salarak, aktif olarak vasküler tonus değişiklikleri yaptığını bildirmesi, endotel hücrelerin potansiyel rolünü

ortaya çıkardı. Aslında rezistan arterlerde olduğu gibi büyük konduit arterlerde endotel hücrelerinin akım sinyallerini algılama ve vazodilatör yanıt sağlama özelliği göstermişti. Dahası, klinik çalışmalar insanlarda değişik damar yataklarında oluşan akıma bağlı dilatasyonun hiperkoleserolemi ve arteriosklerozda azaldığını göstermişti (161).

#### **2.3.5.2. Prostasiklin**

Endotelde ve az miktarda olmak üzere damar düz kas hücrelerinde yapılırlar. Prostasiklinler, damar içinde trombus oluşmasını engelleyen en önemli etkenlerdir.

#### **2.3.5.3. Bradikinin**

Kininler olarak adlandırılan çeşitli maddeler kanda ve bazı organ sıvılarında oluşarak güçlü vazodilatasyona neden olabilirler. Bradikinin güçlü bir vazodilatasyona ve kapiller permeabilitede artışa neden olur.

#### **2.3.5.4. Histamin**

Histamin hasara ve inflamasyona uğrayan veya allerjik reaksiyona maruz kalan hemen hemen bütün dokulardan salıverilebilir. Histaminin büyük bir kısmı hasarlı dokudaki mast hücrelerinden veya kandaki bazofillerden kaynaklanmaktadır. Histamin arteriyollerde güçlü bir vazodilatasyona yol açar ve bradikinin gibi kapiller porların genişlemesine, plazma proteinlerinin ve sıvının doku içine sızmasına neden olur. Bir çok patolojik durumda histamin tarafından meydana getirilen arteriyoler vazodilatasyon ve artmış kapiller por çapı nedeniyle fazla miktarda sıvı doku içine geçer ve ödem gelişir (160).



### 2.3.5.5. Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör

Bu faktörün, endotel-bağımlı gevşeme oluşturan ajanlar tarafından endotel hücrelerden EDRF ile birlikte salıverilebilen hipotetik bir faktör olduğu sanılmaktadır. Kimyasal doğası henüz bilinmemekle beraber araşidonik asid metaboliti, P450 sitokrom ürünü veya  $K^+$  iyonunun kendisi gibi olası adaylar bulunmaktadır, ancak bunların hiç biri inandırıcı olarak kanıtlanmış değildir. Düz kas hücre “patch clamp” deneylerinden elde edilen verilere göre bu ajanın  $K^+$  kanallarını açarak hiperpolarizasyon oluşturduğu tespit edilmiştir. En az 3 çeşit potasyum kanalının NO-aracılı olmayan endotel bağımlı vazodilatasyona aracılık ettiği bildirilmiştir. Bunlar apamin, karibdotoksin ve glibeklamide duyarlı kanallardır. Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktörün özellikle damar çapının küçük olduğu arterlerde daha fazla rol oynadığı görülmektedir. Buna karşılık aorta gibi büyük damarlarda, endotel-bağımlı gevşeme cevaplarına NO'nun katkısı daha fazladır (162)

### 2.3.5.6. Asetilkolin

Genel olarak damar düz kaslarını ve sfinkter kaslarını gevşettikleri halde, diğer yapıların düz kaslarını kasar. İnsanda pulmoner ve sistemik arter yataklarının pek çoğunda vazodilatasyon yapar. Vazodilatasyon oluşturmalarında damar düz kaslarındaki direkt etkilerinden ziyade damar endotel hücrelerinin membranındaki muskarinik reseptörleri aktive etmeleri rol oynar. Bu olay sonucu salıverilen ve damar düz kas tabakasına geçen nitrik oksid (endotel kaynaklı gevşetici faktör) damarların gevşemesine neden olur. Endoteli sıyrılmış izole arter şeritlerinde asetilkolin ve diğer muskarinik agonistler gevşemeye değil, kasılmaya neden olur. NO düz kaslarda guanilat siklazı aktive ederek gevşeme yapar. İnsanda normal koroner arter yatağı içine enjekte edilen asetilkolin vazodilatasyon yaptığı halde, aterosklerotik damar yatağında vazokonstriksiyon yapar. Vazodilatasyon nedeniyle arteriyel kan basıncını düşürürler. Bu sırada genellikle taşikardi oluşur. Taşikardi ilacın refleks etkisine bağlıdır (163).



## **2.4. Dolaşımın sinirsel Düzenlenmesi**

Sinir sistemi kan akımının vücudun değişik bölgelerine yeniden dağılımının düzenlenmesi, kalbin pompalama gücünün artırılması ve özellikle kan basıncının hızlı kontrol mekanizmalarının çalışması gibi genel fonksiyonlardan sorumludur.

### **2.4.1. Otonomik Sinirler**

Otonom sinir sisteminin dolaşım ile ilgili en önemli bölümü sempatik sinir sistemidir.

#### **2.4.1.1. Sempatik Sinir Sistemi**

Sempatik vazomotor sinir lifleri omuriliği (medulla spinalis) tüm torasik ve ilk iki lomber spinal sinirler ile terkeder. Daha sonra sempatik zincir içine giren sempatik lifler oradan dolaşıma iki ayrı yol ile ulaşır

1. Temel olarak iç organların damarlarını ve kalbi innerve eden özel sempatik sinirler
2. Başlıca periferik alanların damarlarını innerve eden spinal sinirler.

Küçük arterler ve arteriyollerin innervasyonu sempatik uyarı ile bu damarlarda direnç artışına böylece dokulara ulaşan kan akımının azalmasına imkan tanımaktadır. Büyük damarların özellikle venlerin innervasyonu, sempatik uyarının bu damarların hacmini azaltmasını sağlar. Bu kalbe dönen kan miktarını artırır, kalbin pompa işlevinin düzenlenmesinde önemli rol oynar.

### **2.4.1.2. Parasempatik Sinir Sistemi**

Parasempatik sinir sistemi diğer birçok otonom fonksiyon için oldukça önemli bir yere sahipken dolaşımın düzenlenmesinde sadece küçük bir rolü vardır. Dolaşım için gerçekten önemli olan tek etkisi medulladan direkt olarak vagus siniri ile kalbe ulaşan parasempatik lifler yoluyla kalp hızını kontrol etmesidir.

### **2.4.2. Hipotalamus**

Hipotalamus, vazokonstriktör sistemin kontrolünde önemli bir role sahiptir. Bu bölge, vazomotor merkez üzerinde güçlü eksitator veya inhibitör etki gösterebilmektedir. Hipotalamusun arka-yan kısımları esas olarak eksitasyon, ön bölgeler ise uyarılan ön hipotalamus bölgesine bağlı olarak hafif eksitasyon ya da inhibisyon meydana getirmektedir.

### **2.4.3. Arter Basıncının Hızlı Kontrolünde Sinir Sisteminin Rolü**

Dolaşımın sinirsel kontrolünün en önemli fonksiyonlarından biri kan basıncında hızlı yükselmeler sağlayabilme kapasitesidir. Bu amaçla, sempatik sinir sisteminin tüm vazokonstriktör ve kalp hızında artış sağlayıcı fonksiyonları birlikte uyarılır. Aynı zamanda kalbe giden parasempatik vagal inhibitör uyarılar da inhibe olur. Bunların sonucunda eşzamanlı olarak, hepsi arter basıncının yükselmesini sağlayacak olan üç temel değişiklik meydana gelir

1- Vücuttaki tüm arteriyollerde daralma meydana gelir. Bu total periferik direnci yükselterek kanın arterlerden akışına engel olur ve arter basıncının artmasına yol açar.

2- Başta venler olmak üzere dolaşımdaki diğer bütün büyük damarlar da güçlü bir şekilde daralır. Bu kanın geniş periferik damar yataklarından kalbe yönelmesine ve kalp boşluklarındaki kan hacminin artmasına neden olur. Bu da kalbin daha güçlü kasılmasına ve daha çok kanın pompalanmasına neden olur. Sonuç olarak yine arteriyel basınç yükselir.

3- Son olarak otonom sinir sistemi tarafından kalbin direkt olarak uyarılması kalbin pompalama fonksiyonunu daha da artırır. Bu etkinin büyük bölümü zaman zaman normalin üç katı kadar yükselen kalp hızı artışına bağlıdır. Ek olarak sempatik sinir kaynaklı uyarılar direkt olarak kalp kasının kasılma gücünü etkileyerek kalbin pompalama hacminin artmasına neden olur. Böylece güçlü sempatik uyarı altında kalp birkaç dakika için normal şartlar altındakinden iki ila üç kat fazla kan pompalayabilmektedir. Bu etki de kan basıncında daha da fazla bir artış nedeni olmaktadır.

#### **2.4.4. Normal Arter Basıncının Korunmasında Refleks Mekanizmalar**

Otonom sinir sisteminin egzersiz ve stres sırasında arter basıncını yükseltici fonksiyonlarının dışında arter basıncını normal sınırları içerisinde tutmak için devrede olan birçok bilinçdışı özel sinirsel kontrol mekanizması bulunmaktadır.

##### **2.4.4.1. Arteriyel Baroreseptör Kontrol Sistemi-Baroreseptör Refleksler**

Arter basıncının kontrolünde şimdiye kadar en iyi bilinen sinirsel mekanizma baroreseptör reflektir. Temel olarak, bu refleks, birkaç büyük sistemik arterin duvarında yer alan , baroreseptörler veya pressoreseptörler olarak adlandırılan gerim reseptörleri tarafından başlatılır. Basıncı meydana gelen artış baroreseptörleri gerer ve santral sinir sistemine uyarılar gönderilmesine neden olur. Bu sinyallere yanıt olarak otonom sinir sisteminden kaynaklanan “feedback” uyarılar dolaşıma ulaşır ve arter basıncını düşürerek normal seviyelerine döndürür. Baroreseptörler arter basıncındaki değişikliklere çok hızlı yanıt verirler; ancak uyarı hızı sistol sırasında artmakta, diyastol sırasında ise azalmaktadır. Dahası, baroreseptörler hızlı değişen basınçlara durağan basınçlardan çok daha fazla yanıt vermektedir. Yani, ortalama arter basıncı 150 mmHg civarında hızlı artış gösterirken meydana gelen uyarı iletimi, ortalama basınç 150 mmHg’da sabit iken meydana gelen uyarı iletiminden iki kat fazla olabilir. Diğer taraftan eğer basınç düşüyorsa uyarı hızı, sabit düzeydeki uyarı hızının dörtte biri kadardır.

Baroreseptörlerden gelen uyarılar, medullada nucleus tractus solitari'ye ulaştıktan sonra ortaya çıkan ikincil uyarılar medulladaki vazokonstriktör merkezi inhibe ederken vagal parasempatik merkezi uyarır. Ortaya çıkan net etki,

1- Periferik dolaşımdaki venlerin ve arteriyollerin vazodilatasyonu

2- Kalp hızında ve kasılma gücünde azalmadır.

Bu nedenle baroreseptörlerin arter basıncı ile uyarılması, refleks olarak hem periferik dirençte hem de kalp debisinde meydana gelen azalma ile arter basıncını düşürmektedir. Buna karşın düşük basınç tam tersi etki göstermekte, refleks olarak basıncın yükselmesine ve normal seviyesine dönmesine neden olmaktadır. Kişi yatar haldeyken ayağa kalktığında baroreseptörlerin kan basıncını sabit tutma yetenekleri önemlidir. Ayağa kalkar kalkmaz baş ve vücudun üst tarafında arter basıncı düşme eğilimine girer. Bu kısımdaki basıncın belirli şekilde düşmesi bilinç kaybına neden olabilir. Düşen basınç reseptörleri etkileyerek ani bir refleksin başlamasına neden olur. Bu refleks ile tüm vücutta kuvvetli sempatik uyarı meydana gelerek baş ile vücudun üst bölümlerindeki basınç azalmasını en aza indirir.

## **2.5. Arter Basıncının Uzun Süreli Düzenlenmesi ve Hipertansiyonda Böbreklerin Rolü**

Arter basıncının kontrolünde böbrek-vücut sıvısı sistemi basit bir mekanizma şeklinde çalışır. Vücut çok fazla ekstraselüler sıvı içerdiğinde kan hacmi ve arter basıncı yükselir. Basıncın yükselmesi direkt bir etki ile böbreklerin fazla ekstraselüler sıvıyı atmasına neden olur ve bu da basıncı tekrar normale döndürür. Ekstraselüler sıvı hacmindeki artış kan hacminin artışına sonuçta dolaşımın ortalama doluş basıncının artmasına böylece kalbe dönen venöz kan miktarında artma ile bunun kalp debisini artırması ve buna bağlı olarak arter basıncının artması gerçekleşir. Kalp debisindeki artış arter basıncını hem doğrudan, hem de toplam periferik direnci artırma yoluyla dolaylı olarak yükseltmektedir.

Dokularda kan akımı arttığı zaman lokal damarlar kasılarak kan akımını normal seviyesine döndürür. Bu olaya dokunun kendi kan akımını kendisinin düzenlediğini



belirtir şekilde basitçe “otoregülasyon” adı verilir. Artmış kan hacmi kalp debisini artırdığında tüm dokulara giden kan akımında artış olur. Bunun sonucunda bu düzenleyici mekanizma ile tüm vücuttaki kan damarları kasılır, bu da toplam periferik direnci artırır.

## 2.6. Hipertansiyon (Yüksek Kan Basıncı)

Bir kişide hipertansiyon bulunduğu söylendiğinde bu, o kişinin ortalama arter basıncının normal kabul edilen seviyenin üzerinde olduğunu belirtmektedir. İstirahat sırasında 110 mmHg'den yüksek bir ortalama arter basıncı değeri (normali yaklaşık 90 mmHg civarındadır) hipertansif bir değer olarak kabul edilmektedir. Bu derecede bir artış diyastolik arter basıncı 90 mmHg ve sistolik arter basıncı 135 ila 140 mmHg'nin üzerinde olursa ortaya çıkmaktadır. Ciddi hipertansiyon olgularında ortalama arter basıncı 150 ila 170 mmHg kadar olabilir. Bu durumda diyastolik basınç 130 mmHg ve sistolik basınç 250 mmHg kadar yüksek olabilir.

Arter basıncında meydana gelecek orta dereceli artışlar bile yaşam süresinin kısalmasına neden olmakta, yüksek basınç sözkonusu olduğunda normalin %50'si kadar yüksek ortalama arter basıncı kişinin uygun tedavi görmediği durumda, birkaç yıldan fazla yaşaması mümkün olmamaktadır. Hipertansiyonun ölüme neden olan etkileri başlıca 3 şekilde özetlenebilir.

1- Kalp yükünün artması erken evrede kalp yetersizliği ve koroner kalp hastalığına yol açmakta, bu da sıklıkla kalp krizi ve ölüm ile sonuçlanmaktadır.

2- Yüksek basınç sıklıkla beyinde bulunan ana damarlardan birinde yırtılmaya ve bunu takiben önemli beyin bölgelerinde hücre ölümü ile karakterize serebral infarktüse neden olur. Klinikte bu durum “felç” (inme) olarak isimlendirilir. Beynin etkilenen bölümüne bağlı olarak inme sonucunda paralizi, bunama, körlük veya diğer çeşitli ciddi santral sinir sistemi bozuklukları gelişebilir.

3- Yüksek basınç hemen her zaman böbreklerde çok odaklı kanamalara neden olmakta, buna bağlı olarak bir çok bölge haraplaşmakta ve sonuçta böbrek yetersizliği, üremi ve ölüme neden olmaktadır.



### 2.6.1. Renin-Anjiyotensin Sistemi

Basınç kontrolü ve hipertansiyondaki rolü: Böbrekler arter basıncını ekstraselüler sıvı hacmi değişiklikleri ile kontrol etme dışında çok güçlü başka bir basınç kontrol mekanizmasına da sahiptirler. Bu renin-anjiyotensin sistemidir. Renin küçük, protein yapısında bir enzim olup arter basıncı çok düştüğünde böbreklerden salgılır. Renin bir çok yoldan arter basıncının artmasına neden olur ve başlangıçtaki basınç düşüşünün düzeltilmesine yardımcı olur. Reninin inaktif formu olan prorenin böbreklerin jukstaglomerüler hücrelerinde (JG hücreler) sentez edilir ve depolanır. JG hücreler glomerüllerin hemen proksimalindeki afferent arteriyollerin duvarında bulunan farklılaşmış düz kas hücreleridir. Arter basıncı düştüğünde böbrek içerisinde gelişen olaylar JG hücrelerden bir çok prorenin molekülünün parçalanıp renin salıverilmesine neden olurlar. Reninin çoğu kan dolaşımına geçerek tüm vücuda yayılırken bir bölümü lokal sıvı içinde kalarak bir böbrek içi işlevleri başlatır. Renin bir enzimdir ve substratı olan anjiyotensinojen üzerine enzimatik bir etki ile 10-amino asitlik bir peptid olan anjiyotensin I'in salıverilmesine neden olur. Anjiyotensin I orta derecede vazokonstriktör özelliklere sahip olup tek başına dolaşım fonksiyonlarında anlamlı değişiklikler yapmaya yeterli değildir. Renin yaklaşık 30 dakika kadar dolaşımında kalarak anjiyotensin I oluşturmaya devam eder.

Anjiyotensin I, yapımından birkaç saniye sonra iki aminoasidini kaybederek 8-amino asitli bir peptid olan anjiyotensin II haline gelir. Bu değişim hemen tamamen kanın küçük akciğer damarlarından geçtiği birkaç saniye içinde gerçekleşir. Bu değişim akciğer damarlarının endotelinde bulunan bir dönüştürücü enzim (anjiyotensin dönüştürücü enzim, ADE) tarafından katalizlenir. Anjiyotensin-II oldukça güçlü bir vazokonstriktör olup dolaşım dışında da etkileri bulunmaktadır. Dolaşımında 1 ila 2 dakika kaldıktan sonra anjiyotensinazlar olarak adlandırılan, değişik dokularda ve kanda bulunan enzimlerce inaktive edilir. Anjiyotensin-II dolaşımında kaldığı süre içinde kan basıncını iki ayrı nedenle artırır.

Bunlardan birincisi hızla oluşan vazokonstriksiyondur. Vazokonstriksiyon arteriyollerde oldukça güçlü iken venlerde daha az oranda meydana gelir. Arteriyollerin kasılması periferik damar direncini artırarak arter basıncını yükseltir. Venlerde

meydana gelen orta dereceli kasılma ise kalbe venöz dönüşü arttırarak, kalbin yükselen basınca karşı pompalama gücünü arttırır.

Anjiyotensinin arter basıncını arttırıcı diğer etkisi böbreklerden su ve tuz atılımını azaltmak yoluyla gerçekleşir. Bunun sonucunda ekstraselüler sıvı hacmi yavaş yavaş artmakta, bu da saatler ve günler içinde arter basıncının yükselmesine neden olmaktadır. Bu ekstraselüler sıvı hacmi mekanizmalarına bağlı olarak gelişen uzun süreli etki arter basıncının normal seviyesine döndürülmesinde akut vazokonstriktör etkiden daha güçlüdür. Anjiyotensin böbreklerden su ve tuz tutulmasına iki yolla neden olmaktadır.

1-Anjiyotensin direkt olarak böbrekler üzerinde etki göstererek su ve tuz tutulmasına yol açar.

2-Anjiyotensin böbreküstü bezlerinden aldosteron salgılanmasına neden olarak böbrek tubuluslarından su ve tuz geri emilimine neden olur.

### **2.6.2. İnsanda Esansiyel Hipertansiyon**

Hipertansiyonlu insanların % 90 ila % 95'inde bulunan hipertansiyon, "esansiyel hipertansiyon" olarak tanımlanmaktadır. Bu tanım kısaca hipertansiyonun bilinmeyen nedenlerle ortaya çıktığını belirtmektedir. Esansiyel hipertansiyonlu hastaların çoğunda güçlü bir kalıtsal yatkınlık bulunmakta ve bu özellik hipertansif hayvan türlerinde de görülmektedir. Ciddi esansiyel hipertansiyonun bazı karakteristik özellikleri şunlardır.

- 1- Ortalama arter basıncı % 40 ila % 60 kadar yükselmiştir.
  - 2- Esansiyel hipertansiyonun daha sonraki ağır safhalarında böbrek kan akımı normalin yarısına kadar düşmüştür.
  - 3- Böbreklere ulaşan kana karşı direnç 2-4 kez artmıştır.
  - 4- Böbrek kan akımındaki büyük düşüğe rağmen glomerüller filtrasyon hızı sıklıkla normale yakındır. Bunun nedeni hipertansiyondaki yüksek arter basıncının glomerüllerden böbrek tubulusları içine yeterli filtrasyonu sağlayabilmesidir.
  - 5- Kalp debisi normale yakındır.
  - 6- Total periferik direnç arter basıncında olduğu gibi % 40 ila 60 kadar artmıştır.
- Son olarak esansiyel hipertansiyonlu kişilerde bulunan en önemli bulgu,

7- Arter basıncı yüksek olmadıkça böbrekler yeteri kadar su ve tuz atamazlar. Başka bir deyişle esansiyel hipertansiyonlu kişinin ortalama arter basıncı 150mmHg ise arter basıncı yapay olarak normal değer olan 100 mmHg'ye düşürülürse (basıncı düşüklüğünden başka böbrek fonksiyonlarını değiştirmeden) tam anuri olarak basıncı eski seviyesi olan 150 mmHg'ye dönene kadar su ve tuz tutulacaktır.

Esansiyel hipertansiyonda böbreklerin normal basıncı düzeyinde yetersizliğe girerek hangi nedenle su ve tuz atamadıkları bilinmemektedir. Bununla birlikte böbreklerde saptanan damarsal değişiklikler anormalliğın damar kökenli olduğunu düşündürmektedir (160).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Perfüzyon deneyleri

Deneylerde Ankara Hıfzısıhha Enstitüsünden temin edilen 140-170 gr arası ağırlıkta, beyaz, dişi Wistar sıçanları kullanıldı. Hayvanlar kafalarına vurulmak suretiyle öldürüldü. Abdominal kısım açılarak superior mezenterik arter hızla kanüle edildi ve Krebs solüsyonundan (mM olarak: NaCl 118, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, glukoz 11, Na<sub>2</sub>EDTA 0.01) geçirildi. Daha sonra mezenterik damar yatağının ince barsakla olan tüm bağlantı kısımları dikkatli bir şekilde disekte edildi ve vasküler yatak omentum ile birlikte çıkartılıp ceketli ve sürekli 37 derecelik ısıyla sabit tutulan bir cam hazneye alındı. Vasküler yatak peristaltik bir pompa vasıtasıyla (Peristar, WPI, Berlin, Almanya) sabit bir akım hızıyla (dakikada 5-5.5 ml) cam rezervuardaki Krebs solüsyonuyla perfüze edildi. Asetilkolin ve sodyum nitroprussid gibi bazı vazodilatör ilaçlar vasküler yatağa yakın bölgedeki silikon perfüzata 10 µl hacimleriyle bolus enjeksiyon yoluyla verildi. Diğer ilaçlar ve ajanlar 37 derecelik ısıda sabit tutulan ve sürekli olarak %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> ile gazlandırılan Krebs solüsyonu içerisine eklenerek mezenterik damar yatağı perfüze edildi. Perfüzyon basıncındaki değişiklikler bir basınç transduseri (COMMAT, Ankara Türkiye) ile kaydedildi ve Biopac "acquisition" sistemine (Biopac systems, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri) aktarıldı. 1 Saatlik dinlenme periyodundan sonra mezenterik damar yatağının perfüzyon basıncı, fenilefrin (10<sup>-7</sup>-10<sup>-4</sup> M) ya da endotelin-1'in (10<sup>-10</sup>-10<sup>-7</sup> M) kümülatif dozlarıyla artırıldı. Diğer bir deney serisinde fenilefrin veya endotelin-1 ile sabit bir perfüzyon basıncı elde edildiğinde, Rho-kinaz inhibitörleri olan, Y-27632 (10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> M) ya da fasudil (10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> M) kümülatif dozlarıyla uygulandı. Bazı deneylerde düz kas ve endotelial fonksiyonunun kontrolü için asetilkolin ve sodyum nitroprussid (0.01 µg) bolus enjeksiyon yoluyla verildi. Endoteliumun uzaklaştırılması, saponin perfüzyonu (100 mg/l, 10 dakika boyunca) ile sağlandı. Daha sonra vasküler yatak saponin içermeyen normal krebs solüsyonu ile 1 saat perfüze edildi.



### 3.2. Western Blot Deneyleri

Şıçanların süperior mezenterik arterleri süratle izole edildikten sonra soğuk Krebs içeren bir petride yapışkan ve yağ dokularından temizlendi. Bunu takiben lizis solüsyonu (Tris-HCl, pH: 7.4, 50 mM, NaCl 400 mM, EGTA 2 mM, EDTA 1 mM, ditiyotreitöl 1 mM, fenilmetilsülfonyl florid 10 µM, leupeptin, 10 µg/ml, pepstatin, 1 µg/ml, benzamidin 1mM) ile homojenize edildi. Daha sonra homojenat, lizise uğramış doku parçacıkları ve çekirdekleri ayırmak amacıyla +4 °C'de ve 2000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı (süpernatant) alınarak önce Lowry metoduyla protein düzeyleri tespit edildi sonra Western blot analizi yapıldı. Bu amaçla, jel (%8'lik poliakrilamid SDS) kuyucuklarına eşit miktarda (100 µg) protein yüklendi ve elektroforeze tabi tutuldu. Daha sonra jelde sürüklenen proteinler, nitrosellüler membrana transfer edildi (bir gece boyunca). Sonra membran, yağsız süt tozu (% 5'lik a/h) ve Tween-20 içeren (% 0.05'lik a/h) Tris tamponu ile (TBS-T) 1 saat bloklandı. Bunu takiben primer antikor (ROCK-2, Poliklonal antikor, Santa Cruz Biotechnology, Kaliforniya, ABD, 1:500 dilüsyon) ve "horseradish" peroksidaz ile konjige edilmiş sekonder antikor ile muamele edildi. Blotlar, kemilüminesans yöntemiyle (Amersham Biosciences, Freiburg, Almanya) analiz edildi.

### 3.3. Kimyasal Ajanlar

(+)-(R)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-pridil) sikloheksankarboksamid dihidroklorür monohidrat (Y-27632), fasudil (HA-1077) ve endotelin-1 Tocris firmasından (Tocris Cookson Ltd, Bristol, Birleşik Krallık), L-fenilefrin hidroklorür, asetilkolin, ve anjiotensin-2 Sigma firmasından (St. Louis, Amerika Birleşik Devletleri), ROCK-II primer antikorunu ve sekonder antikor Santa Cruz Bioteknoloji'den, kemilüminasans kiti ise Amersham Bioscience şirketinden (Freiburg, Almanya) satın alındı. Organ banyosunda kullanılan tüm kimyasal ajanlar distile su veya Krebs solüsyonu içinde çözündürüldü.



### 3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Tüm sayısal değerler, ortalama±standart hata olarak ifade edildi. Perfüzyon basıncı mmHg olarak, gevşeme yanıtları ise vazokonstriktör ajanın oluşturduğu kasılmanın % azalması olarak ifade edildi. Karşılaştırma için, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve bunu takiben Bonferroni *post hoc* testi ya da Student *t* testi kullanıldı. 0.05'den küçük *P* değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm değerlendirmeler ve grafik çizimleri bilgisayar ortamında Graph-Pad Prism programı (San Diego, ABD) ile yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Fenilefrin ve Endotelin-1 (ET-1)'in perfüzyon basıncı üzerindeki etkileri

ET-1 ( $10^{-10}$ - $10^{-7}$  M) ve fenilefrin ( $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M) mezenterik damar yatağında konsantrasyona bağımlı bir şekilde vazokonstriksiyon oluşturdu.  $10^{-7}$  M konsantrasyonda fenilefrin perfüzyon basıncında herhangi bir artış göstermezken ( $1.0 \pm 0.3$  mm Hg) aynı dozda endotelin-1 ile  $152.2 \pm 19.2$  mm Hg düzeyinde perfüzyon basıncı elde edildi. Bu da endotelin-1'in vazokonstriksiyon oluşturmada daha potent bir ajan olduğunu gösterdi ( $P < 0.001$ , Şekil-2).

### 4.2. Rho-kinaz inhibitörlerinin (Y-27632 ve fasudil) perfüzyon basıncı üzerindeki etkileri

Rho-kinaz inhibitörleri konsantrasyon bağımlı tarzda vazodilatasyon oluşturdu. Y-27632 ve fasudil'in konsantrasyon/cevap eğrileri arasında potens ve efikasite bakımından bir farklılık görülmedi (Şekil-3, 4).  $10^{-7}$  M Y-27632 ile oluşturulan maksimum vazodilatasyon, %  $85.8 \pm 3.7$  iken, fasudil ile olan ise %  $86.2 \pm 3.8$  idi. Diğer taraftan Y-27632 ve fasudil, fenilefrine göre perfüzyon basınçları ET-1 ile arttırılan damar yataklarında daha az gevşeme oluşturdu (Şekil-5).

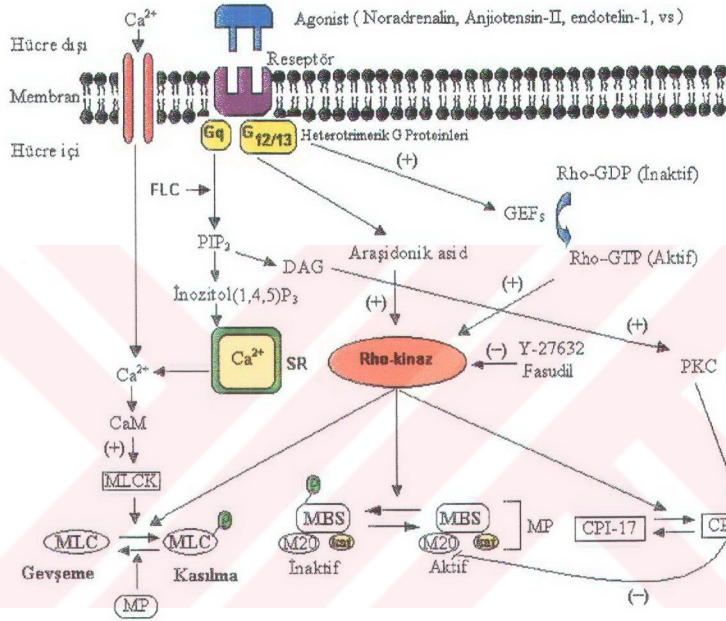
### 4.3. Saponin perfüzyonunun asetilkolin ve Y-27632 ile oluşturulan vazodilatasyon üzerine etkisi

Saponin perfüzyonu (100 mg/l, 10 dakika boyunca) mesenterik damar yatağının endotelium tabakasını uzaklaştırmıştır ve saponin perfüzyonundan geçirilmiş damar yatağında, asetilkolin gevşemeleri çok belirgin bir şekilde azalmıştır (Şekil-6). Kontrol dokuda asetilkolinin (0.01 µg) indüklediği gevşeme, %  $52.4 \pm 3.7$  iken, saponin perfüzyonundan sonra %  $3.7 \pm 2.2$  oranında gevşeme gerçekleşmiştir ( $P < 0.001$ ). Buna

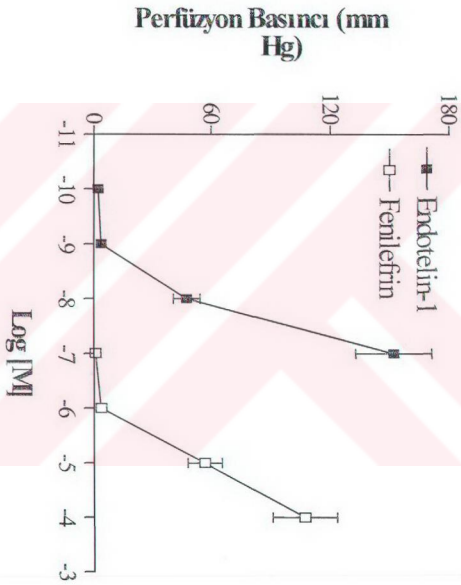
karşılık, endotelyumun uzaklaştırılması Y-27632 ile oluşturulan vazodilatasyon üzerinde anlamlı bir etki göstermedi (Şekil-7).

#### **4.4. Sıçan mezenterik arterinde Rho-kinaz ekspresyonunun Western blot analizi ile gösterilmesi**

Western blot analizi, sıçan mezenterik arter homojenatlarında yaklaşık 160 kDa molekül ağırlığında olan Rho-kinaz enzimini eksprese edilebildiğini göstermiştir (Şekil-8).

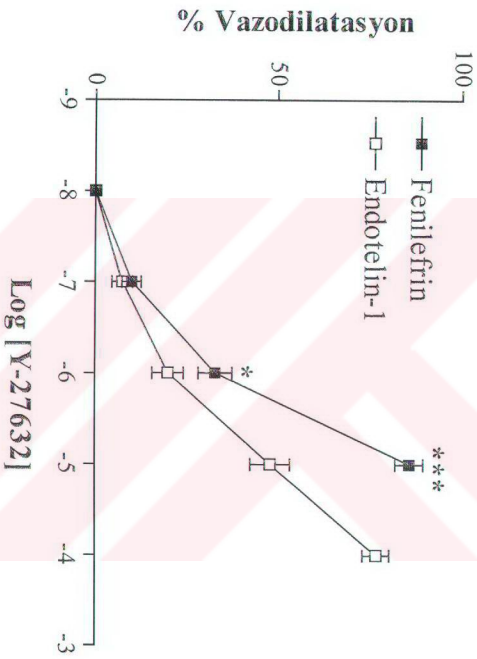


**Şekil-1:** Reseptör stimülasyonu ve Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağının aktivasyonu. Gq ve G<sub>12/13</sub>: Heterotrimerik G proteinleri, PLC: Fosfolipaz C, DAG: Diasilgliserol, PIP<sub>2</sub>: Fosfoinozitiid difosfat, CaM: kalmodulin, MLC: Myozin hafif zinciri, MBS: Myozin bağlayıcı alt ünite, MP: Myozin fosfataz, SR: Sarkoplazmik retikulum, MLCK: Myozin hafif zincir kinazı, P: Fosfor, GEFs: Guanin nükleotidi değiş-tokuşunu sağlayan faktörler, CPI-17: Myozin fosfatazı inhibe eden bir protein. (+) işareti stimülasyonu, (-) işareti ise inhibisyonu göstermektedir.

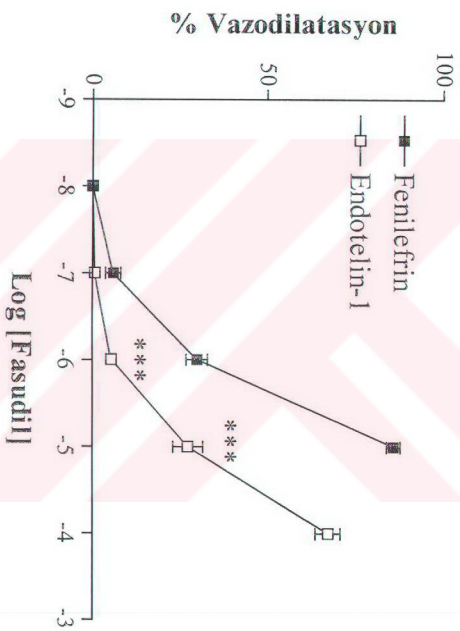


**Şekil -2:** Sıçan mezenterik damar yatağının perfüzyon basıncı üzerinde endotelin-1 ( $10^{-10}$ - $10^{-7}$  M, kümülatif dozlarıyla) ve fenilefrinin ( $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M, kümülatif dozlarıyla) oluşturduğu vazokonstriktör yanıtı. Endotelin-1, fenilefrine oranla daha düşük dozlarda vazokonstriksiyon oluştundu. Veriler, ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi. Bu grupta kullanılan preparat sayısı 6 ve 9 idi.

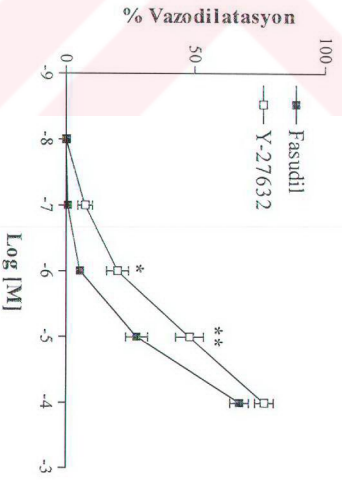
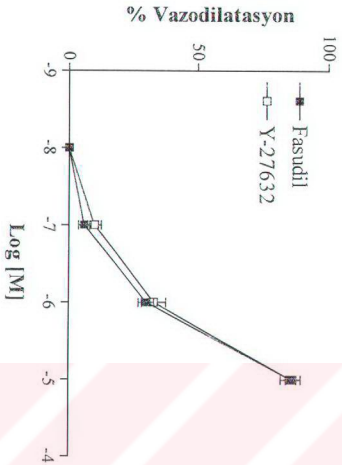




**Şekil-3:** Sıçan mezenterik damar yatağında Y-27632 ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M, kümülatif dozlarıyla) ile oluşturulan vazodilatör yanıtlar.  $\alpha$  agonist olan fenilefrin ve ET1 reseptör agonisti olan endotelin-1 ile artırılan peritibiyon basıncı üzerinde Y-27632 farklı düzeyde vazodilatasyon oluşturdu; şöyle ki, Y-27632, fenilefrinin indüklediği kasılmaya oranla endotelin-1 ile oluşturulan kasılma üzerinde daha az gevşeme meydana getirdi. Veriler, ortalaması±standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve bunu takiben Bonferroni *post hoc* testi kullanılmıştır. \*:  $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.0001$ . Bu grupta kullanılan preparat sayısı 6 idi.



**Şekil-4:** Sıçan mezenterik damar yatağında Fasudil ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M, kümülatif olarak) ile oluşturulan vazodilatasyon.  $\alpha$  agonist olan fenilefrin ile E1 reseptör agonisti olan endotelein-1 ile artırılan perfüzyon basıncı üzerinde fasudil farklı düzeyde vazodilatasyon oluşturdu. Bu Rho-kinaz inhibitörü, fenilefrinin indüklediği kasılmaya oranla endotelein-1 ile oluşturulan kasılma üzerinde daha az gevşeme meydana getirdi. İstatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve bunu takiben Bonferroni *post hoc* testi kullanılmıştır. \*\*\*:  $P < 0.0001$ . Veriler, ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi. Bu grupta kullanılan preparat sayısı 4 idi.

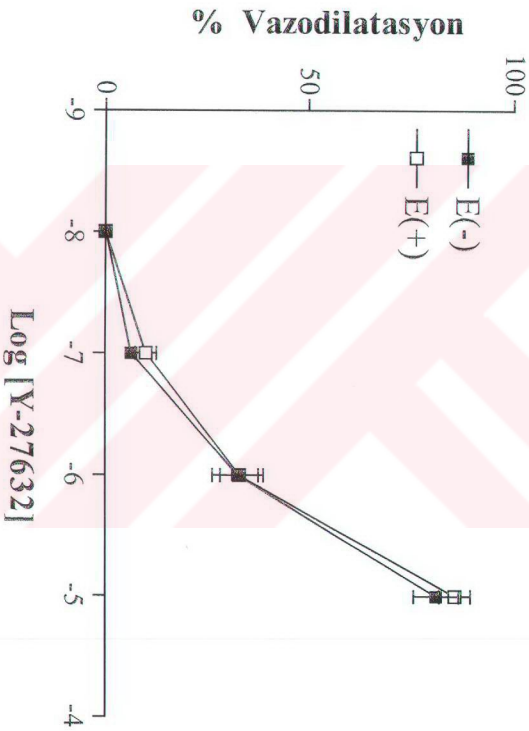


**Şekil-5:** İzole sıran mezenterik damar yatağında fenilefrinle (soldaki panel) ve endotelelin-1 (sağdaki panel) ile artırılmış perfüzyon basıncı üzerinde Rho-kinaz inhibitörleri Fasudil ve Y-27632'nin oluşturduğu vazodilatasyonun karşılaştırılması. Fenilefrinle artırılmış perfüzyon basıncı üzerinde değil ancak, endotelelin-1 ile artırılmış perfüzyon basıncı üzerinde daha selektif bir Rho-kinaz inhibitörü olduğu bilinen Y-27632 daha fazla vazodilatasyon gerektirdi. Veriler, ortalaması±standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve bunun takiben Bonferroni *post hoc* testi kullanılmıştır. Bu grupta kullanılan preparat sayısı 4-7 idi. \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ .



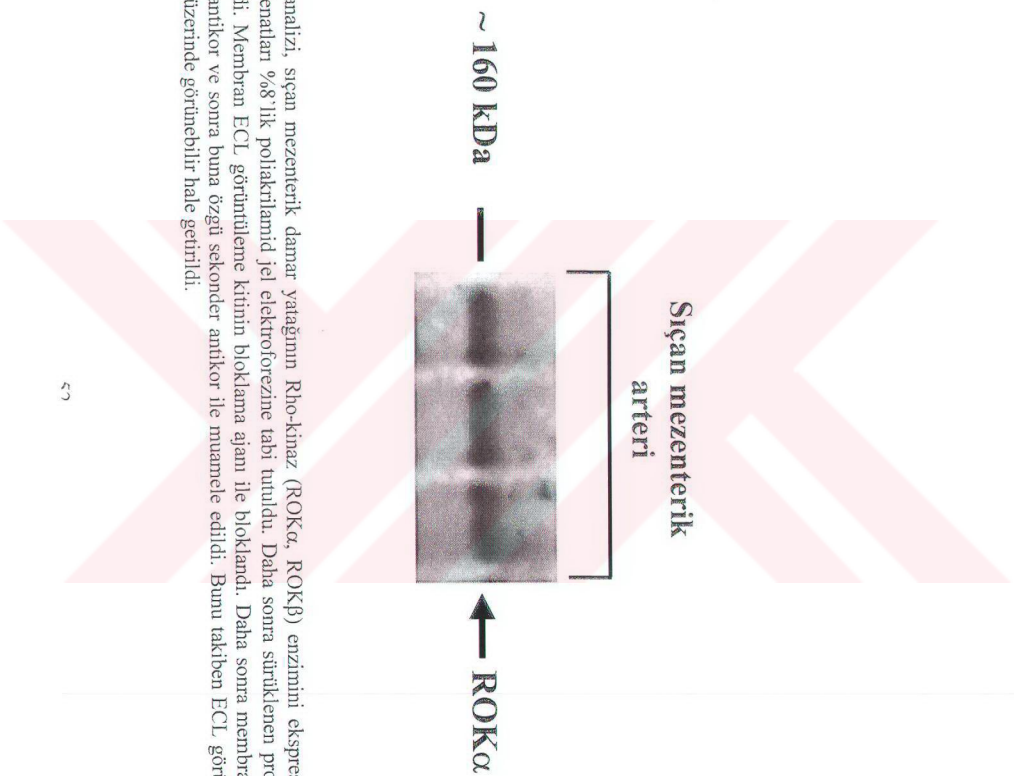
**Şekil-6:** Endoteliumun uzaklaşımının Asetilkolin ile indiklenen vazodilatasyon üzerine etkisi. İzole sıçan mezenterik damar yatağında endoteliumu uzaklaşım için damar yatağı, 100 mg/l Konsantrasyonunda saponin içeren Krebs solüsyonu ile 10 dakika boyunca perfüze edildi. Fonksiyonel endoteliumun varlığı asetilkolinin 0.01 µg bolus enjeksiyonu ile test edildi. Saponin perfüzyonu sonucu asetilkolin ile gerçekleştirilen vazodilatasyon anlamlı bir şekilde azaldı. Veriler, ortalaması±standart hata olarak ifade edildi. İstatiksel

analiz olarak student t testi kullanıldı. Bu grupta kullanılan preparat sayısı 4 idi. \*\*\*:  $P < 0.001$ . E(-): endotelyum yokken, E(+): endotelyum varken.



**Şekil-7:** Fonksiyonel endotelyum varlığında ve saponin perfüzyonu sonucu (100 mg/l, 10 dakika boyunca) sıcan mezenterik damar yatağında endotelyumun uzaklaşımından sonra Y-27632'nin oluşturduğu vazodilatasyon. Endotelyum varlığında ya da yokluğunda Y-27632 ile oluşan gevşeme cevapları arasında anlamlı bir fark oluşmadı. Veriler, ortalaması±standart hata olarak ifade edildi. İstatiksel analiz için tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Bu grupta kullanılan preparat sayısı 4 idi. E(-): endotelyum yokken, E(+): endotelyum varken.





**Şekil-8:** Western blot analizi, sıçan mezenterik damar yatağının Rho-kinaz (ROK $\alpha$ , ROK $\beta$ ) enzimini eksprese edebildiğini gösterdi. Mezenterik arter homojenatları %8'lik poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Daha sonra sızdıran proteinler, nitrosellüloz bir membrane transfer edildi. Membran ECL görüntüleme kitinin bioklama şıkanı ile bloklandı. Daha sonra membran, önce ROK $\alpha$ 'ya karşı geliştirilmiş primer bir antikor ve sonra buna özgü sekonder antikor ile muamele edildi. Bunu takiben ECL görüntüleme kiti yardımıyla protein bantları bir film üzerinde görünebilir hale getirildi.

**Tablo-1:** Rho/Rho-kinaz yolunun patolojik olaylardaki rolleri

Hastalık	Bulgular
Hipertansiyon	Spontan hipertansif sıçanların vasküler düz kas hücrelerinde agonistle indüklenen $Ca^{2+}$ duyarlaşması artmıştır. Rho-kinaz spontan hipertansif sıçanlarda, hipertansiyon oluşumundan hemen önce "upregüle" olmuştur. Y-27632 bazı hipertansif sıçan modellerinde hipertansiyonu düzeltir. İnsanlarda fasudil ön kol kan akımını artırır ve vasküler direnci düşürür. Bütün bunları hipertansif hastalarda, normotansiflerden daha fazla yapar.
Serebral vazospazm	Y-27632, köpeklerde yapılan deneysel subaroknoid hemorajide arteriyel hiperkontraksiyonu artmış Rho-kinaz aktivitesini ve MHZ fosforilasyonunu önlemiştir. Sıçanlarda deneysel subaroknoid hemoraji RhoA ve Rho-kinazların "upregülasyonuna" neden olur. Fasudil insanlarda subaroknoid hemoraji sonrası vazospazmı azaltır (anjiyografik sonuçlara göre).
Koroner Vazospazm	Fasudil ve Y-27632, interlökin-1 $\beta$ ile ötedavisi yapılmış domuz koroner arterlerinde agonistle indüklenen hiperkontraksiyonu ve MHZ fosforilasyonunu önler. Fasudil interlökin-1 $\beta$ ön tedavisi ile aterosklerotik lezyonları azaltır. Fasudil, köpek efor anjinasında miyokardiyal iskemiyi önler. Fasudil, insanlarda asetilkolin ile indüklenen koroner spazmı inhibe etmiştir.
Bronşiyal astım	C3 eksoenzimi havayolu duyarlılığı olan hayvanlarda asetilkolinle indüklenen $Ca^{2+}$ duyarlılığını ve Rho aktivasyonunu önler. Y-27632 inhalasyonda kobaylarda asetilkolin ya da ovalbuminle indüklenen akciğer direnci artışını inhibe eder.
Preterm labor	Hamilelik boyunca Rhokinaz ekspresyonu artmıştır. Y-27632 hamile sıçan uterusundaki oksitosin ile indüklenen uterin kasılmalarını inhibe eder. Hamile insan uterusunda Y-27632 oksitosin ile indüklenen kasılmaları ve spontan durumu inhibe eder.
Eretil Disfonksiyon	Y-27632 intrakavernozal basıncı ve penis ereksiyonunu artırır.
Glokom	Kültürü yapılmış insan trabeküler ağ ve schlemm kanalı Y-27632'ye yanıt olarak hücre monolayer permeabilitesinde artış göstermiştir. Tavşan gözüne Y-27632 uygulaması intraoküler basıncı azaltmakta ve göz içi sıvısının tahliyesini artırmaktadır.
Vasküler Düz kas hücre proliferasyonu	Rho-kinazın dominant negatifleri ve fasudilin, interlökin1- $\beta$ ile ön tedavisi yapılan domuz koroner arterinde aterosklerozis benzeri lezyonları önlemiştir.
Myokardiyal hipertrofi	C3 eksoenzimi ,dominant negatif Rho-kinaz veY-27632 kültürü yapılmış neonatal sıçan kardiyomyositlerinin agonistle indüklenen hipertrofiyi inhibe eder.
Malignoma	Dominant negatif Rho-kinaz mutantları ve Y-27632 bazı modellerde tümör büyümesini ve metastazı azaltır.
Endotelial disfonksiyon	C3 eksoenzimi sığır endotelial hücrelerinde preproendotelin ekspresyonunu azaltır. C3 eksoenzimi ve Y-27632 insan umbilikal endotel hücrelerinde trombin ile indüklenen eNOS "downregülasyonunu" önler

Wettshureck ve Offermanns (2001)'dan alınmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada izole sıçan mezenterik damar yatağında iki farklı agonist olan fenilefrin ve endotelin-1 ile arttırılan perfüzyon basıncı üzerinde Rho-kinaz inhibitörleri olan Y-27632 ve fasudilin etkilerini araştırdık. Daha sonra andotelyumun uzaklaştırılmasının Y-27632 ile indüklenen vazodilatasyonu nasıl etkilediği araştırıldı. Bunlara ek olarak mesenterik arterdeki Rho-kinaz ekspresyonunu Western blot tekniği ile belirledik.

Rho/Rho-kinaz yolağındaki aktivasyonun artmış vaküler direncin olası nedenlerinden birisi olabileceği bildirilmektedir (100). Dolayısıyla bu yolağın Y-27632 gibi selektif Rho-kinaz inhibitörleri ile manüplasyonu, kan basıncının düzenlenmesine yardımcı olabilir. Bu çalışmada gerek fasudil ve gerekse Y-27632, mezenterik damar yatağında endotelyumdan bağımsız olarak vazodilatasyon oluşturdu. İki inhibitör arasında potens ve efikasi bakımından fark yoktur. Y-27632'nin Rho-kinazı fasudile göre daha spesifik inhibe ettiği daha önceden gösterilmiştir. (164). Ancak fenilefrinle arttırılmış perfüzyon basıncı üzerinde her iki Rho-kinaz inhibitörü de aynı konsantrasyonda oluşturdukları vazodilatasyon arasında bir fark görülmedi. Diğer taraftan endotelin-1 ile arttırılan perfüzyon basıncı üzerinde aynı konsantrasyonlarda Y-27632 fasudil'e göre daha fazla vazodilatasyon gerçekleştirdi. Fenilefrine oranla perfüzyon basıncı endotelin-1 ile arttırılan damar yataklarında, iki inhibitör de daha az vazodilatasyon oluşturdu. Bu da,  $\alpha$  adrenerjik reseptörlerin ve endotelin-1 reseptörlerinin Rho/Rho-kinaz yolağıyla farklı düzeyde kenetlenmiş olabileceğini gösterir. Endotelin-1, Rho-kinazın aşırı derecede aktivasyonuna neden olabilir ve böylece Y-27632, daha az gevşeme yanıtı meydana getirebilir. Oysa, olaya diğer taraftan bakıldığında, endotelin-1 ile arttırılan perfüzyon basıncının oluşmasında Rho/Rho-kinaz yolağının katkısı belki daha az ve bundan dolayı Rho-kinaz inhibitörleri endotelin-1 ile perfüzyon basıncı arttırılmış damar yataklarında daha az gevşeme yanıtı göstermiş olabilir. Yine de, bu iki reseptörün Rho/Rho-kinaz yolağı ile kenetlenme verimliliğini ortaya koymak için, bu ajanların varlığında Rho-kinaz enzim ekspresyon ve aktivasyon derecesinin araştırıldığı deneylere ihtiyaç vardır.

Endotelin reseptörlerinin başlıca 2 tipinin olduğu bilinmektedir. Bunlar, ET<sub>A</sub> ve ET<sub>B</sub> reseptörleridir, ve her iki reseptör de G proteinleri ile kenetlidir (165). İlginç olarak, düz kas membranında bulunan eksitatör endotelin reseptörlerinin (esasen ET<sub>A</sub> ve ET<sub>B2</sub>) fosfolipaz C ve kalsiyum girişi gibi reseptör-sonrası olaylara ek olarak, ayrıca Rho-sinyalizasyonu ile de ilişkili olduğu tespit edilmiştir (166, 167). Diğer taraftan vasküler düz kasın endotelin-1'i ve endotelin-1-reseptör kompleksini kendi içine alabildiği ve böylece saatler boyu süren ET-1 kasılmasının bu olaya bağlı olduğu bildirilmiştir (168). Bu durum, belki de Rho-kinaz inhibitörlerinin neden ET-1 kasılmalarını daha az inhibe ettiğini açıklayabilir.

Rho/Rho-kinaz sinyalizasyonun vasküler düz kas kasılmasındaki fizyolojik kontrolü araştırılmıştır ve bu yolağın pulmoner vazokonstriksiyonda (169), sıçanlarda mineralokortikoid ile indüklenen hipertansiyon sonucu artmış vasküler reaktiviteye (18), serebral vazospazma (11) neden olduğu gösterilmiştir. Dahası nitrik oksid (NO) sentaz inhibisyonu ile kronik hipertansif yapılmış sıçanların arterlerinde  $\alpha_2$  agoniste olan kontraktıl aktivite RhoA aktivasyonu üzerinden artmıştır. (170). Endoteliumun uzaklaştırılması Y-27632 ile oluşturulan gevşeme yanıtlarını değiştirmede ve bu da vazodilatasyonun endotelium varlığına bağlı olmadığını göstermektedir. Bununla uyumlu olarak, sıçan kuyruk veninde Y-27632'nin indüklediği vazodilatasyonun da, endoteliumun uzaklaştırılmasına rağmen değişmediği tespit edilmiştir (171). Ancak diğer taraftan, sıçan aortasında endoteliumun uzaklaştırılmasıyla Y-27632 ile indüklenen gevşeme yanıtı zayıflamıştır (172). Bu çalışmada endoteliumun varlığında ve yokluğunda Y-27632'ye karşı oluşan değişmemiş vazodilatasyon, kullanılan damarın özelliğinden kaynaklanabilir. Sıçan aortasında Y-27632, endotelden önemli bir parakrin mediyatör olan nitrik oksid (NO) salıverirken, mezenterik damar yatağında NO'nin vasküler reaktiviteye katkısı, endotel-kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) yanında daha azdır (173). Dolayısıyla, Y-27632 belki de endoteliumdan kendi gevşemesini güçlendirecek kadar NO salıverememekte ve bundan dolayı endoteliumun uzaklaştırılması onun gevşetici etkisini pek fazla değiştirmemektedir.

Çalışmamızdan elde edilen bir diğer bulgu da, sıçan mezenterik arterinde Rho-kinaz (ROK $\alpha$ , ROCK-II) ekspresyonunun Western blot tekniği ile ilk defa gösterilmesidir.

Sonuç olarak, Rho-kinaz proteini mezenterik arterde eksprese edilebilmektedir ve bu damarın agonistle indüklenen kasılmasına aracılık edebilir. Dahası Rho-kinaz inhibitörlerinin vazodilatör etkisi intakt endotelyuma bağlı değildir. Ayrıca, endotelin-1 ve  $\alpha$ -adrenerjik reseptörleri Rho-kinaz sinyalizasyonu ile farklı düzeylerde ilişkili olabilir. Diğer taraftan bu çalışmadan elde edilen bulgular, Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolunun vasküler tonusun düzenlenmesine karıştığı ve inhibitörlerinin hipertansiyon, vazospazm, ateroskleroz gibi bazı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde terapötik potansiyelleri olabileceğine ilişkin daha önceki çalışmalara (174) destek vermektedir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, kalsiyum duyarlaştırıcı bir protein olan Rho-kinazın mezenterik arterde eksprese edildiğini ilk kez biz gösterdik. Bu enzim olasılıkla mezenterik arter yatağının perfüzyon basıncının kontrolüne katkı sağlamaktadır. Rho-kinaz inhibitörleri potansiyel antihipertansif ajanlar gibi görünmektedir. Ancak inhibe ettiği enzimin hemen hemen tüm kontraktilite özelliği gösteren yapılarda eksprese ediliyor olması ve bu yapıların kasılma mekanizmalarında muhtemelen rol alıyor olması, bu inhibitörlerin kullanımını kısıtlayabilir. Ancak Rho-kinaz enziminin dokular arası ekspresyonunun ve kasılma yanıtlarındaki katkısının az ya da çok olması bu inhibitörlerin nisbi selektivite gösterme şansını ve dolayısıyla terapötik ajanlar olarak kullanılma ihtimalini güçlendirebilir. Bütün bunların tam olarak ortaya konulması için daha fazla ve ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR

1. 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.
2. Somlyo A P, Somlyo A V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, **1994**; 372: 231-236.
3. Fukata Y, Amano M and Kaubuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*, **2001**; 22: 32-39.
4. 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.
5. Braga V M M, Machesky, L M, Hall A, Hotchin N A. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J. Cell Biol*, **1997**; 137:1421-1431.
6. Charzanowska-Wodnicka M, Burridge K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol*, **1996**; 133: 1403-1415.
7. Gebbink M F B G, Kranenburg O, Poland M, Van Horck F P G, Houssa B, Moolenaar W H. Identification of a novel, putative Rho-specificGDP-GTP exchange factor and a Rho binding protein: control of neuronal morphology. *J. Cell Biol*, **1997**; 137: 1603-1613.
8. Gong M C, Fujihara H, Somlyo A V, Somlyo A P. Translocation of RhoA associated with  $Ca^{++}$  sensitization of smooth muscle. *J. Biol. Chem*, **1997**; 272: 10704-10709.
9. Loirand G, Cario-Toumaniantz C, Chardin P, Pacaud P. The Rho-related protein Rnd1 inhibits  $Ca^{++}$  sensitization of rat smooth muscle. *J. Physiol*, **1999**; 516: 825-834.
10. Cario-Toumaniantz C, Evellin S, Maury S, Baron O, Pacaud P, Loirand G. Role of Rho kinase signalling in healthy and varicose human saphenous veins. *Br. J. Pharmacol*, **2002**; 137: 205-212.
11. Shirao S, Kashiwagi S., Sato M, Miwa S, Nakao F, Kurikawa T, Todoraki-Ikeda N, Mogami K. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase mediated  $Ca^{++}$  sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circ Res*, **2002**; 91: 112-119.
12. Nakamura K, Nishimura J, Hirano K, Fujishima M, Kanaide H. Hydroxyfasudil, an active metabolite of fasudil hydrochloride, relaxes the rabbit basilar artery by disinhibition of myosin light chain phosphatase. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, **2001**; 21: 876-885.
13. Batchelor T J, Sadaba J R, Ishola A, Pacaud P, Munsch C M, Beech D J. Rho-kinase inhibitors prevent agonist-induced vasospasm in human internal mammary artery. *Br. J. Pharmacol*, **2001**; 132: 302-308.
14. Chitaley K, Wingard C J, Clinton Webb R, Branam H, Stopper V S, Lewis R W, Mills T M. Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide independent pathway. *Nat Med*, **2001**; 7: 119-122.
15. Büyükaşar K, Ün İ. Effects of the Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil on the corpus cavernosum from diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol*, **2003**; 472: 235-238.

16. **Büyükaşar K, Levent A.** Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and neurotransmitter release in the mouse gastric fundus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**; *303*: 777-781.
17. **Büyükaşar K, Levent A, Ark M.** Expression of Rho-kinase and its functional role in the contractile activity of mouse vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* **2003**; *140*: 743-749.
18. **Weber D S, Webb R C.** Enhanced relaxation to the rho-kinase inhibitor Y-27632 in mesenteric arteries from mineralocorticoid hypertensive rats. *Pharmacology.* **2001**; *63*: 129-133.
19. **Asano M, Nomura Y.** Comparison of inhibitory effects of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, in strips of small and large mesenteric arteries from spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Hypertens Res.* **2003**; *26*: 97-106.
20. **D'Orleans-Juste P, Berthiaume N, Plante GE, Bkaily G, Claing A.** Comparison of the pre- and post-capillary vascular reactivity in the rat and guinea pig perfused mesenteric bed. *Can J Physiol Pharmacol.* **1996**; *74*: 811-817.
21. **Somlyo A P, Himpens B.** Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J.* **1989**; *3*: 2266-2276.
22. **Kamm K E, Stull J T.** The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1985**; *25*: 593-603.
23. **Somlyo A P, Somlyo A V.** From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta Physiol. Scand.* **1998**; *164*: 437-448.
24. **Kitazawa T, Masuo M, Somlyo A P.** G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**; *88*: 9307-9310.
25. **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.
26. **Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, Kunihiro I, Kawano Y, Fukata Y, Higo T, Egashira K, Takahashi S, Kaibuchi K, Takeshita A.** Inhibition of myosin phosphatase by up-regulated Rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1beta. *Circulation.* **2000**; *101*: 1319-1323.
27. **Nobes C, Hall A.** Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr. Opin. Genet Dev.* **1994**; *4*: 77-81.
28. **Seasholtz T M, Majumdar M, Brown J H.** Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling. *Mol. Pharmacol.* **1999**; *55*: 949-956.
29. **Hart M J, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer W D, Gilman A G, Sternweis P C, Bollag G.** Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science.* **1998**; *280*: 2112-2214.
30. **Kozasa T, Jiang X, Hart M J, Sternweis P M, Singer W D, Gilman A G, Bollag G, Sternweis P C.** p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science.* **1998**; *280*: 2109-2111.
31. **Van Aelst L, D'Souza-Schorey C.** Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **1997**; *11*: 2295-2322.

32. **Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M.** Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999; 68: 459-486.
33. **Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S.** ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.*, 1996; 392: 189-193.
34. **Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K.** Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.*, 1996; 15: 2208-2216.
35. **Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K.** Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science*, 1997; 275: 1308-1311.
36. **Amano M, Chihara K, Nakamura N, Fukata Y, Yano T, Shibata M, Ikebe M, Kaibuchi K.** Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-kinase. *Genes Cells*, 1998; 3: 177-188.
37. **Amano M, Chihara K, Nakamura N, Kaneko T, Matsuura Y, Kaibuchi K.** The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates Rho-kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 32418-32424.
38. **Hirose M, Ishizaki T, Watanabe N, Uehata M, Kranenburg O, Moolenaar WH, Matsumura F, Maekawa M, Bito H, Narumiya S.** Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J. Cell Biol.*, 1998; 141: 1625-1636.
39. **Madaule P, Axel R** A novel ras-related gene family. *Cell*, 1985; 41: 31-40.
40. **Ridley A J.** Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 471-477.
41. **Bishop A L, Hall A** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, 2000; 348: 241-255.
42. **Leung T, Manser E, Tan L, Lim L** A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem*, 1995; 270: 29051-29054.
43. **Feng J, Ito M, Kureishi Y, Ichikawa K, Amano M, Isaka N, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K, Hartshorne D J, Nakano T** Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J Biol Chem*, 1999; 274: 3744-3752.
44. **Seto M, Sasaki Y, Hidaka H, Sasaki Y.** Effects of HA1077, a protein kinase inhibitor, on myosin phosphorylation and tension in smooth muscle. *Eur J Pharmacol*, 1991; 195: 267-272.
45. **Ono-Saito N, Niki I, Hidaka H.** H-series protein kinase inhibitors and potential clinical applications. *Pharmacol Ther*, 1999; 82: 123-131.
46. **Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K** Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 1996; 273: 245-248.
47. **MacDonald J A, Borman M A, Muranyi A, Somlyo A V, Hartshorne D J, Haystead T A.** Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98: 2419-2424.



48. Eto M, Ohmori T, Suzuki M, Furuya K, Morita F. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem (Tokyo)*, 1995; 118: 1104-1107.
49. Senba S, Eto M, Yazawa M. Identification of trimeric myosin phosphatase (PP1 M) as a target for a novel PKC-potentiated protein phosphatase-1 inhibitory protein (CPI17) in porcine aorta smooth muscle. *J Biochem (Tokyo)*, 1999; 125: 354-362.
50. Hamaguchi T, Ito M, Feng J, Seko T, Koyama M, Machida H, Takase K, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne D J, Nakano T. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by protein kinase N. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 274: 825-830.
51. Somlyo A P, Somlyo A V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol (Lond)*, 2000; 522: 177-185.
52. Koyama M, Ito M, Feng J, Seko T, Shiraki K, Takase K, Hartshorne D J, Nakano T. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett*, 2000; 475: 197-200.
53. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*, 1996; 271: 20246-2129.
54. Mackawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, 1999; 285: 895-898.
55. Carlier M F, Ressad F, Pantaloni D. Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. *J Biol Chem*, 1999; 274: 33827-33830.
56. Olofsson B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal*, 1999; 11: 545-554.
57. Zheng Y. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci*, 2001; 26: 724-732.
58. Sah V P, Seasholtz T M, Sagi S A, Brown J H. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000; 40: 459-489.
59. Buhl A M, Johnson N L, Dhanasekaran N, Johnson G L. Galpha12 and Galpha13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J Biol Chem*, 1995; 270: 24631-24634.
60. Fromm C, Coso O A, Montaner S, Xu N, Gutkind J S. The small GTP-binding protein Rho links G protein-coupled receptors and Galpha12 to the serum response element and to cellular transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94: 10098-11103.
61. Girkontaite I, Missy K, Sakk V, Harenberg A, Tedford K, Potzel T, Pfeffer K, Fischer K D. Lsc is required for marginal zone B cells, regulation of lymphocyte motility and immune responses. *Nat Immunol*, 2001; 2: 855-862.
62. Fukuhara S, Murga C, Zohar M, Igishi T, Gutkind J S. A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem*, 1999; 274: 5868-5879.
63. Kourlas P J, Strout M P, Becknell B, Veronese M L, Croce C M, Theil K S, Krahe R, Ruutu T, Knuutila S, Bloomfield C D, Caligiuri M A. Identification of a gene at 11q23 encoding a



guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci*, **2000**; 97: 2145-2150.

64. Fukuhara S, Chikumi H, Gutkind J S. RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene*, **2001**; 20: 1661-1668.

65. Katoh H, Aoki J, Yamaguchi Y, Kitano Y, Ichikawa A, Negishi M. Constitutively active Galpha12, Galpha13, and Galpha3 induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways. *J Biol Chem*, **1998**; 273: 28700-28707.

66. Mao J, Yuan H, Xie W, Simon MI, Wu D. Specific involvement of G proteins in regulation of serum response factor-mediated gene transcription by different receptors. *J Biol Chem*, **1998**; 273: 27118-27123.

67. Conti M A, Adelstein R S. The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5'-cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **1981**; 256: 3178-3181.

68. Miller J R, Silver P J, Stull J T. The role of myosin light chain kinase phosphorylation in beta-adrenergic relaxation of tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol*, **1983**; 24: 235-242.

69. Stull J T, Hsu L C, Tansey M G, Kamm K E. Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. *J Biol Chem*, **1990**; 265: 16683-16690.

70. Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, **2000**; 113: 1671-1676.

71. Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann S M, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, **2000**; 275: 1722-1729.

72. Sawada N, Itoh H, Yamashita J, Doi K, Inoue M, Masatsugu K, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Sone M, Yamahara K, Yurugi T, Nakao K. cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochem Biophys Res Commun*, **2001**; 280: 798-805.

73. Hartshorne D J, Ito M, Erdodi F. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil*, **1998**; 19: 325-341.

74. Gong M C, Iizuka K, Nixon G, Browne J P, Hall A, Eccleston J F, Sugai M, Kobayashi S, Somlyo A V, Somlyo A P. Role of guanine nucleotide-binding proteins ras-family or trimeric proteins or both in Ca<sup>2+</sup> sensitization of smooth muscle. *Proc Nat Acad Sci USA*, **1996**; 93: 1340-1345.

75. Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S, Kaibuchi K, Matsuura Y, Seki H, Saida K, Takai Y. Involvement of Rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem*, **1992**; 267: 8719-8722.

76. Noda M, Yasuda-Fukazawa C, Moriishi K, Kato T, Okuda T, Kurokawa K, Takuwa Y. Involvement of rho in GTP $\gamma$ S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett*, **1995**; 367: 246-250.

77. Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, **1997**; 272: 12257-12260.

78. Iizuka K, Yoshii A, Samizo K, Tsukagoshi H, Ishizuka T, Dobashi K, Nakazawa T, Mori M. A major role for the Rho-associated coiled coil forming protein kinase in G-protein-mediated Ca<sup>2+</sup>

- sensitization through inhibition of myosin phosphatase in rabbit trachea. *Br J Pharmacol*, **1999**; 128: 925-933.
79. Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase during cell migration and cytokinesis. *J Cell Biol*, **1999**; 147: 1023-1037.
80. Feng J, Ito M, Kureishi Y, Ichikawa K, Amano M, Isaka N, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K, Hartshorne D J, Nakano T. Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J Biol Chem*, **1999**; 274: 3744-3752.
81. Araki S, Ito M, Kureishi Y, Feng J, Machida H, Isaka N, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne D J, Nakano T. Arachidonic acid-induced  $Ca^{2+}$  sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase. *Pflugers Arch*, **2001**; 441: 596-603.
82. Fu X, Gong M C, Jia T, Somlyo A V, Somlyo A P. The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid,  $GTP\gamma S$ , and phorbol ester induced  $Ca^{2+}$  sensitization of smooth muscle. *FEBS Lett*, **1998**; 440: 183-187.
83. Kitazawa T, Eto M, Woodsome T P, Brautigan D L Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem*, **2000**; 275: 989-990.
84. Fukata Y, Oshiro N, Kaibuchi K. Activation of moesin and adducin by Rho-kinase downstream of Rho. *Biophys Chem*, **1999**; 82: 139-147.
85. Kaneko T, Amano M, Maeda A, Goto H, Takahashi K, Ito M, Kaibuchi K. Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **2000**; 273: 110-116.
86. Gohla A, Schultz G, Offermanns S Role for G (12)/G (13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res*, **2000**; 87: 221-227.
87. Fujihara H, Walker L A, Gong M C, Lemichez E, Boquet P, Somlyo A V, Somlyo A P Inhibition of rhoA translocation and calcium sensitization by in vivo ADP-ribosylation with the chimeric toxin DC3B. *Mol Biol Cell*, **1997**; 8: 2437-2447.
88. Gong M C, Fujihara H, Somlyo A V, Somlyo A P. Translocation of RhoA associated with  $Ca^{2+}$  sensitization of smooth muscle. *J Biol Chem*, **1997**; 272: 10704-10709.
89. Chihara K, Amano M, Nakamura N, Yano T, Shibata M, Tokui T, Ichikawa H, Ikebe R, Ikebe M, Kaibuchi K. Cytoskeletal rearrangements and transcriptional activation of c-fos serum response element by Rho-kinase. *J Biol Chem*, **1997**; 272: 25121-25127.
90. Suzuki Y, Yamamoto M, Wada H, Ito M, Nakano T, Sasaki Y, Narumiya S, Shiku H, Nishikawa M. Agonist-induced regulation of myosin phosphatase activity in human platelets through activation of Rho-kinase. *Blood*, **1999**; 93: 3408-3417.
91. Essler M, Amano M, Kruse H J, Kaibuchi K, Weber P C, Aepfelbacher M. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho-kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem*, **1998**; 272: 21867-21874.
92. Arimura N, Inagaki N, Chihara K, Menager C, Nakamura N, Amano M, Iwamatsu A, Goshima Y, Kaibuchi K. Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem*, **2000**; 275: 23973-23980.
93. Tominaga T, Ishizaki T, Narumiya S, Barber D L. p160ROCK mediates RhoA activation of  $Na^+-H^+$  exchange. *EMBO J*, **1998**; 17: 4712-4722.

94. Shimokawa H. Cellular and molecular mechanisms of coronary artery spasm: lessons from animal models. *Jpn. Circ*, 2000; J. 64: 1-12.
95. Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, Amano M, Kozai T, Yamawaki T, Kuwata K, Kandabashi T, Egashira K, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Takeshita A. Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res*, 1999; 43: 1029-1039.
96. Sato M, Tani E, Fujikawa H, Kaibuchi K Involvement of Rho-kinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circ Res*, 2000; 87: 195-200.
97. Negoro N, Hoshiga M, Seto M, Kohbayashi E, Ii M, Fukui R, Shibata N, Nakakoji T, Nishiguchi F, Sasaki Y, Ishihara T, Ohsawa N. The kinase inhibitor fasudil (HA-1077) reduces intimal hyperplasia through inhibiting migration and enhancing cell loss of vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys Res Commun*, 1999; 262: 211-215.
98. Miyata K, Shimokawa H, Kandabashi T, Higo T, Morishige K, Eto Y, Egashira K, Kaibuchi K, Takeshita A. Rho-kinase is involved in the macrophage-mediated formation of coronary arteriosclerotic lesions in pigs in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20: 2351-2358.
99. Sawada N, Itoh H, Ueyama K, Yamashita J, Doi K, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Saito T, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Arai H, Ohno N, Komeda M, Nakao K inhibition of Rho-associated kinase results in suppression of neointimal formation of balloon-injured arteries. *Circulation*, 2000; 101: 2030-2023.
100. Wetschureck N, Offermanns S Rho/Rho-kinase mediated signalling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med*, 2002; 80: 629-638.
101. Suzuki A, Itoh T Effects of calyculin A on tension and myosin phosphorylation in skinned smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, 1993; 109: 703-712.
102. Weber L P, Van Lierop J E, Walsh M P. Ca<sup>2+</sup>-independent phosphorylation of myosin in rat caudal artery and chicken gizzard myofilaments. *J Physiol (Lond)*, 1999; 516: 805-824.
103. Deng J T, Van Lierop J E, Sutherland C, Walsh M P. Ca<sup>2+</sup>-independent smooth muscle contraction. A novel function for integrin-linked kinase. *J Biol Chem*, 2001; 276: 16365-16373.
104. Bradley A B, Morgan K G. Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity during porcine coronary artery contractions as detected by aequorin. *J Physiol (Lond)*, 1987; 385: 437-448.
105. Himpens B, Kitazawa T, A P Somlyo. Agonist-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflugers Arch*, 1990; 417: 21-28.
106. Rembold C M. Modulation of the [Ca<sup>2+</sup>] sensitivity of myosin phosphorylation in intact swine arterial smooth muscle. *J Physiol (Lond)*, 1990; 429: 77-94.
107. Otto B, Steusloff A, Just I, Aktories K, Pfitzer G. Role of Rho proteins in carbachol-induced contractions in intact and permeabilized guinea-pig intestinal smooth muscle. *J Physiol (Lond)*, 1996; 496: 317-329.
108. Satoh S, Kreutz R, Wilm C, Ganten D, Pfitzer G. Augmented agonist-induced Ca (2+)-sensitization of coronary artery contraction in genetically hypertensive rats. Evidence for altered signal transduction in the coronary smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1994; 94: 1397-1403.



109. Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S, Takeshita A. Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension*, 2001; 38: 1307-1310.
110. Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, Saito I, Sasaki T, Takakura K, Okamoto S, Kikuchi H, Takemae T, Hidaka H. Dose escalation trial of a novel calcium antagonist, AT877, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*, 1990; 107: 11-15.
111. Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, Saito I, Sasaki T, Takakura K, Nagata I, Kikuchi H, Takemae T, Hidaka H. Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Results of a prospective placebo-controlled double blind trial. *J Neurosurg*, 1992; 76: 571-577.
112. Tachibana E, Harada T, Shibuya M, Saito K, Takayasu M, Suzuki Y, Yoshida J. Intra-arterial infusion of fasudil hydrochloride for treating vasospasm following subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*, 1999; 141: 13-19.
113. Fuster V, Badimon L, Badimon J J, Chesebro J H. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 1992; 326: 310-318.
114. Katsumata N, Shimokawa H, Seto M, Kozai T, Yamawaki T, Kuwata K, Egashira K, Ikegaki I, Asano T, Sasaki Y, Takeshita A. Enhanced myosin light chain phosphorylations as a central mechanism for coronary artery spasm in a swine model with interleukin-1beta. *Circulation*, 1997; 96: 4357-4363.
115. Shimokawa H, Morishige K, Miyata K, Kandabashi T, Eto Y, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Takeshita A. Long term inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic coronary lesions in a porcine model in vivo. *Cardiovasc Res*, 2001; 51: 169-177.
116. Utsunomiya T, Satoh S, Ikegaki I, Toshima Y, Asano T, Shimokawa H. Antianginal effects of hydroxyfasudil, a Rho-kinase inhibitor, in a canine model of effort angina. *Br J Pharmacol*, 2001; 134: 1724-1730.
117. Masumoto A, Mohri M, Shimokawa H, Urakami L, Usui M, Takeshita A. Suppression of coronary artery spasm by the Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina. *Circulation*, 2002; 105: 1545-1547.
118. Shimokawa H, Iinuma H, Kishida H. Antianginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study (abstract). *Circulation*, 2001; 104: 691P.
119. Roberts J A, Raeburn D, Rodger I W, Thomson N C. Comparison of in vivo airway responsiveness and in vitro smooth muscle sensitivity to methacholine in man. *Thorax*, 1984; 39: 837-843.
120. Chiba Y, Misawa M. Characteristics of muscarinic cholinceptors in airways of antigen-induced airway hyperresponsive rats. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1995; 111: 351-357.
121. Chiba Y, Takada Y, Miyamoto S, MitsuiSaito M, Karaki H, Misawa M. Augmented acetylcholine-induced, Rho-mediated  $Ca^{2+}$  sensitization of bronchial smooth muscle contraction in antigen-induced airway hyperresponsive rats. *Br J Pharmacol*, 1999; 127: 597-600.
122. Chiba Y, Sakai H, Misawa M. Augmented acetylcholine induced translocation of RhoA in bronchial smooth muscle from antigen-induced airway hyperresponsive rats. *Br J Pharmacol*, 2001; 133: 886-890.

123. Izuka K, Shimizu Y, Tsukagoshi H, Yoshii A, Harada T, Dobashi K, Murozono T, Nakazawa T, Mori M. Evaluation of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *Eur J Pharmacol*, **2000**; 406: 273-279.
124. Niuro N, Nishimura J, Sakihara C, Nakano H, Kanaide H. Up-regulation of Rho A and Rho-kinase mRNAs in the rat myometrium during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**; 230: 356-359.
125. 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. *Endocrinology*, **2002**; 143: 920-929.
126. Kupittayanant S, Burdyga T, Wray S. The effects of inhibiting Rho-associated kinase with Y-27632 on force and intracellular calcium in human myometrium. *Pflugers Arch*, **2001**; 443: 112-114.
127. Mills T M, Chitaley K, Wingard C J, Lewis RW, Webb R C. Effect of Rho-kinase inhibition on vasoconstriction in the penile circulation. *J Appl Physiol*, **2001**; 91: 1269-1273.
128. Honjo M, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BY, Honda Y, Tanihara H. Effects of protein kinase inhibitor, HA1077, on intraocular pressure and outflow facility in rabbit eyes. *Arch Ophthalmol*, **2001**; 119: 1171-1178.
129. Rao P V, Deng P F, Kumar J, Epstein D L. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho-kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **2001**; 42: 1029-1037.
130. Hunter J J, Chien K R. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*, **1999**; 341: 1276-1283.
131. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*, **1999**; 79: 215-262.
132. Hoshijima M, Sah VP, Wang Y, Chien KR, Brown JH. The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes. Involvement of Rho-kinase. *J Biol Chem*, **1998**; 273: 7725-7730.
133. Sah VP, Hoshijima M, Chien KR, Brown JH. Rho is required for Galphaq and alpha1-adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes. Dissociation of Ras and Rho pathways. *J Biol Chem*, **1996**; 271: 31185-1190.
134. Kuwahara K, Saito Y, Nakagawa O, Kishimoto I, Harada M, Ogawa E, Miyamoto Y, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K. The effects of the selective ROCK inhibitor, Y27632, on ET-1-induced hypertrophic response in neonatal rat cardiac myocytes-possible involvement of Rho/ROCK pathway in cardiac muscle cell hypertrophy. *FEBS Lett*, **1999**; 452: 314-318.
135. Yanazume T, Hasegawa K, Wada H, Morimoto T, Abe M, Kawamura T, Sasayama S. Rho/ROCK pathway contributes to the activation of extracellular signal-regulated kinase/ GATA-4 during myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem*, **2002**; 277: 8618-8625.
136. Sah V P, Minamisawa S, Tam S P, Wu T H, Dorn GW, Ross J Jr, Chien K R, Brown J H. Cardiac-specific over expression of RhoA results in sinus and atrioventricular nodal dysfunction and contractile failure. *J Clin Invest*, **1999**; 103: 1627-1634.
137. Morishige K, Shimokawa H, Eto Y, Kandabashi T, Miyata K, Matsumoto Y, Hoshijima M, Kaibuchi K, Takeshita A. Adenovirus-mediated transfer of dominant-negative Rho-kinase induces a regression of coronary arteriosclerosis in pigs in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2001**; 21: 548-554.



138. Liu M W, Roubin G S, King SB. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation*, 1989; 79: 1374-1387.
139. Shibata R, Kai H, Seki Y, Kato S, Morimatsu M, Kaibuchi K, Imaizumi T. Role of Rho-associated kinase in neointima formation after vascular injury. *Circulation*, 2001; 103: 284-289.
140. Schmitz AA, Govek EE, Bottner B, Van Aelst L. Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res*, 2000; 261: 1-12.
141. Yoshioka K, Matsumura F, Akedo H, Itoh K. Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells. *J Biol Chem*, 1998; 273: 5146-5154.
142. Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uchata M, Ishizaki T, Narumiya S. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med*, 1999; 5: 221-225.
143. Genda T, Sakamoto M, Ichida T, Asakura H, Kojiro M, Narumiya S, Hirohashi S. Cell motility mediated by rho and Rho-associated protein kinase plays a critical role in intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1999; 30: 1027-1036.
144. Somlyo A V, Bradshaw D, Ramos S, Murphy C, Myers C E, Somlyo A P. Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 269: 652-659.
145. Verma S, Anderson T J. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*, 2002; 105: 546-549.
146. Laufs U, Endres M, Stagliano N, Amin-Hanjani S, Chui D S, Yang S X, Simoncini T, Yamada M, Rabkin E, Allen P G, Huang P L, Bohm M, Schoen F J, Moskowitz M A, Liao J K. Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *J Clin Invest*, 2000; 106: 15-24.
147. 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: 583-590.
148. Swärd K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne D J, Walsh M P. Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J Physiol (Lond)*, 2000; 522: 33-49.
149. Tomomasa T, Takahashi A, Kaneko H, Watanabe T, Tabata M, Kato M, Morikawa A. Y-27632 inhibits gastric motility in conscious rats. *Life Sci*, 2000; 66: 29-34.
150. Klages B, Brandt U, Simon M I, Schultz G, Offermanns S. Activation of G<sub>12</sub>/G<sub>13</sub> results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol*, 1999; 144: 745-754.
151. Bauer M, Retzer M, Wilde JI, Maschberger P, Essler M, Aepfelbacher M, Watson S P, Siess W. Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood*, 1999; 94: 1665-1672.
152. Paul B Z, Daniel J L, Kunapuli S P. Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and independent signaling pathways. *J Biol Chem*, 1999; 274: 28293-28300.
153. Kawaguchi A, Ohmori M, Harada K, Tsuruoka S, Sugimoto K, Fujimura A. The effect of a Rho-kinase inhibitor Y-27632 on superoxide production, aggregation and adhesion in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Pharmacol*, 2000; 403: 203-208.

154. Lou Z, Billadeau DD, Savoy DN, Schoon RA, Leibson PJ. A role for a RhoA/ROCK/LIM-kinase pathway in the regulation of cytotoxic lymphocytes. *J Immun*, **2001**; 167: 5749-5757.
155. Vicente-Manzanares M, Cabrero J R, Rey M, Perez-Martinez M, Ursa A, Itoh K, Sanchez-Madrid F. A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ -induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis. *J Immunol*, **2002**; 168: 400-410.
156. Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, Shimokawa H, Kaibuchi K, Iwamoto Y, Takayanagi R. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **2001**; 287: 337-342.
157. Bito H, Furuyashiki T, Ishihara H, Shibasaki Y, Ohashi K, Mizuno K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S. A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in de-termining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron*, **2000**; 26: 431-441.
158. Luo L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci*, **2000**; 1: 173-180.
159. Dickson BJ. Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol*, **2001**; 11: 103-110.
160. Guyton AC, Hail JE. Dolaşim. *Tibbi Fizyoloji*. İstanbul: Tavafı Matbaacılık, **2001**: 144-261.
161. Busse R, Fleming I. Nitric oxide and regulation of vascular tone. In: Born GVR, Cuatrecasas P, Ganten D, Henken H, Starke K, Taylor P, Eds. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Berlin: Springer Verlag, **2000**: 179-206.
162. Cock, TM. Endothelium-dependent vasodilatory mechanisms. In Garland CJ and Angus JA. Eds. *Pharmacology of Vascular Smooth Muscle*. Oxford: Oxford University Press, **1996**: 233-251.
163. Kayaalp S. Kolinomimetik ilaçlar, parasempatomimetik ilaçlar ve antikolinesterazlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tibbi Farmakoloji*, Ankara: Hacettepe Taş Yayınları, **2002**: 1075-1092.
164. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, **2000**; 351: 95-105.
165. Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, Oldner A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur J Pharmacol*. **2000**; 407: 1-15.
166. Sakurada S, Okamoto H, Takuwa N, Sugimoto N, Takuwa Y. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. **2001**; 281: C571-578.
167. Cavarape A, Endlich N, Assaloni R, Bartoli E, Steinhausen M, Parekh N, Endlich K. Rho-kinase inhibition blunts renal vasoconstriction induced by distinct signaling pathways in vivo. *Am Soc Nephrol*. **2003**; 14: 37-45.
168. Bkaily G, Choufani S, Sader S, Jacques D, d'Orleans-Juste P, Nader M, Kurban G, Kamal M. Activation of sarcolemma and nuclear membranes ET-1 receptors regulates transcellular calcium levels in heart and vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol*. **2003**; 81: 654-662.
169. Boer, C., van der Linden, P.J., Scheffer, G.J., Westerhof, N., de Lange, J.J., Sipkema, P.. RhoA/Rho kinase and nitric oxide modulate the agonist-induced pulmonary artery diameter response time. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2002**; 282: H990-H998.
170. Carter, R.W., Begaye, M., Kanagy, N.L. Acute and chronic inhibition enhances  $\alpha_2$ -adrenoceptor-stimulated RhoA and Rho kinase in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2002**; 283: H1361-1369.

171. Schubert R, Kalentchuk VU, Krien U. Rho kinase inhibition partly weakens myogenic reactivity in rat small arteries by changing calcium sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2002**; 283: H2288-2295.
172. Chitale, K., Webb, R.C. Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signalling. *Hypertension.* **2002**; 39, 438-442.
173. Nagao, T., Iliano, S., Vanhoutte, P.M. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine in rat. *Am J Physiol.* **1992**; 263: H1090-H1094.
174. Kandabashi, T., Shimokawa, H., Mukai, Y., Matoba, T., Kunihiro, I., Morikawa, K., Ito, M., Takahashi, S., Kaibuchi, K., Takeshita, A. Involvement of rho-kinase in agonists-induced contractions of arteriosclerotic human arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **2002**; 22: 243-248.

## ÖZGEÇMİŞ

17 Ağustos 1976 tarihinde Mersin’de doğdu. İlk okul eğitimini Mersin 24 Kasım İlköğretim Okulunda, orta ve lise öğrenimini İçel Anadolu Lisesinde tamamladı. 1999 yılında Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldu. 2001 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalında Yüksek lisans eğitimine başladı.

Halen serbest eczacı olarak çalışmaktadır. İngilizce bilir. Bekardır.