

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK MESLEK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS (TEZLİ) PROGRAMI

**ENDOTOKSİN İLE OLUŞAN VASKÜLER HİPOREAKTİVİTEDE
G PROTEİNİ İLE KENETLİ ALFA-ADRENERJİK
RESEPTÖR/MİTOJEN İLE AKTİVE EDİLEN KİNAZLAR YOLU
İLE SİTOZOLİK FOSFOLİPAZ A₂ VE İNDÜKLENEBİLİR
NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
MEKANİZMALARININ SIÇAN AORTUNDA ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Remile Belma KORKMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç. Dr. Bahar TUNÇTAN

MERSİN – 2004

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK MESLEK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS (TEZLİ) PROGRAMI

**ENDOTOKSİN İLE OLUŞAN VASKÜLER HİPOREAKTİVİTEDE
G PROTEİNİ İLE KENETLİ ALFA-ADRENERJİK
RESEPTÖR/MİTOJEN İLE AKTİVE EDİLEN KİNAZLAR YOLU
İLE SİTOZOLİK FOSFOLİPAZ A₂ VE İNDÜKLENEBİLİR
NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
MEKANİZMALARININ SIÇAN AORTUNDA ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Remile Belma KORKMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç. Dr. Bahar TUNÇTAN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP SBE EMB (RBK) 2003 - 1 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 21..

MERSİN – 2004

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

“Eczacılık Meslek Bilimleri Anabilim Dalı Farmakoloji Yüksek Lisans (Tezli) Programı” çerçevesinde yürütülmüş olan “Endotoksin ile oluşan vasküler hiporeaktivitede G proteini ile kenetli alfa-adrenerjik reseptör/mitojen ile aktive edilen kinazlar yolu ile sitozolik fosfolipaz A₂ ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz enzimleri arasındaki ilişkinin mekanizmalarının sıçan aortunda araştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 21 / 07 / 2004

Doç. Dr. Bahar TUNÇTAN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Eczacılık Meslek Bilimleri Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

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

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

Yukarıdaki tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 28.07.2004.. tarih ve 2004./232 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cahit ERDOĞAN
MERSİN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

TEŞEKKÜR

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

Tezim ve diğer çalışmalarım sırasında benden değerli bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Sn. C. Kemal BUHARALIOĞLU'na, dostluğunu ve bilgilerini benimle paylaşan mesai arkadaşım Ecz. Sn. Elif ÖZVEREN'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek Lisansa başladığımdan bugüne yaptıkları değerli katkı ve yardımları için Doç. Dr. Sn. Kansu BÜYÜKAFŐAR'a ve Yrd. Doç. Dr. Sn. Mustafa ARK'a teşekkür ederim.

Herzaman gösterdikleri sabır ve destek için aileme sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	6
2.1 Septik Şok	6
2.1.1 Etiyoloji	6
2.1.2 Patofizyoloji	8
2.1.3 Tedavi	12
2.2 G Proteini ile Kenetli Reseptörler	14
2.3 Mitojen ile Aktive Edilen Kinazlar (MAPK)'ler	20
2.4 Sitozolik Fosfolipaz A ₂ (Sitozolik FLA ₂)	21
2.5 Nitrik Oksit (NO)	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1 Gereç	27
3.1.1 Deney Hayvanı ve Doku	27
3.1.2 Vasküler Kontraktilite Çalışmaları	27
3.1.3 Doku Homojenatlarının Hazırlanması	28
3.1.4 Doku Homojenatlarında Protein Ölçümü	29
3.1.5 Doku Homojenatlarında Nitrit Ölçümü	29

3.1.6 Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları	28
3.1.6.1 Vasküler Kontraktilite Çalışmaları	28
3.1.6.2 Doku Homojenatlarının Hazırlanması	29
3.1.6.3 Doku Homojenatlarında Protein Ölçümü	29
3.1.6.4 Doku Homojenatlarında Nitrit Ölçümü	30
3.2 Yöntem	30
3.2.1 Sıçan Torasik Aorta Halkalarının İzolasyonu ve Deneye Hazırlanması	30
3.2.2 Doku Homojenatlarının Hazırlanması	33
3.2.3 Doku Homojenatlarında Protein Ölçümü	33
3.2.4 Doku Homojenatlarında Nitrit Ölçümü ve iNOS Aktivitesinin Hesaplanması	34
3.2.5 Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	36
4.1 Vasküler Kontraktilite Çalışmaları	36
4.1.1 Ortamda Endotoksin Yokken ve Varken Noradrenalin ile Elde Edilen Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri, EC_{50} ve E_{maks} Değerleri	36
4.1.2 Ortamda Endotoksin Yokken ve Varken Noradrenalin ile Elde Edilen Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri, EC_{50} ve E_{maks} Değerleri Üzerinde 1,3-PBIT'nin Etkisi	39
4.1.3 Ortamda Endotoksin Yokken ve Varken Noradrenalin ile Elde Edilen Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri, EC_{50} ve E_{maks} Değerleri Üzerinde MAFF'nin Etkisi	45
4.1.4 Ortamda Endotoksin Yokken ve Varken Noradrenalin ile Elde Edilen Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri, EC_{50} ve E_{maks} Değerleri Üzerinde U0126'nın Etkisi	51
4.2 iNOS Aktivitesi Ölçümü	57
4.2.1 iNOS Aktivitesi Üzerinde 1,3-PBIT'nin Etkisi	57
4.2.2 iNOS Aktivitesi Üzerinde MAFF'nin Etkisi	58
4.2.3 iNOS Aktivitesi Üzerinde U0126'nın Etkisi	59

5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	68
7. KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	85



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 G_q ve $G_{12/13}$ proteinleri ile kenetli olan α -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma ve gevşeme yanıtları ile ilgili sinyal ileti yolları üzerinde lipopolisakkarit (LPS), indüklenebilir nitrik oksit (NO) sentaz (iNOS), sitozolik fosfolipaz A_2 (sitozolik FLA ₂), mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) kinaz (MAPKK) (MEK) 1/2 ve kalsiyum/kalmoduline bağımlı protein kinaz II (KaMKII)'nin etkileri	5
Şekil 2.1 Lipopolisakkaridin yapısı	9
Şekil 2.2 Lipopolisakkarit (LPS)'nin <i>Toll-like receptor</i> (TLR)'lerden TLR2/TLR4 reseptörler aracılığı ile oluşan sinyal ileti yolu	10
Şekil 2.3 Heterotrimerik G proteinin aktivasyonu ile ilgili olaylar	16
Şekil 2.4 Fosfolipazların etki yerleri	23
Şekil 3.1 Vasküler kontraktilite çalışmalarında uygulanan deney protokolü	31
Şekil 4.1 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 μ g/ml) ile (A) 1, (B) 2, (C) 4 ve (D) 6 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 μ M) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları	37

Şekil 4.2 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ile (A) 1, (B) 2, (C) 4 ve (D) 6 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden elde edilen kasılma yanıtlarından hesaplanan (A) EC₅₀ ve (B) E_{maks} değerleri 38

Şekil 4.3 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ve/veya (A) 0.1, (B) 1 ve (C) 10 µg/ml konsantrasyonlarda selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları 41

Şekil 4.4 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ve/veya selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A) EC₅₀ ve (B) E_{maks} değerleri 43

Şekil 4.5 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ve/veya (A) 0.1, (B) 1 ve (C) 10 µg/ml konsantrasyonlarda selektif FLA₂ inhibitörü MAFF ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları 47

Şekil 4.6 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ve/veya selektif FLA₂ inhibitörü MAFF (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A) EC₅₀ ve (B) E_{maks} değerleri 49

Şekil 4.7 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ve/veya (A) 0.1, (B) 1 ve (C) 10 µg/ml konsantrasyonlarda selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları 53

Şekil 4.8 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ve/veya selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4-saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A) EC₅₀ ve (B) E_{maks} değerleri 55



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Sepsis ve septik şok ile ilgili tanımlar	7
Çizelge 2.2 Septik şokun rutin tedavisi	13
Çizelge 2.3 Sepsis ve ilgili durumların tedavisinde öngörülen yaklaşımlar	15
Çizelge 2.4 G proteini ile kenetli reseptör tipleri ve ve efektör makromoleküller üzerindeki etkileri	17
Çizelge 2.5 Memeli fosfolipaz A ₂ (FLA ₂) enzimlerinin özellikleri	22
Çizelge 2.6 Memeli nitrik oksit sentaz (NOS) izoformlarının özellikleri	25
Çizelge 4.1 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) veya selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları	40
Çizelge 4.2 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC ₅₀ ve E _{maks} değerleri	43

Çizelge 4.3 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) veya selektif FLA ₂ inhibitörü MAFF (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları	46
Çizelge 4.4 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve selektif FLA ₂ inhibitörü MAFF (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC ₅₀ ve E _{maks} değerleri	49
Çizelge 4.5 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) veya selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 (0.1, 1 veya 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları	52
Çizelge 4.6 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC ₅₀ ve E _{maks} değerleri	55
Çizelge 4.7 Sıçan izole torasik aortunda, endotoksin (100 µg/ml) ile artan nitrit miktarı üzerinde selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT (10 µg/ml)'nin etkisi	57
Çizelge 4.8 Sıçan izole torasik aortunda, endotoksin (100 µg/ml) ile artan nitrit miktarı üzerinde selektif FLA ₂ inhibitörü MAFF (0.1, 1 ve 10 µg/ml)'nin etkisi	58
Çizelge 4.9 Sıçan izole torasik aortunda, endotoksin (100 µg/ml) ile artan nitrit miktarı üzerinde selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 (0.1 ve 10 µg/ml)'nin etkisi	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1,3-PBIT	<i>Phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide</i>
5-HT	5-Hidroksitriptamin
a/h	Ağırlık/hacim
AMP	<i>Adenosine 5'-monophosphate</i>
ASK	Apoptozis sinyal regüle edici kinaz
BH ₄	Tetrahidrobipyopterin
BPI	<i>Bactericidal permeability-increasing protein</i>
BSA	Sığır serum albumini (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
COX	Siklooksijenaz (<i>cyclooxygenase</i>)
COX-2	İndüklenebilir siklooksijenaz (<i>cyclooxygenase</i>)
CYP	Cytochrome P450
DAG	Diaçilgliserol
DMSO	Dimetilsülfoksit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	Konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan %50 etki oluşturan konsantrasyon
EET	Epoksieikozatrienoik asit
E _{maks}	Konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan maksimum etki
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
ERK	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
ET	Endotoksin
FE	Fenilefrin
<i>F</i>	İstatistiksel analizlerde tek-yönlü varyans analizi sonrasında hesaplanan anlamlılık düzeyi (<i>probability</i>)
FAD	Flavinadenin dinükleotid

FLA	Fosfolipaz A
FLC	Fosfolipaz C
FMN	Flavinadenin mononükleotid
GDP	<i>Guanosine 5'-diphosphate</i>
GMP	<i>Guanosine 5'-monophosphate</i>
GPKR	G proteini ile kenetli reseptör
GTN	Gliseril trinitrat
GTP	<i>Guanosine 5'-triphosphate</i>
HETE	Hidroksieikozatetraenoik asit
İκB	İnhibitör κB
IC ₅₀	%50 inhibisyon oluşturan konsantrasyon
İFN	İnterferon
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
IP ₃	<i>Inositol-1,4,5-triphosphate</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
LBP	Lipid bağlayıcı protein
LO	Lipoksijenaz
LPS	Lipopolisakkarit
LTA	Lipoteikoik asit
MAFF	Metilarakidonil florofosfonat
MAPK	Mitojen ile aktive edilen protein kinaz
MAPKK	Mitojen ile aktive edilen protein kinaz kinaz
MAPKKK	Mitojen ile aktive edilen protein kinaz kinaz kinaz
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MEK	Mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) kinaz (MAPKK)/MAPK-ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (<i>extracellular signal-regulated kinase, ERK</i>) (MAPK-ERK kinaz)
MEKK	Mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) kinaz (MAPKK) kinaz (MAPKKK)/MAPK-ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (<i>extracellular signal-regulated kinase, ERK</i>) kinaz (MAPK-ERK kinaz kinaz)
MLK	<i>Mixed lineage kinase</i>

NA	Noradrenalin
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (indirgenmiş şekil)
NED	N-1-naftiletilendiamin dihidroklorür
NF-κB	Nükleer faktör-κB
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
<i>P</i>	İstatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi (<i>probability</i>)
PARS	Poli(ADP-riboz) sentaz
PD98059	<i>N-Methyl-4-(2-cyanophenyl)piperazinyl-3-methylbenzamide</i>
PG	Prostaglandin
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate</i>
PIP ₃	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate</i>
PKC	Protein kinaz C
PKG	Protein kinaz G
SAPK	Stres ile aktive edilen protein kinaz
TAF	Trombosit aktive edici faktör
TAK	Transforme edici büyüme faktörü ile aktive edilen kinaz (<i>transforming growth factor-activated kinase</i>)
TGF	Transforme edici büyüme faktörü (<i>transforming-growth factor</i>)
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tümör nekroze edici faktör
TRH	Tirotropin salgılatıcı hormon (<i>thyrotropin-releasing hormone</i>)
U0126	<i>1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien</i>
yNOS	Yapısal nitrik oksit sentaz

ÖZET

Endotoksin ile Oluşan Vasküler Hiporeaktivitede G Proteini ile Kenetli Alfa-Adrenerjik Reseptör/Mitojen ile Aktive Edilen Kinazlar Yolu ile Sitolik Fosfolipaz A₂ ve İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri Arasındaki İlişkinin Mekanizmalarının Sıçan Aortunda Araştırılması

Bu çalışmada, endotoksin ile oluşan vasküler hiporeaktivitede indüklenebilir nitrik oksit (NO) sentaz (iNOS), sitozolik fosfolipaz A₂ (sitozolik FLA₂) ve mitojen ile aktive edilen protein kinaz kinaz (MEK1/2) enzimlerinin olası rolü sıçan izole torasik aortunda araştırıldı. Miyografa yerleştirilen halka şeklinde ve endoteli sağlam dokularda noradrenalin (0.001-1000 µM) ile kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrileri alındıktan sonra, dokular endotoksin (100 µg/ml) ile 1, 2, 4 veya 6 saat inkübe edildi ve konsantrasyon-yanıt eğrileri tekrarlandı. Endotoksin ile 4 saat inkübe edilen dokularda, noradrenalin EC₅₀ değeri kontrole göre daha fazla, E_{maks} değeri ise daha azdı. Enzim inhibitörleri (0.1, 1 veya 10 µg/ml) ile ortamda endotoksin yokken ve varken 4 saat inkübasyonun ardından noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrileri tekrarlandı. Endotoksin ile artan noradrenalinin EC₅₀ değeri selektif iNOS inhibitörü *phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide* (1,3-PBIT), selektif sitozolik FLA₂ inhibitörü metilarakidonil florofosfonat (MAFF) ve selektif MEK1/2 inhibitörü *1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien* (U0126) ile azaldı, azalan E_{maks} değeri ise 1,3-PBIT ile arttı, U0126 ile azaldı ve MAFF ile değişmedi. Endotoksin ile artan doku nitrit miktarı ise 1,3-PBIT, MAFF ve U0126 ile azaldı. Bu bulgular, endotoksin ile oluşan vasküler hiporeaktiviteden endotel ve/veya düz kas hücrelerinde iNOS ve FLA₂ aktivitesinin artması sonucunda oluşumu artan NO ve vazodilatör etkili FLA₂ yolu ürünleri ve bu ürünler arasındaki sinerjistik etkileşmelerin rolü olduğunu göstermektedir; ayrıca, MEK1/2 ekspresyonu ve/veya aktivitesinin artması ile ilişkili vazodilatasyon ve vazokonstriksiyona aracılık eden olayların da hiporeaktiviteye katkısı olabilir.

ABSTRACT

The Investigation of the Mechanisms of Relationship among G Protein-Coupled Alpha-Adrenergic Receptor/Mitogen-Activated Kinases Pathway, Cytosolic Phospholipase A₂ and Inducible Nitric Oxide Synthase Enzymes in Endotoxin Induced Vascular Hyporeactivity in Rat Aorta

In this study, possible role of inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS), cytosolic phospholipase A₂ (cytosolic PLA₂) and mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1/2) were investigated in endotoxin-induced vascular hyporeactivity in the rat isolated thoracic aorta. Aortic rings with intact endothelium were mounted in a myograph and cumulative concentration-response curves were obtained with noradrenaline (0.001-1000 μ M). Following by incubation for 1, 2, 4 or 6 h with endotoxin (100 μ g/ml) noradrenaline concentration-response curves were repeated. At 4 h after endotoxin, EC₅₀ value for noradrenaline was higher than that of control, while E_{max} value for control was decreased by endotoxin. Following by 4 h incubation with enzyme inhibitors (0.1, 1 or 10 μ g/ml) in the presence and absence of endotoxin, noradrenaline concentration-response curves were repeated. The endotoxin-induced increase in EC₅₀ value for noradrenaline was decreased by selective iNOS inhibitor, 1,3-phenylene-bis(1,2-ethanediy)bis-isothiourea (1,3-PBIT), selective cytosolic PLA₂ inhibitor, methyl arachidonyl fluorophosphate (MAFF), and selective MEK 1/2 inhibitor, 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)-butadiene (U0126). The endotoxin-induced decrease in E_{max} value was increased by 1,3-PBIT, decreased by U0126, and not changed by MAFF. Endotoxin-induced increase in tissue nitrite level was decreased by 1,3-PBIT, MAFF and U0126. These findings indicate that increased levels of NO and vasodilatory products of PLA₂ pathway which are resulted from increased iNOS and PLA₂ activity in endothelial and/or vascular smooth muscle cells and interactions among them synergistically may be responsible for the endotoxin-induced vascular hyporeactivity. Furthermore, events related to increased MEK1/2 expression and/or activity leading to vasodilatation and vasoconstriction may contribute to this hyporeactivity.

1. GİRİŞ

Sepsis ve septik şok, genellikle Gram (-) bakterilerin neden olduğu, kanda vazopresör katekolamin düzeylerinin artmasına karşın, vazokonstriktör maddelere karşı hiporeaktivite ve kan basıncında şiddetli bir düşmenin eşlik ettiği, mikrosirkülatuar disfonksiyon ile birlikte akciğer, karaciğer, böbrek ve beyin gibi hayati organlarda doku perfüzyonu ve oksijen kullanımında bozulma sonucu bu organların disfonksiyonu ve ardından ölümün görüldüğü kompleks bir sistemik inflamatuvar yanıttır. Sepsisli insan ve hayvanlarda ölüm nedeni olarak, akciğer ve böbrek hasarı, miyokard depresyonu, vazopresör maddelere karşı yanıtsız kalan periferik vazodilatasyonun neden olduğu refrakter hipotansiyon veya çoklu organ yetmezliği görülmektedir. Yoğun bakım ünitelerinde septik şok nedeniyle görülen mortalitenin yüksek olduğu bilinmektedir. Antimikrobiyal tedavi ve hemodinamik desteğin yetersiz kaldığı sepsis tedavisindeki gelişmelerin yavaş ilerlemesinin nedenleri olarak, septik şok patojenezinin pek çok mediyatörün katkısı nedeni ile kompleks olması, mediyatörlerin birbirleri ile etkileşmeleri, semptomlar ve prognozun bireyler arasında farklılık göstermesi sayılmaktadır (1-11).

Konakçının endotoksin, stres (oksidan stres, *heat shock*, ozmotik şok veya iyonize edici radyasyon gibi), büyüme faktörleri ve mitojenler gibi faktörlere maruz kalması ile tetiklenen olaylar sonucunda oluşumları artan proinflamatuvar sitokinler (tümör nekroze edici faktör [TNF]- α gibi), mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) kinaz (MAPKK) kinaz (MAPKKK) (Raf, B-Raf, *mixed lineage kinase* [MLK]'lar, transforme edici büyüme faktörü [TGF] ile aktive edilen kinaz [*transforming growth factor-activated kinase*, TAK], apoptozis sinyal regüle edici kinaz [ASK] 1, MAPKK/MAPK-ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz [*extracellular signal-regulated kinase*, ERK] kinaz [MAPK-ERK kinaz kinaz] [MEKK] 1-4), MAPKK (MEK1 ve -2, MKK3-7) ve MAPK (ERK1, -2 ve -5, p38 MAPK, stres ile aktive edilen protein kinaz [SAPK] ve *c-jun N-terminal kinase* [JNK])'lerin bulunduğu sinyal ileti yollarını uyararak, MAPK'ların hücre çekirdeğine lokalizasyonuna ve burada çeşitli apoptozis genlerini regüle eden spesifik transkripsiyon genlerinin

fosforilasyonuna neden olmaktadır. Sonuç olarak biyolojik yanıt, çeşitli sistemlerde büyüme, farklılaşma, gelişme, inflamasyon ve apoptozis şeklinde ortaya çıkmaktadır. (12-17). Proinflamatuvar sitokinler bu şekilde indüklenebilir nitrik oksit (NO) sentaz (iNOS) ve sitozolik fosfolipaz A₂ (sitozolik FLA₂) gibi enzimlerin mRNA ekspresyonlarını artırarak vazodilatör mediyatörler olan NO ve prostaglandinlerin aşırı miktarlarda oluşumuna neden olmaktadır (1, 18-21). Oluşumu artan bu vazodilatör metabolitlerin yanısıra, sitozolik FLA₂ enziminin de katkıda bulunduğu arakidonik asitten sitokrom P450 (CYP) yolu ile oluşan 20-hidroksieikozatetraenoik asit (20-HETE) gibi vazokonstriktör ürünlerinin azalması ve epoksieikozatrienoik asit (EET)'ler gibi vazodilatör ürünlerin de artması da kardiyovasküler sistemin baskılanmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, sepsis patojenezinde vazodilatör/vazokonstriktör denge vazodilatör metabolitlerin oluşumunun artışı yönünde bozulmuştur. Bozulan bu dengenin yeniden kurulması için de ürünler ve/veya enzimler düzeyinde birbirlerinin oluşumlarını ve/veya etkilerini önleyecek şekilde etkileşmeler de görülmektedir (22, 23). Bütün bu olaylar sepsiste vazokonstriktör tedaviye karşın geri çevrilemeyen vasküler hiporeaktiviteyi açıklamaktadır.

Araştırmacılar, sayılan mediyatörlerin oluşumuna neden olan olayların ya da etki mekanizmalarının selektif inhibisyonunun, sepsiste görülen morbidite ve mortalite bakımından koruyucu etkiler oluşturabileceğini ileri sürmektedirler (24-26). Ancak prelinik ve klinik araştırmalarda iNOS inhibitörlerinin vasküler hiporeaktiviteyi geri çevirebilmelerine ve mortaliteyi önleyebilmelerine karşın, renal ve pulmoner sistemde oluşturdukları olumsuz etkilerden dolayı henüz rutin uygulamaya girememişlerdir (5, 18, 27-29). Son yıllarda sepsis patojenezi ile ilgili olarak yapılan çalışmalar sözü edilen sinyal ileti yolu üzerinde yoğunlaşmıştır (1-11, 30).

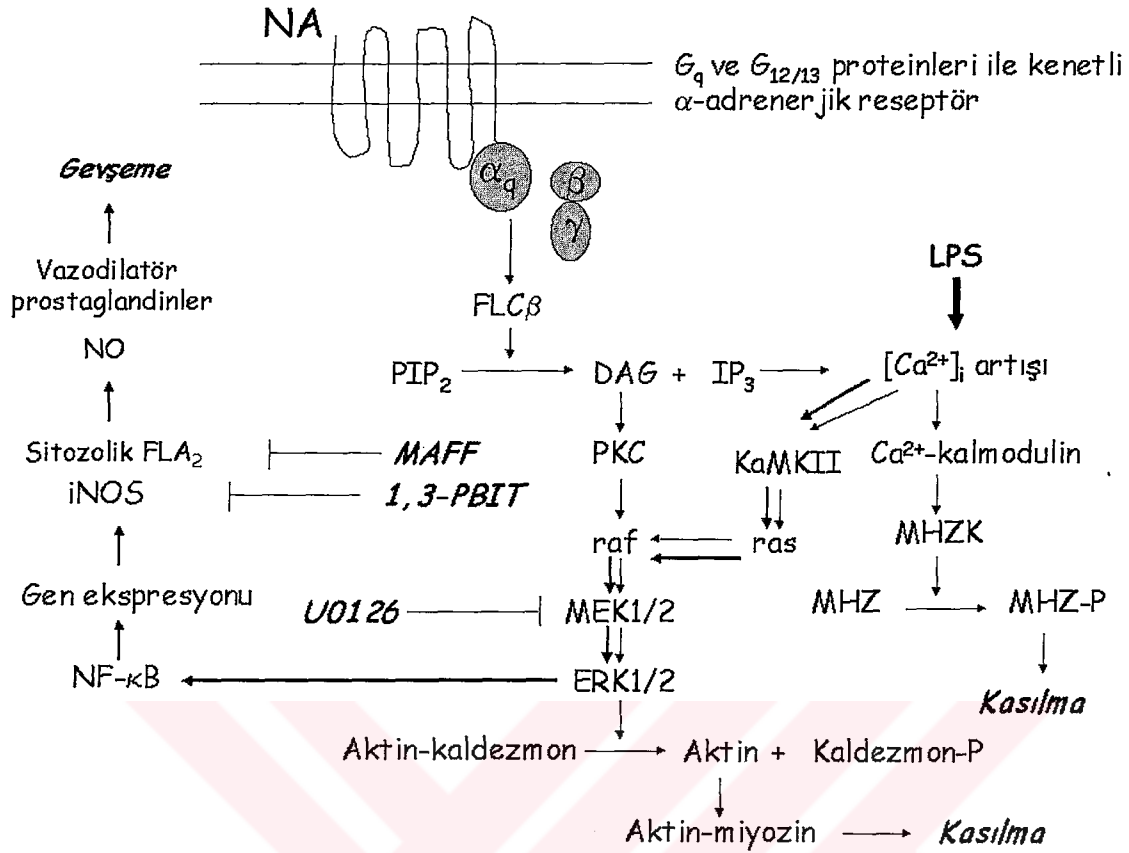
Heterodimerik G proteinleri (G_s, G_i, G_q ve G₁₂ gibi), membrana bağlı G proteini ile kenetli reseptörlerden aldıkları sinyalleri iyon kanalları ve enzimler gibi intraselüler hedeflere iletirler. G_q ile kenetli reseptörler, fosfolipaz C (FLC)'yi aktive ederek *inositol-1,4,5-triphosphate* (IP₃) ve diaçil gliserol (DAG) oluşumuna neden olurlar. DAG protein kinaz C (PKC) aracılığı ile MAPK yolunu aktive ederken, IP₃ de ERK1/2 aktivasyonunu daha da artıran intraselüler kalsiyum düzeylerinin artmasına neden olur.

PKC'nin ERK1/2'yi aktive etme mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak, bazı çalışmalarda PKC tarafından ERK aktivasyonunun Ras'dan bağımsız bir mekanizma ile, muhtemelen PKC tarafından Raf-1'in direkt fosforilasyonu ile olabileceği bildirilmiştir. Diğer yandan, PKC'nin Ras aktivasyonunu ve Ras-Raf-1 kompleksleri oluşumunu uyardığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (15, 16).

Son yıllarda çeşitli hücre kültürü çalışmalarından elde edilen, endotoksinin MEK/ERK yolunu aktive ettiği ve PKC ile Ras/Raf/MAPK kaskadı gibi protoonkojenlerin iNOS ekspresyonunu düzenlediğine dair bilgiler giderek artmaktadır (31-36). Pek çok çalışmada MAPK'lerin endotoksin veya sitokin ile oluşan iNOS ekspresyonu üzerinde pozitif etkileri olduğu gösterilmesine karşın, negatif bulgular da vardır (37). Farmakolojik ve genetik veriler, en azından fare iNOS ekspresyonunda çeşitli MAPK'lerin rolü olduğunu göstermektedir. ERK yolunun iNOS indüksiyonu ve NO oluşumunda rolü olduğunun bilinmesine karşın, NO'nun ERK yolu üzerindeki etkileri konusunda henüz net bir bulgu yoktur. Bazı çalışmalarda, ERK kinazların farmakolojik inhibisyonunun iNOS ekspresyonunu etkilemediği gösterilmiştir (38). Diğer yandan, sitokin veya endotoksin ile artan iNOS ekspresyonunun MEKK inhibitörü ile önlendiği de gösterilmiştir (39). Vurgulanması gereken bir diğer nokta da, MAPK'lerin iNOS ekspresyonuna neden olan nükleer faktör- κ B (NF- κ B) aktivasyonunda rolü olduğudur. Çeşitli deneysel sepsis modellerinde yapılan çalışmalarda, NF- κ B inhibitörleri ile iNOS ekspresyonu ve NO oluşumu önlenebilmektedir. Diğer yandan, MAPK'ların aktivasyonuna neden olan FLC ve PKC yollarının da iNOS ekspresyonu üzerinde pozitif veya negatif şekilde dual rolleri olduğu da bildirilmiştir. Fenotipik olarak kontraktıl düz kas hücrelerinin çok miktarda ERK1/2 eksprese ettiği bilinmektedir (40-44). NO'nun vazodilatör etki mekanizmasında önemli rol oynayan siklik *guanosine 5'-monophosphate* (siklik GMP)/protein kinaz G (PKG) yolunun ERK aktivitesini inhibe ettiğine dair bulgular da vardır (45, 46). Kontraktıl düz kas fonksiyonu üzerinde ERK1/2'nin rolünün araştırıldığı çalışmalarda, ERK'nin düz kas kontraksiyonu sırasında aktive olduğu, ancak bunun hücre proliferasyonu ile birlikte olmadığı gösterilmiştir (40, 41, 47-51).

Endotoksin ile α -adrenerjik agonistlere karşı azalan vazokonstriktör yanıtlarda FLA₂ ve iNOS enziminin katkısı olduğunu gösteren çeşitli çaplardaki arterlerde yapılan pek çok *ex vivo* ve *in vitro* çalışma olmasına karşın, ERK1/2'nin katkısı olabileceğini düşündüren çalışmaların neredeyse tamamı damar düz kas hücre kültüründe yapılmıştır. Kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar ise, G_q ve G_{12/13} proteinleri ile kenetli α -adrenerjik reseptörlerin uyarılmasından sonra tetiklenen mekanizmaların pek çok küçük G proteini ile çeşitli kinazların ekspresyonu ve/veya aktivasyonu sonucunda çeşitli genlerin transkripsiyonuna ve sonuçta apoptozise kadar giden olayların tetiklenmesine neden olduğunu göstermektedir. Yapılan literatür taramasında, spesifik ERK1/2 ile sitozolik FLA₂ inhibitörlerinin, sepsiste görülen vasküler hiporeaktivite üzerindeki etkilerine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Son bir kaç yıl içinde moleküler düzeyde elde edilen bu gelişmeler ışığında, Şekil 1.1'de de özetlendiği gibi bu tez çalışmasında, G_q ve G_{12/13} proteinleri ile kenetli olan ve çeşitli kinazlar ile ilişkili sinyal ileti yollarının endotoksin ile oluşan vasküler hiporeaktiviteyi ne yönde etkilediği araştırılmıştır. Sıçan izole torasik aortunda *in vitro* olarak yapılan bu çalışmada, G_q ve G_{12/13} proteinleri ile kenetli olan α -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtları üzerinde endotoksinin oluşturduğu etkilere iNOS, sitozolik FLA₂ ve MEK1/2 enzimlerinin katkısı araştırılmıştır.



Şekil 1.1 G_q ve $G_{12/13}$ proteinleri ile kenetli olan α -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma ve gevşeme yanıtları ile ilgili sinyal ileti yolları üzerinde lipopolisakkarit (LPS), indüklenebilir nitrik oksit (NO) sentaz (iNOS), sitozolik fosfolipaz A $_2$ (sitozolik FLA $_2$), mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) kinaz (MAPKK) (MEK) 1/2 ve kalsiyum/kalmoduline bağımlı protein kinaz II (KaMKII)'nin etkileri. 1,3-PBIT, *phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide*; DAG, *diacylglycerol*; FLC, *fosfolipaz C*; IP $_3$, *inositol-1,4,5-triphosphate*; MAFF, *metilarakidonil florofosfanat*; MHZ, *miyozin hafif zincir*; MHZK, *miyozin hafif zincir kinaz*; NA, *noradrenalin*; NF- κ B, *nükleer faktör- κ B*; PIP $_2$, *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*; PKC, *protein kinaz C*; U0126, *1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien*. Şekil 15, 26, 35, 36, 41 ve 45 numaralı kaynaklardan yararlanılarak tarafımızdan düzenlenmiştir.

2. GENEL BİLGİ

2.1 Septik Şok

2.1.1 Etiyoloji

Şok, vücudun hayati organlara ve dokulara yeterli kan ve oksijenin sağlanamaması sonucu yaşamı tehdit eden bir durum olarak tanımlanmaktadır. Şokun başlıca tipleri arasında septik şok, hemorajik şok, travmatik şok, kardiyojenik şok, nörojenik şok ve anafilaktik şok bulunmaktadır. Sepsis ve septik şok, genellikle Gram (-) bakterilerin neden olduğu, kanda vazopresör katekolamin düzeylerinin artmasına karşın, vazokonstriktör maddelere karşı hiporeaktivite ve kan basıncında şiddetli bir düşmenin eşlik ettiği, mikrosirkülatuar disfonksiyon ile birlikte akciğer, karaciğer, böbrek ve beyin gibi hayati organlarda doku perfüzyonu ve oksijen kullanımında bozulma sonucu bu organların disfonksiyonu ve ardından ölümün görüldüğü kompleks bir sistemik inflamatuvar yanıttır. Sepsisli insan ve hayvanlarda ölüm nedeni olarak, akciğer ve böbrek hasarı, miyokard depresyonu, vazopresör maddelere karşı yanıtsız kalan periferik vazodilatasyonun neden olduğu refrakter hipotansiyon veya çoklu organ yetmezliği görülmektedir (1-11). Konakçıda enfeksiyona maruziyet ile başlayan ve çoklu organ yetmezliğine kadar gidebilen durumların tanımını 1992'de *Society of Critical Medicine Consensus Conference*'da yapılmıştır (52) (Çizelge 2.1).

Sepsis ve septik şoka neden olan Gram (-) bakterilerin başında *Escherichia coli* gelmektedir (53, 54). Gram (-) bakteremisi olan hastaların büyük bir kısmında sepsis gelişmektedir. Gram (-) bakterilerin sepsis oluşturma olasılıkları %50 iken Gram (+) bakterilerin sepsis oluşturma özellikleri %25'tir. Fungal, viral ve protozoal enfeksiyonlar da sepsis ve septik şoka neden olabilmektedir (55).

Çizelge 2.1 Sepsis ve septik şok ile ilgili tanımlar.

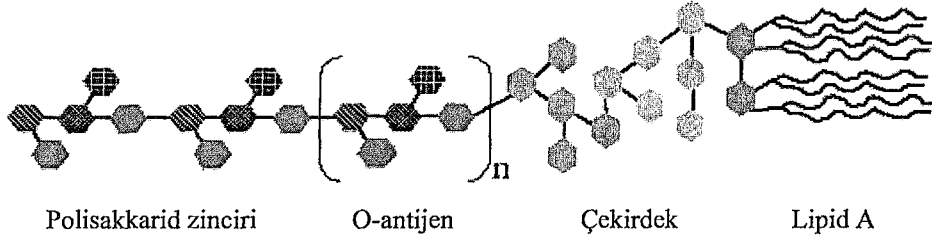
İnfeksiyon	Normalde steril olan konakçıda mikroorganizmanın varlığı veya mikroorganizmanın yayılmasına karşı verilen inflamatuvar yanıt ile karakterize mikrobiyal olay
Bakteriyemi	Kanda canlı bakteri bulunması
Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu	Şiddetli klinik belirtilerle kendini gösteren sistemik inflamatuvar yanıt. Sayılan durumlardan en az ikisi olmalı: Sıcaklık > 38° C veya < 36° C; kalp hızı > 90 atım/dk; solunum hızı ≥ 20 solunum/dk veya PaCO ₂ < 32 torr (< 4.3 kPa); lökosit > 12.000 hücre/mm ³ veya > %10 olgunlaşmamış hücre
Sepsis	İnfeksiyona verilen sistemik yanıt. İnfeksiyona yanıt olarak sayılan durumlardan en az ikisi olmalı: Sıcaklık > 38° C veya < 36° C; kalp hızı > 90 atım/dk; solunum hızı ≥ 20 solunum/dk veya PaCO ₂ < 32 torr (< 4.3 kPa); lökosit > 12.000 hücre/mm ³ veya > %10 olgunlaşmamış hücre
Şiddetli sepsis	Organ disfonksiyonu, hipoperfüzyon veya hipotansiyon ile birlikte olan sepsis. Hipoperfüzyon ve perfüzyon anormallikleri, her zaman değilse de, laktik asidoz, oligoüri veya mental durumda akut bir değişiklik ile birlikte görülebilir.
Septik şok	Yeterli sıvı resüsitasyonuna karşın hipotansiyon ve perfüzyon anormalliklerinin de birlikte olduğu sepsis. Her zaman değilse de, laktik asidoz, oligoüri veya mental durumda akut bir değişiklik ile birlikte görülebilir. İnotropik veya vazopresör ajanları kullanan hastalar perfüzyon anormalliklerinin ölçüldüğü sırada hipotansif olmayabilirler.
Hipotansiyon	Sistolik kan basıncının 90 mmHg'dan düşük olması veya hipotansiyona neden olabilecek bir durum yokken kan basıncında normalden 40 mmHg'den daha fazla bir azalma olması
Çoklu organ yetmezliği	Müdahale ile homeostazın sağlanamadığı hastalarda organ fonksiyonlarının değişmesi

Çizelge 52 numaralı kaynaktan alınarak tarafımızdan düzenlenmiştir.

2.1.2 Patofizyoloji

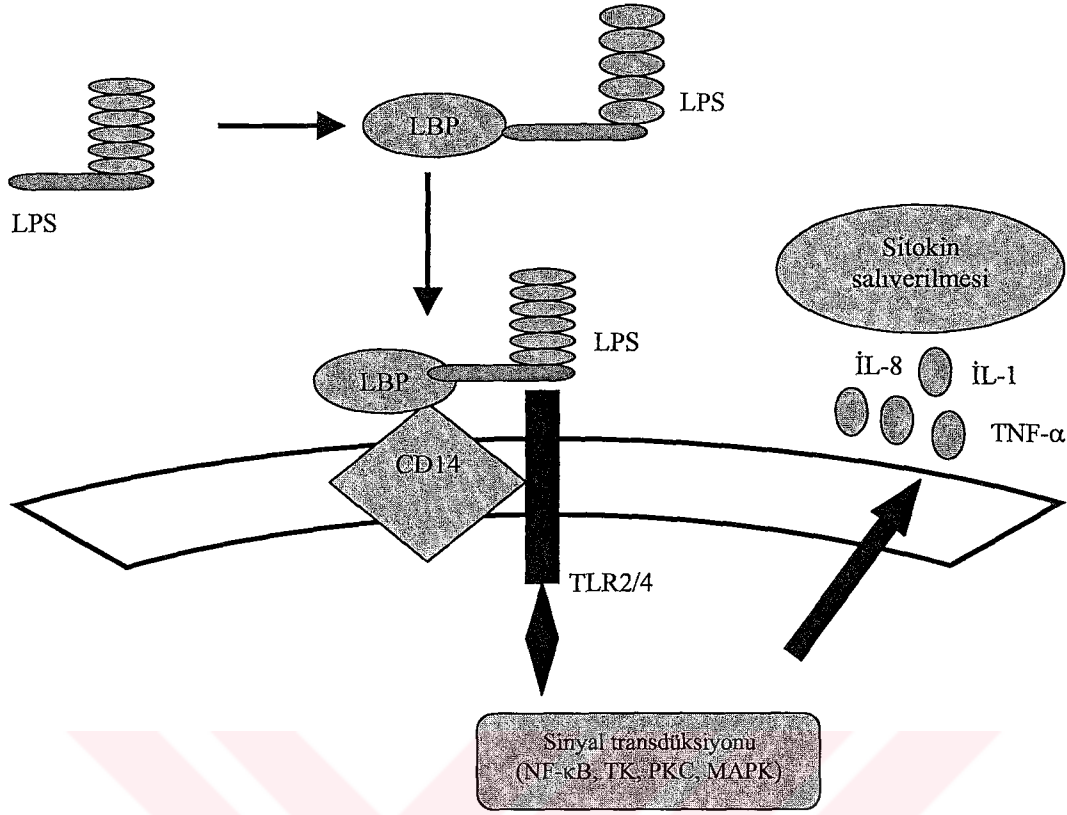
Septik şokta kalp atım hızı ve kalp debisi genelde artmaktadır. Sistemik damar direnci, arteriyel tonüsün azalmasından dolayı azalmış durumdadır, buna karşın pulmoner damar direnci artmıştır. Kalp debisindeki artışa karşın, doku hipoperfüzyonu, kanda laktat konsantrasyonunun artışı ile belgindir. Damar tonüsündeki azalmalar arteriyel ve venöz dolaşımı etkilemektedir. Arteriyel tonüs, sistemik hipotansiyona yol açacak kadar azalmıştır. Geniş kapasitans damarlarında tonüs azalmakta ve venöz göllenmeye neden olmaktadır. Arteriyel ve venöz tonüsteki değişiklikler damar yatakları arasında farklılaşmakta, bu da kan akımının ve hacminin eşit olmayan dağılımına neden olmaktadır. Hipovolemi, septik şoktaki başlıca hemodinamik değişikliklerdendir. Septik şoklu birçok hastada miyokardiyal disfonksiyon da görülmektedir (55). Sepsiste hücre içinde kalsiyum konsantrasyonunda belirgin bir artış olduğu bilinmesine karşın hiporeaktivite oluşmaktadır; bu durumda da kalsiyum duyarlılığında bir problem söz konusu olabilir (56).

Her ne kadar Gram (-) aerobik basilin endotoksini, bakteriyel toksinler arasında en iyi çalışılmış olanı da olsa diğer bakteriyel ürünler de mediyatör cevabı başlatabilmektedir. Bunlar formil peptidler, endotoksinler, proteazlar, hemolizin peptidoglikanlar ve Gram (+) organizmaların lipoteikoik asit (LTA)'larıdır. Lipopolisakkarit (LPS, endotoksin) sadece Gram (-) bakteride bulunmakta iken, LTA sadece Gram (+) bakterilerde bulunmaktadır. LPS molekülü üç farklı bölgeden oluşmaktadır. Dış kısmında bulunan O-antijen yapısının bakteri türlerine bağlı olarak antijenitesi bulunmaktadır. Orta kısımda yer alan çekirdek bölge daha az antijenik farklılık göstermektedir. En içteki bölgede lipid A yapısı bulunmaktadır (57) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Lipopolisakkaridin yapısı. Şekil 57 numaralı kaynaktan alınarak tarafımızdan düzenlenmiştir.

Lipid A, yüksek derecede immünreaktiftir ve Gram (-) sepsiste gözlenen toksik etkilerin birçoğundan sorumludur. Lipid A'nın başlıca etkisi, makrofajları aktive etmesi ve inflamatuvar olayları tetiklemesidir. Monositler, makrofajlar, nötrofiller ve endotel hücreleri enfeksiyona karşı yanıtta önemli rol oynarlar ve LPS için reseptörlere sahiptirler. LPS, "lipid bağlayıcı protein (LBP)" adı verilen yaklaşık 55 kDa molekül ağırlığında ve hepatositler tarafından sentezlenen bir protein ile etkileşmektedir. Bu kompleks daha sonra makrofaj yüzeyindeki LPS reseptörlerinden CD14 ile etkileşir. CD14'ün kendisi sinyal iletiyi başlatmamaktadır. LBP-LPS kompleksinin CD14'e bağlanması *Toll-like receptor* (TLR)'nin aktivasyonuna neden olmaktadır. TLR'nin aktivasyonunu takiben PKC ve NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin indüksiyonu gerçekleşmektedir (57-60) (Şekil 2.2)



Şekil 2.2 Lipopolisakkarit (LPS)'nin Toll-like receptor (TLR)'lerden TLR2/TLR4 reseptörleri aracılığı ile oluşan sinyal ileti yolu. CD, cluster of differentiation; İL, interlökin; LBP, LPS bağlayıcı protein; MAPK, mitojen ile aktive edilen protein kinaz; NF-κB, nükleer faktör-κB; PKC, protein kinaz C; TK, tirozin kinaz; TNF, tümör nekroze edici faktör. Şekil 57 numaralı kaynaktan alınarak tarafımızdan düzenlenmiştir.

CD14 ve TLR'ler bütün bakteriyi veya LPS gibi bakteriyel ürünleri farkedene ve bağlanan hücre yüzeyindeki reseptörlerdir. Monositler, makrofajlar, nötrofiller ve endotel hücrelerinde bulunan TLR4, LPS ile başlayan sinyal ileti mekanizmalarında yer almaktadır. CD14 reseptörlerinin membrana bağlı ve çözünebilir olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır ve her ikisi de LPS ile etkileşmektedir. Glikozil fosfotidilinozitolle bağlı hücre yüzey molekülü olan membrana bağlı CD14 monositler, makrofajlar ve nötrofillerde bulunmaktadır. CD14'ün plazmada bulunan çözünebilir şekli ise, insanları da içeren memelilerin serumunda mikromolar konsantrasyonda bulunmaktadır. Çözünebilir CD14 LPS ve diğer bakteriyel ligandlara bağlanmak ve endotel ve epitel hücreler gibi CD14 taşımayan hücrelerin aktivasyonuna aracılık etmektedir (61, 62).

LPS, makrofajlar gibi bazı hücrelere bağlanarak bu hücreleri aktive eder ve bu hücrelerden proinflamatuvar sitokinler TNF- α , İL-1 ve interferon (İFN)- γ 'nın salıverilmesine neden olur; birincil proinflamatuvar sitokinler TNF- α ve İL-1'dir (60). Bu sitokinler doğrudan organ fonksiyonunu etkileyebilirler ve dolaylı olarak yine proinflamatuvar aktivitesi olan İL-6, İL-8 ve tromboksan, lökotrien, trombosit aktive edici faktör (TAF), prostaglandinler, kompleman faktörleri gibi diğer ikincil mediyatörlerin de salıverilmesini aktive edebilirler. Makrofajlar tarafından üretilen inflamatuvar sitokinler daha sonra endotel hücreleri, lenfositler, hepatositler, nötrofiller ve trombositler gibi birçok hücreleri etkilerler (55, 57, 59, 60).

Bu sitokinlerin kendilerine özgü reseptörlerine bağlanması, intraselüler proteinin fosforilasyonuna neden olan tirozin kinaz ve ardından NF- κ B'nin aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktive olan NF- κ B çekirdeğe geçmeden önce inaktif durumda kalmasını sağlayan I κ B molekülünden ayrılır. Çekirdeğe geçen NF- κ B, iNOS geninin promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonu aktive eder. Bu şekilde oluşumu artan NO septik şok patojenezinde önemli rol oynamaktadır (63).

Septik şokun akut fazında endotelial NOS (eNOS) aktivasyonuna ve şokun ilerleyen fazında ise iNOS indüksiyonuna bağlı olarak artan NO oluşumu, septik şoklu insan ve hayvanlarda hipotansiyona önemli derecede katkıda bulunmaktadır (63, 30). Dolaşımdaki nitrit/nitrat düzeylerinin septik şoklu hastalarda artması, endotoksin veya proinflamatuvar sitokinlere bağlı olarak damar tonüsünün azalması da NO'nun septik şoktaki kardiyovasküler değişikliklerde rolü olduğunu düşündürmektedir (20). Septik şoklu insan ve hayvanlarda ayrıca noradrenalin, adrenalin, vazopressin, anjiyotensin II, serotonin, histamin, kalsiyum ve potasyum gibi ajanlara verilen vazokonstriktör yanıtlar azalmaktadır. Bu olay "vazopleji" olarak da adlandırılır ve septik şokta vazokonstriktör tedaviye karşı dirençli hipotansiyona neden olmaktadır. Endotoksin ile indüklenen ve α_1 -adrenerjik reseptör stimülasyonuna karşı oluşan vasküler hiporeaktivite endotoksin uygulamasının süresinin uzunluğuna bağlıdır ve kan hücreleri, plazma ile etkileşime gereksinim duymamaktadır (64).

Bakterisidal permeabilite artırıcı protein (*bactericidal permeability-increasing protein*; BPI) yaklaşık 50 kDa ağırlığında antimikrobiyal aktiviteye sahip bir proteindir (58). Nanomolar konsantrasyonlarda BPI, birçok Gram (-) bakteri için yüksek selektif sitotoksositeye sahiptir. BPI, LPS'nin lipid A bölgesine yüksek afinite ile bağlanır (65). Bu bağlanma, membranın dış kısmında permeabilitede artışa, bakteriyal fosfolipidlerin hidrolizine, hücre bölünmesinin inhibisyonuna ve bakterinin ölmesine neden olmaktadır (58).

Septik şok sırasında inflamatuvar yanıtı düzenlemek için antiinflamatuvar moleküller de salıverilmektedir (66, 67). Proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ve aktivasyonu, antiinflamatuvar sitokinler tarafından antagonize edilmektedir; çünkü, endotoksemi proinflamatuvar mediyatörlerin sentezini artırmakla kalmaz, ayrıca antiinflamatuvar sitokinlerin de gecikmiş üretimini ve salıverilmesini de artırır (68).

Ayrıca septik şokta oluşumu artan endojen kortikosteroidler ve katekolaminler de önemli antiinflamatuvar rol oynamaktadırlar. İL-10, İL-4, prostaglandin (PG)E₂, çözünebilir TNF- α reseptörleri ve İL-1-reseptör antagonisti de önemli antiinflamatuvar mediyatörler arasında yer almaktadırlar (55).

2.1.3 Tedavi

Sepsis tedavisinin başlıca hedefleri patojenin zamanında tanımlanması, infeksiyon kaynağının yok edilmesi, antimikrobiyal tedavi, septik şoka neden olabilecek olaylar zincirinin engellenmesi ve organ disfonksiyonunun düzeltilmesi şeklinde olmalıdır. Septik şok, yüksek kalp debisi ve sistemik damar direncinin düşmesi ile karakterizedir. Hastalar sistemik damar direncinin azalması sonucu hipotansif olabilirler ve anormal kan dağılımından dolayı doku perfüzyonlarında sorun olabilir. Septik şokun rutin tedavisi Çizelge 2.2'de verilmiştir (69-71).

Çizelge 2.2 Septik şokun rutin tedavisi.

Anormallik	Tedavi	Terapötik amaç
İnfeksiyon	Uygun antibiyotikler ve cerrahi drenaj (gerekliyse)	İnfeksiyonun uzaklaştırılması
Kardiyovasküler ve organ disfonksiyonu		
<i>Hipotansiyon</i>	Yoğun bakımda izleme, hacim ekspansiyonu, vazopresör ajanlar	Ortalama arteriyel kan basıncı en az 60 mm/Hg; pulmoner arter <i>wedge</i> basıncı 14-18 mm/Hg
<i>Doku hipofüzyonu</i>	Yoğun bakımda izleme, hacim ekspansiyonu, inotropik ajanlar, vazopresörler	Hemoglobin düzeyi 10 g/dl'nin üzerinde Oksijen saturasyonu %92'nin üzerinde Normal kan laktat konsantrasyonları Nonspesifik şokta kardiyak indeks 2.2 L/dk.m ² ve septik şokta 4.0 L/dk.m ² 'nin üzerinde
<i>Organ disfonksiyonu</i>	Yoğun bakımda izleme, hacim ekspansiyonu, inotropik ajanlar, vazopresörler	Normal değerler veya aşağıdaki sistemlerde disfonksiyonun düzeltilmesi: Renal (kan üre nitrojeni, serum kreatinini, üriner debi) Hepatik (serum bilirubini) Pulmoner (alveolar-arteriyel gradiyent) Kardiyovasküler (ortalama kan basıncı, kardiyak indeks) SSS (mental durum)

SSS, Santral sinir sistemi. Çizelge 69-71 numaralı kaynaklardan alınarak tarafımızdan düzenlenmiştir.

Septik şoklu hastaların yaklaşık yarısının ölüm nedeni çoklu organ yetmezliği olduğu için, hemodinamik destek oldukça önemlidir. Hemodinamik destek sıvı tedavisi, vazopresör tedavi ve inotropik tedavi olarak üç şekilde yapılabilir. Sıvı tedavisi tek başına kan basıncını ve organ perfüzyonunu düzeltemediği zaman dopamin, dobutamin, noradrenalin, adrenalin ve fenilefrin gibi vazopresör ve inotropik ajanlar kullanılmalıdır. Dopamin ve dobutamin gibi inotropik ajanlar kalp debisindeki bozukluğu genellikle düzeltirler; vazopresörler, ortalama kan basıncı inotropik tedaviye karşın düzelmiyorsa kullanılmalıdır (59, 72).

Noradrenalinin kan basıncı üzerindeki etkisini kalp debisi ve kalp hızında belirgin değişiklikler yapmadan oluşturduğundan, dopamine karşı takikardi ile cevap veren veya yüksek dozdaki dopamine yanıt vermeyen hastalarda, periferik damar yataklarında güçlü vazokonstriksiyon istenildiği zaman kullanılabilir (55, 59).

Sepsis ve ilgili durumların tedavisinde öngörülen yaklaşımlar Çizelge 2.3'te özetlenmiştir. Septik kaskadda yaklaşık 30-40 kadar farklı mediyatörün bulunması ve birbirleriyle etkileşmeleri nedeniyle, septik şokun tek bir ilaçla tedavisi olası gibi görünmemektedir; mediyatör veya zarar gören organa spesifik tedavi yaklaşımlarına gerek duyulmaktadır. Bu nedenle, bakteriyel bileşenler, konakçı kökenli inflamatuvar mediyatörler ve doku zedelenmesine neden olan mediyatörlere karşı uygulanacak uygun tedavi yaklaşımları, inflamatuvar yanıtı azaltarak, hemodinamik bozuklukları düzelterek, doku zedelenmesini ve organ yetmezliği gelişmesini önleyerek septik şok tedavisinde yarar sağlayabilecektir (73-75). Yeni tedavi yaklaşımları temeli bakteri toksinleri ve konakçıda salıverilen mediyatörlerin nötralize edilmesi yolu ile sendromün ilerleyişini durdurmak veya yavaşlatmak esasına dayanır. Bu amaçlar ile yapılan çalışmalarda, bakteri toksinleri (endotoksin), TNF ve İL-1 gibi inflamatuvar yanıtta rol oynayan sitokinler, nötrofil gibi inflamatuvar hücreler, NO, TAF ve bradikinin gibi inflamatuvar yanıtta rol oynayan mediyatörler üzerinde durulmaktadır (54, 57). Sepsis ve septik şok patojenezindeki tek bir yolu hedefleyen antikor tedavisi genellikle etkisiz kalmaktadır. Sitokinler ve sepsiste salıverilen diğer mediyatörler hücresel hedeflerini çabuk bir şekilde etkiledikleri için immünoterapi, erken veya yüksek risk altındaki kişilere profilaktik olarak uygulanmalıdır (68).

2.2 G Proteini ile Kenetli Reseptörler

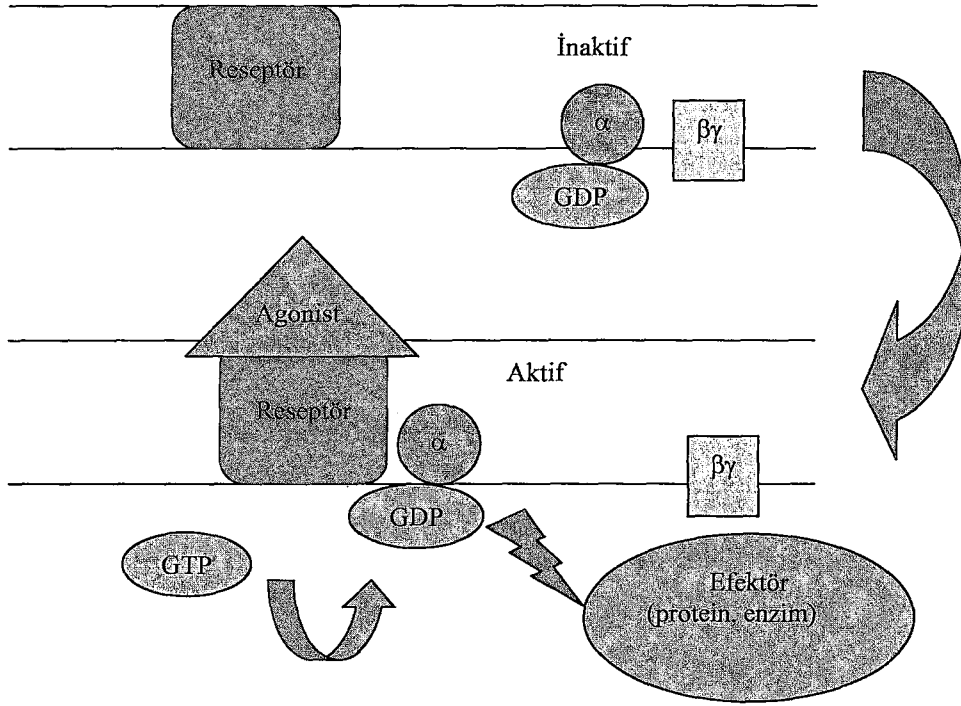
Hücre dışından gelen mesajlar hücre içi yapılara çeşitli reseptörler aracılığı ile iletilirler. Bu reseptörlerin arasında G proteini ile kenetli reseptör (GPKR)'ler, tirozin kinaz reseptörleri, kinazlar ile aktive edilen sitokin reseptörleri ve steroid/tiroid hormon reseptör aileleri bulunmaktadır (16). Hücre membranını 7 kez geçen 7 transmembranal protein ailesine ait olan GPKR'ler etkilerini guanin nükleotidi bağlayan ve α , β ve γ alt birimlerinden oluşan *guanosine 5'-triphosphate* (GTP) bağlayıcı protein (G proteini) aracılığı ile gösterirler (76). GPKR'ler, enzim ya da iyon kanalı gibi plazma membranındaki hedef proteinlerin aktivitelerini dolaylı olarak düzenleyebilirler. Hedef proteinin aktivasyonu, eğer hedef protein bir enzim ise bir ya da daha fazla hücre içi mediyatörlerin konsantrasyonlarını, eğer hedef protein bir iyon kanalı ise plazma

Çizelge 2.3 Sepsis ve ilgili durumların tedavisinde öngörülen yaklaşımlar.

Monoklonal antikorlar	Lipoksijenaz inhibitörleri	MX-1 (C5 blokörü)
<i>Endotoksin</i>	NOS inhibitörleri	C1 inhibitör
<i>Ekzotoksin</i>	Reseptör antagonistleri	Diğer terapiler
<i>TNF-α</i>	<i>TNF-α</i>	<i>Antifungal imidazoller</i>
<i>İL-1</i>	<i>İL-1</i>	<i>Gut dekontaminasyonu</i>
<i>FLA₂</i>	<i>TAF</i>	<i>Antihistaminikler</i>
<i>C5a</i>	<i>TxA₂</i>	<i>TRH</i>
<i>Adezyon molekülleri</i>	<i>Bradikinin</i>	<i>Glukagon</i>
<i>Kontakt faktörleri</i>	<i>PGE₂, PGI₂</i>	<i>Sümfaktan</i>
<i>Antitrombin III</i>	PARS inhibitörleri	<i>Kalsiyum pompa</i>
<i>Protein C</i>	Nötrofil inhibitörleri	<i>aktivatörleri</i>
<i>Trombomodulin</i>	<i>Pentoksifilin</i>	<i>Kalsiyum kanal blokörleri</i>
<i>Hirudin</i>	<i>Adenozin</i>	<i>Büyüme faktörleri</i>
<i>Aprotinin</i>	<i>Dapson</i>	<i>Büyüme hormonu</i>
<i>Soya fasülyesi tripsin inhibitörü</i>	<i>Antioksidanlar</i>	<i>Nalokson</i>
<i>Plazminojen aktivatörleri</i>	<i>Ağır metal şelatörleri</i>	<i>Melatonin</i>
<i>Arakidonik asit inhibitörleri</i>	<i>Oksijen radikal kovucuları</i>	<i>N-asetilsistein</i>
<i>Siklooksijenaz inhibitörleri</i>	<i>Proteaz inhibitörleri</i>	
<i>Tromboksan sentaz inhibitörleri</i>		

FLA, fosfolipaz A; İL, interlökin; TAF, trombosit aktive edici faktör; PARS, poli(ADP-riboz) sentaz; PG, prostaglandin; NOS, nitrik oksit sentaz; TRH, tirotropin salgılatıcı hormon (thyrothropin releasing hormone); TNF, tümör nekroze edici faktör; Tx, tromboksan. Çizelge 73-75 numaralı kaynaklardan alınarak tarafımızdan düzenlenmiştir.

membranının iyon geçirgenliğini değiştirebilmektedir. GPKR'ler, hormonlar, nörotransmitterler ve lokal mediyatörler gibi birçok molekülün etkilerine aracılık etmektedirler. Hücre dışı sinyal molekülleri GPKR'lere bağlandıkları zaman, reseptörler G proteinlerini aktive edecek şekilde konformasyonel değişikliğe uğrarlar. Uyarılmamış durumda, α alt birimine *guanosine 5'-diphosphate* (GDP) bağlı haldedir ve G proteini inaktiftir. G proteini α alt birimi, aktive edilmiş reseptör tarafından uyarıldığında kendisine bağlı olan GDP'nin ayrılmasına ve onun yerine GTP'nin bağlanmasına yardım eder. Bu değişim α , β ve γ alt birimlerinden oluşan üçlü yapının α alt ünitesi ve $\beta\gamma$ kompleksi olarak iki farklı aktive edilmiş yapıya ayrılmasına neden olmaktadır. Bu yapıların hedefleri plazma membranındaki iyon kanalları ya da enzimler olabilmektedir (77-80) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Heterotrimerik G proteinin aktivasyonu ile ilgili olaylar. *GDP*, Guanosine 5'-diphosphate; *GTP*, guanosine 5'-triphosphate. Şekil 78-80 numaralı kaynaklardan alınarak tarafımızdan düzenlenmiştir.

Günümüzde G proteinlerinin 17 α , 5 β ve 12 γ alt birimi olduğu bilinmektedir. G proteinin α alt birimi yaklaşık 39-45 kDa, β alt birimi 37 kDa ve daha küçük olan γ alt birimi ise yaklaşık 8 kDa molekül ağırlığındadırlar. G proteinleri α ve γ alt birimlerindeki lipofilik kuyruklar ile hücre membranının iç yüzüne kenetlidirler. Genel olarak G proteinleri, α alt birimlerinin efektör yapılar ile etkileşmelerine göre tanımlanmaktadır (81).

G proteini ile kenetli reseptör tipleri ve efektör makromoleküller üzerindeki etkileri Çizelge 2.4'te gösterilmiştir. İlk G protein α alt ünitesi α_s olarak tanımlanmıştır. α_s içeren G proteinine G_s denilmektedir ve adenilil siklaz enziminin stimüle edilmesinden sorumludur (80, 82).

Çizelge 2.4 G proteini ile kenetli reseptör tipleri ve ve efektör makromoleküller üzerindeki etkileri.

Reseptör Tipi	Aracı G Proteini	Efektör Makromolekül
Muskarinik (M ₁ , M ₃ , M ₅) Adrenerjik (α ₁) Serotonin (5-HT ₂)	Gα _q	FLC ↑ → IP ₃ ↑, DAG ↑
Dopamin (D ₁) Serotonin (5-HT ₄) Adrenerjik (β ₁ , β ₂) Histamin	Gα _s	Adenilil siklaz ↑ → siklik AMP ↑
Muskarinik (M ₂ , M ₄) Adrenerjik (α ₂) Serotonin (5-HT ₁) Dopamin (D ₂)	Gα _i	Adenilil siklaz ↓ → siklik AMP ↓
Koku reseptörü	G _{olf}	Adenilil siklaz ↑ → siklik AMP ↑
Işık reseptörü	G _{i1,2}	Siklik GMP fosfodiesteraz ↑ → siklik GMP ↓
Adrenerjik (α ₁)	Gα _{12/13}	Rho proteini aktivasyonu

AMP, Adenosine monophosphate; DAG, diaçilgliserol; FLC, fosfolipaz C; GMP, guanosine 5'-monophosphate; IP₃, inositol-1,4,5-triphosphate; 5-HT, 5-hidroksitriptamin. Çizelge 80 ve 82 numaralı kaynaklardan alınarak tarafımızdan düzenlenmiştir.

G_i ise adenilil siklaz enziminin inhibisyonundan sorumlu olan G proteindir. İnhibisyon α alt ünitesi aracılığı ile olmaktadır. G_i, rodopsinin ışık ile aktivasyonunu takiben fosfodiesterazın stimüle edilmesinden sorumlu olan retinal G proteindir. G_q ve G₁₁ birbirleri ile yakın ilişkili olan ve α alt üniteleri FLC enzimini stimüle eden G proteinleridir (83).

α₁-adrenerjik reseptörler, G proteinlerinden G_q ile kenetlidirler. FLC_β aracılığı ile membran fosfolipidlerinin hidrolizine ve böylece DAG ve IP₃ oluşumuna neden olurlar. Bunlar da hücre içi kalsiyum düzeylerini artırarak ve PKC aktivasyonuna neden olarak düz kas kasılmasını gerçekleştirirler (84). α₁-adrenerjik reseptörlerin G_q ile kenetlenmelerinin dışında, G_s ile hücre içi siklik *adenosine monophosphate* (siklik AMP) düzeylerini artırmak için de kenetlendikleri bildirilmiştir (85). Sıçan aortunda α₁-adrenerjik reseptörlerin α_{1a}-, α_{1b}- ve α_{1d}- alt tipleri bulunmaktadır (86-88). Sıçan aort düz kas hücrelerinde α_{1d}- alt tipi, α₁'lerin yaklaşık %70-80'nini oluşturmaktadırlar. Noradrenalin ile oluşan hızlı ve geçici ERK1/2 aktivasyonunun, α_{1d}-adrenerjik

reseptöre bağımlı bir şekilde olduğu bildirilmiştir (89); sıçan aortundaki kasılmalarda α_{1d} -adrenerjik reseptörler majör rol oynamaktadır (90).

G_0 , adenilil siklaz enzimini inhibe etmeyen ve voltaja bağımlı kalsiyum kanallarının düzenlenmesinde rol alan G proteindir (83).

G proteinlerinin α ve $\beta\gamma$ alt birimleri adenilil ve guanilil siklazlar, fosfodiesterazlar, FLA_2 , FLC ve fosfoinositid-3-kinazları içeren efektör molekülleri stimüle ettikleri gibi siklik AMP, siklik *guanosine 5'-monophosphate* (siklik GMP), DAG, IP_3 , *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate* (PIP_3), arakidonik asit ve fosfatidik asit gibi ikincil habercilerin üretimini de aktive ya da inhibe edebilirler. Yine bu alt birimler, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artma ile çeşitli iyon kanallarının açılma ya da kapanmasını tetikleyebilirler (91). GPKR aracılığı ile etkilerini oluşturan birçok kimyasal mediyatör arasında çeşitli iyonlar, pürinler, peptid hormonlar, nöropeptidler, amino asitler, monoaminler, kemokinler, proteazlar ve glikoprotein hormonlar gibi kimyasal haberciler bulunmaktadır (83).

Her ne kadar klasik modellere göre, GPKR'lerin monomerler şeklinde fonksiyonu olduğu ileri sürülse de, son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar GPKR'lerin dimerik ya da oligomerik kompleksler halinde olabileceğini düşündürmektedir. GPKR dimerleri, endoplazmik retikulumda ya da hücre yüzeyinde bulunabilirler; reseptörler endoplazmik retikulumda dimerik ya da multimerik birimler halinde bulunabilirler ve hücre yüzeyine oligomerik diziler halinde taşınabilirler ya da reseptörler monomerler şeklinde sentez edilmiş olabilirler ve agonist bağımlı olarak dimerler ya da oligomerler şeklinde hücre yüzeyine taşınabilirler (92).

GPKR üç farklı yol ile desensitize edilebilmektedir. Birinci yol olan reseptör inaktivasyonunda, GPKR'ler G proteinleri ile daha fazla etkileşemedikleri için değişirler. İkinci yol olan reseptör sekestrasyonunda reseptörler hücre içine geçici olarak geçebilirler, böylece ligandları ile daha fazla yaklaşamazlar. Üçüncü yolda hücre içine alınan reseptörler lizozimler içinde yok edilebilirler. GPKR aracılığı ile olan cevaplar sinyal iletisine neden olan ligand uzaklaşınca geriye dönmektedir. Bu olay ise

G proteinin α alt biriminin, GTP'yi GDP'ye hidroliz ederek kendini inaktive etmesi, IP_3 'ün, fosfataz enzimi tarafından defosforile edilmesi, siklik nükleotidlerin fosfodiesterazlar tarafından hidroliz edilmesi, kalsiyumun hızla sitozolden dışarı pompalanması ve fosforile edilen proteinlerin protein fosfatazlar ile defosforile edilmesi aracılığı ile olmaktadır (77).

Her bir GPKR'nin birden fazla sayıda sitoplazmik sinyal ileti yolunu stimüle ettiği düşünülmektedir. Bu yolların stimülasyonu da birçoğu çekirdeğe geçerek çekirdekdeki proteinleri fosforilleyen ve gen ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici molekülleri etkileyen, MAPK aktivasyonuna neden olmaktadır. Sonuç olarak, genotipik farklılaşma, hücre yaşaması ya da ölümü, hipertrofi, normal ve anormal hücre büyümesini içeren biyolojik olaylar, reseptör ekspresyon düzeylerine ve sinyal molekülleri ile reseptör arası spesifikliğe bağlı olarak gerçekleşmektedir (91).

GPKR'ler hücre proliferasyonu, farklılaşması ve çeşitli hücre içi kinaz yollarının aktivasyonunu içeren çeşitli yanıtları indükleyebilirler. ERK1/2, SAPK/JNK) ve p38 kinazı içeren MAPK'ler G proteinleri aracılığı ile sinyal iletilirler. Büyüme faktörleri, forbol esterleri ve hormonlar, MAPK'leri fosforilasyon olayları aracılığı ile düzenlemektedirler. Ancak, son zamanlarda hem tirozin kinaz reseptörleri, hem de GPKR'lerin MAPK yolunun aktivasyonunda ortak biyokimyasal bileşenleri olduğu gösterilmiştir (93). GPKR'ler, MAPK aktivasyonunu G_i ya da G_q ile ilişkili yolları kullanarak gerçekleştirebilmektedirler. G_q ile kenetli reseptörler için PKC'ye bağımlı ve bağımsız yolların olduğu bildirilmiştir (94). PKC'ye bağımlı yolda G_q proteinin α alt birimi FLC'yi aktive ederek DAG ve IP_3 oluşumuna neden olmaktadır. DAG, MAPK yolunu aktive edecek olan PKC'yi aktive ederken IP_3 hücre içi kalsiyum düzeylerini artırır ve ERK1/2'nin aktivasyonuna katkıda bulunur (16). G_i ile kenetli reseptörler için MAPK'nin aktivasyonunun çoğunlukla PKC'den bağımsız olduğu gösterilmiştir (95).

2.3 Mitojen ile Aktive Edilen Protein Kinaz (MAPK)'ler

MAPK'ler, serin/treonin protein kinaz ailesine ait olan ve hücre proliferasyonu, farklılaşması, hayatta kalma ve apoptozis gibi önemli olayların kontrolünde yer alan enzimlerdir. Konakçının endotoksin, stres (oksidan stres, *heat shock*, ozmotik şok veya iyonize edici radyasyon gibi), büyüme faktörleri ve mitojenler gibi faktörlere maruz kalması ile tetiklenen olaylar sonucunda oluşumları artan proinflamatuvar sitokinler (TNF- α gibi), MAPKKK (Raf, B-Raf, MLK'ler, TAK, ASK1, MEKK1-4), MAPKK (MEK1/2, MKK 3-7) ve MAPK (ERK1, -2 ve -5, p38 MAPK, SAPK/JNK)'lerin bulunduğu sinyal ileti yollarını uyararak, MAPK'lerin hücre çekirdeğine lokalizasyonuna ve burada çeşitli apoptozis genlerini regüle eden spesifik transkripsiyon genlerinin fosforilasyonuna neden olmaktadır. Günümüzde memeli hücrelerinde, MAPKKK'lerin 14, MAPKK'lerin 7 ve MAPK'lerin ise 12 farklı varyantı olduğu bilinmektedir (96).

GPKR ERK'ler, JNK'ler ve p38 MAPK'ler gibi MAPK'leri aktive ederek hücrede çeşitli biyolojik yanıtlara neden olmaktadır. MAPK'ler büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler, radyasyon, ısı şoku, ozmotik dengesizlik, DNA hasarı ve LPS gibi bakteriyel ürünler ile aktive edilebilmektedirler. Bu uyaranlara karşı cevap olarak MAPK'ler aktive olarak çeşitli enzimlerin gen ekspresyonu ve hücre metabolizmasının kontrolünde görev alırlar. MAPK aktivasyonu kalsiyuma bağımlı veya kalsiyumdan bağımsız bir şekilde gerçekleşebilmektedir (97).

ERK aktivasyonu, birçok G proteini ile kenetli reseptörlerin stimülasyonu ile olduğu gibi çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerle de olmaktadır. ERK'nin LPS ile aktivasyonu, Raf-1'e bağımlı ve bağımsız bir şekilde olabilmektedir. Raf-1'e bağımlı yolda Ras tarafından aktive edilen Raf-1, MAPK/ERK kinaz 1 (MEK1) ve MAPK/ERK kinaz 2 (MEK2)'yi fosforile etmektedir. ERK1/2 ise MEK1/2 tarafından aktive edilmektedir. Raf-1'e alternatif yol ise, PKC'nin MAPKK'lerin MEK alt grubunu aktive etmesi aracılığı ile olmaktadır. *N-Methyl-4-(2-cyanophenyl)piperazinyl-3-methylbenzamide* (PD98059) ve *1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]*

butadien (U0126) gibi spesifik MEK1/2 inhibitörleri ERK1/2 sinyal ileti yolunu inaktive eden bileşikler geliştirilmiştir (97, 98).

MAPK'ler tüm ökaryotlarda üçlü kinaz düzenleyici yolda yer almaktadırlar. Bu üçlü kinaz yolunda MAPK'ler, MAPKK'ler tarafından tirozin ve treonin kalıntıları üzerinden fosforillenerek aktive olurlar. MAPKK'ler ise, MAPKKK'ler olarak adlandırılan bir grup serin/treonin kinazlar tarafından fosforillenerek aktive olurlar (96). Bu üçlü kinaz düzenleyici yol, sadece sinyali hedef efektörlere ulaştırmakla kalmaz, ayrıca paralel sinyal ileti yollarından gelen bilgiyi koordine ederek sinyalin amplifikasyonuna da neden olmaktadır. MAPK aktivasyonunun gerçekleşmesi için hem treonin hem de tirozin yapılarının fosforillenmesi gerekmektedir. Her iki bölgeden de fosfatın çeşitli fosfataz enzimleri ile uzaklaştırılması ile MAPK'lerin inaktivasyonu gerçekleştirilir (12).

MAPK'ler ile damar düz kas kasılması arasında bir ilişki olduğu da düşünülmektedir. Noradrenalin ile α_1 -adrenerjik reseptör stimülasyonunun zamana bağımlı olarak ERK1/2 fosforilasyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (99). Kalsiyum ile oluşturulan LC_{20} fosforilasyonundan bağımsız bir şekilde oluşan düz kas kasılmasında, ERK aktivasyonu ile kasılma arasında bir ilişki olduğu ve bu ilişkinin kaldezmone fosforilasyonu aracılığı ile olabileceği gösterilmiştir. Yine ayrıca MAPK fosforilasyonunun kalsiyumdan bağımsız mekanizmalarda yer alarak düz kas kasılmasının oluşturulmasından daha çok, damar tonüsünün korunmasında rolü olduğu ileri sürülmüştür (41). MAPK'lerin düz kasta kalsiyum sensitizasyonunda rolü olabileceği söylenmektedir (100). ERK1/2 tarafından kaldezmone proteinin fosforilasyonunun, damar düz kasında kasılmanın devamlılığına katkıda bulunduğunu ileri süren başka çalışmalar da bulunmaktadır (101).

2.4 Sitozolik Fosfolipaz A₂ (Sitozolik FLA₂)

FLA₂ enzimleri, fosfolipid *sn*-2 ester bağının hidrolizini katalizleyen ve serbest yağ asidi ile lizofosfolipid yapılarını oluşturan enzim ailesine aittirler. FLA₂ enzimleri 4

farklı gruba ayrılırlar: (1) 14 kDa molekül ağırlığında olan ve katalizör olarak kalsiyuma ihtiyaç duyan sekretuar FLA₂ (*secretory* FLA₂, sFLA₂), (2) 85 kDa molekül ağırlığında olan kalsiyuma duyarlı sitozolik FLA₂ (*cytosolic* FLA₂, cFLA₂), (3) 29-85 kDa arasında molekül ağırlığına sahip olan kalsiyumdan bağımsız olan intraselüler FLA₂ (*intracellular* FLA₂, iFLA₂) ve (4) kalsiyumdan bağımsız olan ve lipid mediyatörü olan TAF ve okside fosfolipidleri hidroliz eden TAF asetilhidrolazlardır (102-104) (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5 Memeli fosfolipaz A₂ (FLA₂) enzimlerinin özellikleri.

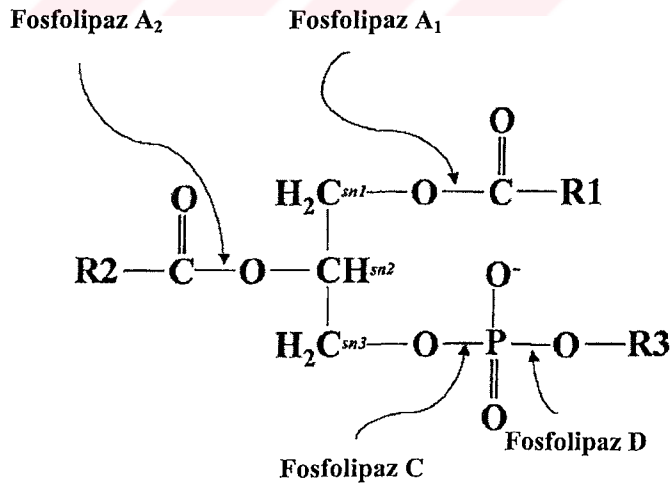
Enzim	Molekül Ağırlığı (kDa)	Dokularda Dağılım	Kalsiyuma Gereksinim	sn-2 spesifitesi	Düzenlenmesi
Sitozolik FLA ₂	85	Damar düz kası kalp, akciğer, nötrofil, makrofaj, endotel hücreleri	nM-µM	Arakidonik asit	Fosforilasyon, kalsiyum
İntraselüler FLA ₂	85	Kalp, damar düz kası, makrofaj, lenfosit	Yok	Yok	Bilinmiyor
Sekretuar FLA ₂	14	Kalp, lökosit, trombosit, mast hücreleri	mM	Yok	Transkripsiyonel

Çizelge 103 ve 104 numaralı kaynaklardan alınarak tarafımızdan düzenlenmiştir.

Sitozolik FLA₂'nin molekül ağırlıkları sırası ile 85, 110 ve 60 kDa olan α, β ve γ olmak üzere üç izomeri bulunmaktadır (105-107). Trombositler, makrofajlar, nötrofiller, endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, alveoler epitel hücreleri, böbrek mezangiyal hücreleri ve keratonositler gibi birçok farklı hücre tipleri sitozolik FLA₂ eksprese ederler. Büyüme faktörleri, mitojenler, vazoaktif peptitler, sitokinler, interferonlar gibi bazı ekstraselüler uyarıların sitozolik FLA₂'yi aktive edebildiği gibi, oksidasyon, hiperglisemi, ultraviyole ışığı ve sürtünme stresi gibi reseptör aracılıksız etki eden stres uyaranları da sitozolik FLA₂ aktivasyonunu başlatabilmektedir (102). Makrofaj benzeri hücreler, hem TAF tarafından indüklenen çabuk yanıt, hem de LPS tarafından indüklenen gecikmiş cevap oluştururlar. TAF, FLA₂'nin hızlı aktivasyonuna neden

olurken, LPS hücreleri öncelikli olarak yeni protein efektörlerini sentez etmek aracılığı ile indükler. Her iki durumda da en önemli olay, hücre içinde sitozolik FLA₂α enziminin translokasyonu ve aktivasyonudur (108).

Sitozolik FLA₂α enzimi, arakidonik asit içeren fosfolipidlerin özellikle *sn*-2 konumundaki arakidonik aside spesifite gösterirken, diğer FLA₂ izoformlarında bu şekilde bir özellik söz konusu değildir (Şekil 2.4) (103, 109). Hücre sitozolünde bulunan sitozolik FLA₂, proinflamatuvar uyarı ile MAPK aktivasyonu ve kalsiyum artışı takiben aktive olmaktadır (103, 104, 109, 110). Hücre içinde kalsiyum artışı, sitozolik FLA₂α'nın sitozolden siklooksijenaz (COX) ve 5-lipoksijenaz (5-LO) enzimlerinin bulunduğu endoplazmik retikulum ve nükleer membranlara transloke olmasını sağlamaktadır. Reseptörlere ligand bağlanması ile aktive edilen MAPK'ler sitozolik FLA₂α'yı *serine* (Ser)⁵⁰⁵ ve Ser⁷²⁷ üzerinden sırası ile fosforile ederek hücre içinde transloke olmasını sağlamaktadırlar. Hücre kültürü ve *in vitro* kinaz eseyleri ile yapılan çalışmalar, sitozolik FLA₂'nin ERK2 olarak da bilinen p42 MAPK için substrat olduğunu da göstermektedir (102). Son zamanlarda sitozolik FLA₂α'nın ayrıca KaMKII tarafından da Ser⁵¹⁵ üzerinden fosforile edilerek membrana transloke olduğu gösterilmiştir (103).



Şekil 2.4 Fosfolipazların etki yerleri. Şekil 109 numaralı kaynaktan alınarak tarafımızdan düzenlenmiştir.

2.5 Nitrik Oksit (NO)

NO, suda çözünebilir, stabil, renksiz bir gazdır. Sulu çözeltideki yarılanma ömrü 0.1-10 saniye kadardır. Farklı hücre tipleri tarafından sentezlenen NO'nun otokrin ya da parakrin hücrel mediyatör olarak fonksiyonu bulunmaktadır. NO, yaklaşık 140 kDa molekül ağırlığında, CYP redüktaz enzimine benzerlik gösteren kompleks bir enzim olan NOS enzimi tarafından sentezlenmektedir. NOS enziminin nöronal NOS (nNOS, NOS I), eNOS (NOS III) ve iNOS (NOS II) olmak üzere üç farklı izoformu bulunmaktadır. nNOS ve eNOS'un ikisi yapısal NOS (yNOS)'u oluşturan yapısal enzimlerdir; iNOS ise çeşitli uyarılar ile indüklenebilmektedir. NOS substrat olarak yarı esansiyel bir amino asit olan L-arjinini kullanır ve ürün olarak NO ile L-sitrülin oluşur. Bu olayda oksijen ve *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (indirgenmiş şekil; NADPH) ise yardımcı faktörlerdir. Flavin adenin dinükleotid (FAD) ve flavin mononükleotid (FMN), NO sentezi için ayrıca yardımcı faktörlerdendir. yNOS ve iNOS enzimleri arasında bazı önemli farklılıklar bulunmaktadır. Öncelikle yNOS'un aktivitesi hücre içine kalsiyum girişine bağlı iken, iNOS aktivitesinin sağlanması için dinlenme durumundaki hücrelerde hücre içi kalsiyum düzeyleri yeterlidir. yNOS aktivitesi, hücre içinde kalsiyum konsantrasyonu artışı ile tetiklendiğinden aktivitesi geçicidir ve pikomolar düzeyinde düşük NO oluşumuna neden olur. Tersine, iNOS aktivitesi birkaç gün boyunca devam eder ve daha büyük miktarlarda (nanomolar düzeyde) NO oluşumuna neden olmaktadır. Kalsiyuma bağımlı yNOS ile oluşan az miktardaki NO, nörotransmisyon ve vazodilatasyon gibi çeşitli fizyolojik olaylarda rol alır. iNOS ise akciğer, trombositler ve ince bağırsak hücreleri gibi bazı hücre tiplerinde eksprese edilmesine karşın normalde inaktiftir. Ancak, bazı hücreler LPS, TNF, İFN- γ , İL-1 β , -2 ve -6 gibi spesifik proinflamatuvar ajanlar tarafından aktive edildiklerinde iNOS aktivitesi indüklenmektedir (20, 111-113) (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6 Memeli nitrik oksit sentaz (NOS) izoformlarının özellikleri.

Yapısal ve Enzimatik Özellikler	nNOS	eNOS	iNOS
Molekül Ağırlığı	160 kDa	135 kDa Yapısal	125-130 kDa İndüklenebilir
İndüklenebilirlik	Yapısal		
Kofaktörler	BH ₄ , FAD, FMN, Hem, Zn	BH ₄ , FAD, FMN, Hem, Zn	BH ₄ , FAD, FMN, Hem, Zn
Substratlar	L-Arjinin, NADPH, oksijen	L-Arjinin, NADPH, oksijen	L-Arjinin, NADPH, oksijen
Protein varyasyonu	Dokuya spesifik μ, α, β ve γ izoformları	---	---
Süperoksit oluşturma kaynakları	Hem domain, redüktaz domain	Genellikle Hem domain	Genellikle redüktaz domain
Majör fizyolojik fonksiyonu	Nörotransmisyon	Vazodilatasyon	Sitotoksisite
Patofizyolojik olaylardaki rolü	Müsküler distrofi, iskemi reperfüzyon	Endotelial disfonksiyon, hiperkolesterolemi, hipertansiyon	İnflamasyon, toksik şok

BH₄, Tetrahidrobipyoterin; eNOS, endotelial NOS; FAD, flavin adenin dinükleotid; FMN, flavin adenin mononükleotid; iNOS, indüklenebilir NOS; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (indirgenmiş şekil); nNOS, nöronal NOS. Çizelge 112 ve 113 numaralı kaynaklardan alınarak tarafımızdan düzenlenmiştir.

Bu enzimlerin hücre içi dağılımları da farklılık göstermektedir. yNOS hücre membranında bulunurken, iNOS sitozolik bir enzimdir. NO'nun birçok etkisi, siklik GMP üreten ve çözünebilir hem grubu taşıyan bir enzim olan guanilil siklaz enzimi aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Siklik GMP oluşumunun artışı, hücre içi kalsiyum düzeyinin azalmasına neden olacak hücre içi olaylar zincirinin tetiklenmesine neden olmaktadır. Siklik GMP'in aracılık ettiği olaylar vazodilatasyon, miyokard kasının gevşemesi ve trombosit agregasyonunun inhibisyonudur. NO, ayrıca süperoksit anyonu ile etkileşerek nükleik asitler, lipidler ve proteinler üzerinde toksik etkileri olan potent bir oksidan olan peroksinitriti (ONOO⁻) oluşturur. NO serbest oksijen radikali olması nedeni ile yüksek derecede reaktiftir ve çeşitli yapılar ile etkileşebilmektedir. Kanda NO hızlı bir şekilde nitrit ve nitrata metabolize olmaktadır. Kandaki NO'nun asıl dayanıklı olan metaboliti nitrattır. NO, ayrıca amino asit ve proteinlerdeki tiyol (-SH) grupları ile

de etkileşmektedir ve nitrozotiyol (-S-NO) bileşikleri şeklinde depolanabilmektedir. NO'nun ayrıca serbest oksijen radikalleri de etkileşebilme özelliğinden dolayı, serbest radikal yakalayıcısı ve dolayısı ile hücre koruyucusu olduğu düşünülmektedir. Peroksinitrit ve onun parçalanma ürünleri ise lipid peroksidasyonu, farklı moleküllerin nitrolizasyonuna veya sodyum kanal inaktivasyonuna neden olarak hücre hasarına yol açabilir. NO'nun bazal oluşumu arterlerde venlere oranla ve küçük damarlarda büyük damarlara oranla daha fazladır. NO salınması asetilkolin, bradikinin, histamin, adenin nükleotidleri ve serotonin gibi reseptöre bağımlı ve serbest yağ asitleri gibi reseptörden bağımsız agonistler ile stimüle edilebilir (20, 114).

NO'nun ikinci büyük etkisi trombositler ve lökositler üzerindedir. NO, trombosit agregasyonu, adezyonu ve aktivasyonunu azaltır (115-117). NO'nun, inflamasyon sırasında oluşan vazodilatasyon, değişen damar geçirgenliği, lökosit göçü ve aktivasyonunda rolü olduğu düşünülmektedir. iNOS endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, makrofajlar ve farklı parenkimal hücreler tarafından eksprese ve aktive edilmektedir. LPS ve İFN- γ ile uyarılan makrofajlar iNOS mRNA'sını 2 saat, proteinini ise 4 saat sonra eksprese ettikleri gösterilmiştir (114).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Deney Hayvanı ve Doku

Deneylerde 200-300 g ağırlığında erkek ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda senkronize edilen Wistar Kyoto sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nden temin edilmişlerdir.

ME.Ü. Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 31.03.2003 tarihli toplantısında, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda, gerçekleştirilmesinde sakınca olmadığına dair ön onay verilmiştir.

Doku olarak aort kullanılmıştır.

3.1.2 Vasküler Kontraktilite Çalışmaları

Vasküler kontraktilite çalışmalarında izometrik gerim ölçümleri için miyograf (Tissue Bath Myograph, Model 700MO, Danish Myo Technology A/S, Danimarka; Commat Ltd., Türkiye), bilgisayar kontrollü özel kaydedici sistem (MP30 Hardware Unit ve Student Lab Software, Biopac Systems Inc., A.B.D.; Commat İletişim Ltd., Türkiye) ve %95 O₂ ve %5 CO₂ içeren gaz karışım tüpü kullanılmıştır.

3.1.3 Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Doku homojenatlarının hazırlanması için homojenizatör (Ultra-Turrax T8, IKA-WERKE GmbH & Co. KG, Almanya) ve santrifüj (Centrifuge Minispin, Becton Dickston, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.4 Doku Homojenatlarında Protein Ölçümü

Doku homojenatlarında protein ölçümü için düz tabanlı, 96 kuyucuklu kültür plakları (Greiner, Almanya) ve kültür plağı spektrofotometrik okuyucusu (Organon Teknika Microwell System, Hollanda) kullanılmıştır.

3.1.5 Doku Homojenatlarında Nitrit Ölçümü

Doku homojenatlarında nitrit ölçümü için düz tabanlı, 96 kuyucuklu kültür plakları (Greiner, Almanya) ve kültür plağı spektrofotometrik okuyucusu (Organon Teknika Microwell System, Hollanda) kullanılmıştır.

3.1.6 Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları

3.1.6.1 Vasküler Kontraktilite Çalışmaları

Krebs-Henseleit çözeltisinin bileşimi şu şekildedir (mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂.2H₂O 1.2, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄.7H₂O 1.2, NaHCO₃ 15, Glukoz.H₂O 11) (Merck; Sigma) (118). Krebs-Henseleit çözeltisi için maddeler deney günü belirtilen miktarlarda tartılarak distile suda çözülmüşlerdir.

Deneylerde ayrıca noradrenalin hidroklorür (Sigma), fenilefrin hidroklorür (Sigma), asetilkolin hidroklorür (Sigma), gliseril trinitrat (GTN) (Adeka), endotoksin (*E. coli* lipopolisakkaridi, 0111:B4) (Sigma), *phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide* (1,3-PBIT) dihidrobromür (Sigma), metilarakidonil florofosfonat (MAFF) (Sigma) ve U0126 (Tocris) kullanılmıştır.

Noradrenalin hidroklorürün %0.1 askorbik asit içeren 0.01 N HCl çözeltisi, fenilefrin, asetilkolin, 1,3-PBIT ve endotoksinin ise distile su ile stok çözeltileri hazırlanmış ve -20° C'de saklanmıştır; maddelerin stok çözeltilerinden dilüsyonları distile su ile yapılmıştır. MAFF'nin metil asetat içindeki stok çözeltisi -20° C'de saklanmış ve dilüsyonları distile su ile yapılmıştır. U0126'nın dimetilsülfoksit (DMSO) (%99.5, a/h) (Riedel-de Haën) ile hazırlanan stok çözeltisi -20° C'de saklanmış ve dilüsyonları DMSO ile yapılmıştır. GTN'nin stok çözeltisi (10 mg/10 ml) olarak ampülün kendisi kullanılmıştır. Maddelerin istenen konsantrasyonlardaki dilüsyonları deneyden hemen önce yapılmıştır.

3.1.6.2 Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Doku homojenatlarının hazırlanmasında kullanılan fosfat tamponu çözeltisinin bileşimi şu şekildedir (g/L): NaCl 8.0; KCl 0.2; Na₂HPO₄ 1.4; KH₂PO₄ 0.2) (Merck) (119). Deney günü maddeler belirtilen miktarlarda tartılarak distile suda çözülmüşlerdir.

3.1.6.3 Doku Homojenatlarında Protein Ölçümü

Doku homojenatlarında protein ölçümü için sığır serum albumini (*bovine serum albumin*, BSA) protein standard solüsyonu (Sigma) ve Bradford reajanı (Sigma) kullanılmıştır.

3.1.6.4 Doku Homojenatlarında Nitrit Ölçümü

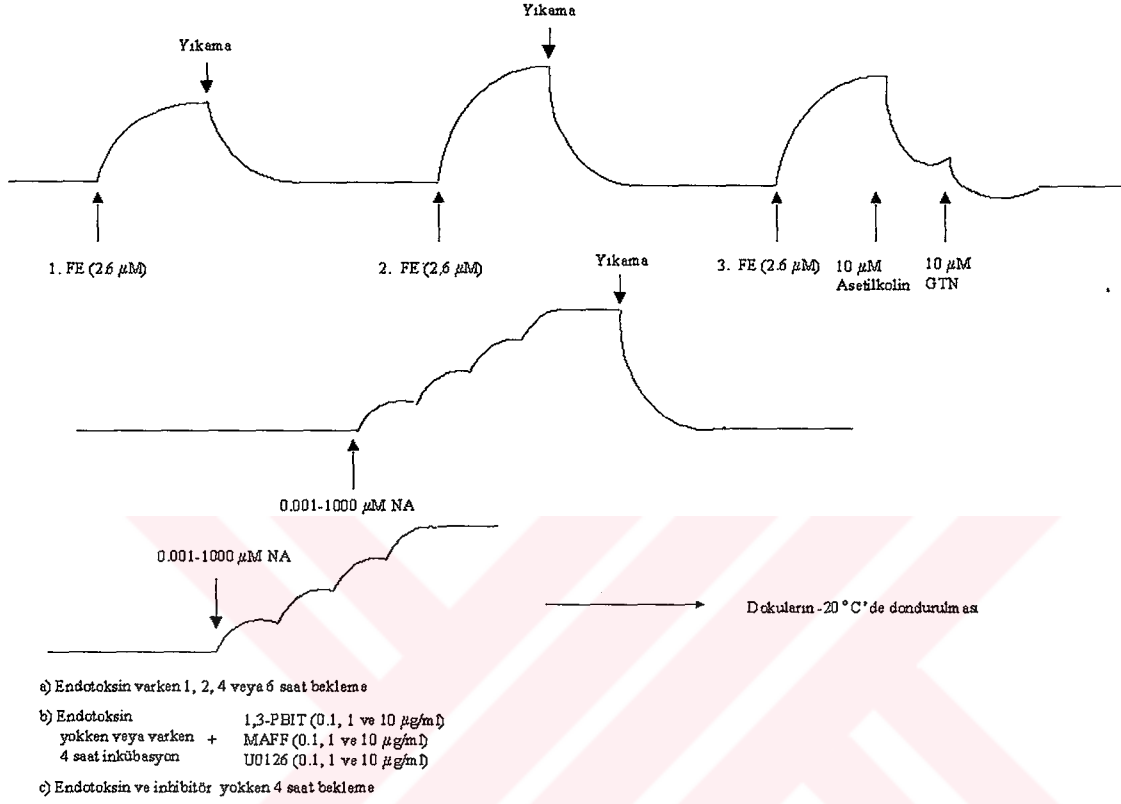
Doku homojenatlarında nitrit ölçümü için sodyum nitrit (Sigma), orto-fosforik asit (H_3PO_4) (Merck), N-1-naftiletilediamin dihidroklorür (NED) (Merck) ve sülfanilamid (Merck) kullanılmıştır. Sodyum nitrit, distile su içinde çözülmüştür. Fosforik asitin %85'lik çözeltisinden distile su ile %2.5'lik çözeltisi hazırlanmış ve +4° C'de saklanmıştır. Sülfanilamid (%1) ve NED (%0.1), %2.5'lik fosforik asit içinde çözülerek hazırlanmıştır. Çözeltiler ölçümden hemen önce hazırlanmışlardır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Sıçan Torasik Aorta Halkalarının İzolasyonu ve Deneye Hazırlanması

Sıçanlar hızlı bir şekilde başlarına vurulup sersemletildikten sonra karotis arterleri kesilerek öldürülmüşlerdir. Torasik aorta, aort yayından başlanarak izole edilmiştir. Daha sonra içerisinde Krebs-Henseleit çözeltisi bulunan petri kabına alınarak çevre dokularından temizlenmiştir. 2-3 mm eninde ve halka şeklinde torasik aorta preparatları hazırlanmıştır. Dokular her biri 250 μm kalınlığında paslanmaz çelikten yapılmış teller arasına yerleştirilerek içinde 37° C'de Krebs-Henseleit çözeltisi bulunan ve %95 O_2 ve %5 CO_2 gaz karışımı ile havalandırılan 6 ml hacimde banyo içeren miyografa yerleştirilmiştir. Daha sonra uygulanan deney protokolü Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Dokular 1.5 g ön-gerim altında her 15 dakikada bir ortam çözeltisi değiştirilerek ve gerim kontrol edilerek dengelenmeye bırakılmıştır. 1.5 saat sonra dengelenen dokulara α -adrenerjik reseptör agonisti olan fenilefrin submaksimal konsantrasyonda 2.6 μM (EC_{85} , $2.6 \pm 0.3 \mu M$, $n= 22$) (118) üç kez uygulanmıştır. Fenilefrin ile alınan birinci, ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları tek-yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldığında aralarında farklılık olduğu görülmüştür ($F= 24.76$, $P < 0.0001$). İstatistiksel analizler tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak yapıldığında, birinci kasılma yanıtları (2.32 ± 0.06 g, $n= 132$), ikinci (2.79 ± 0.07 g, $n= 132$) ve üçüncü (2.94 ± 0.07 g, $n= 132$)

kasılma yanıtlarından farklıyken ($P < 0.001$), ikinci ve üçüncü kasılma yanıtları arasında fark yoktur ($P > 0.05$). Bu bulgulara göre, üçüncü kez fenilefrin uygulanan dokuların stabilize olduğu kabul edilmiştir.



Şekil 3.1 Vasküler kontraktilite çalışmalarında uygulanan deney protokolü. 1,3-PBIT, *phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide*; FE, Fenilefrin; GTN, gliseril trinitrat; MAFF, metilarakidonil florofofanat; NA, noradrenalin; U0126, 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien.

Dengelenen dokuların fenilefrin (2.6 µM) ile önceden kastırılmasını takiben, endotel hücrelerinde muskarinik M_3 -reseptörlerin uyarılması sonucunda NOS aracılığı ile oluşan NO'nun salıverilmesine bağlı olarak gevşeme oluşturan bir madde olan asetilkolin (10 µM) uygulanarak endotel tabakasının sağlam olup olmadığı kontrol edilmiştir (118, 120). Asetilkolin 2.00 ± 0.06 g ($n=132$) gevşeme oluşturmuştur. Fenilefrin ile oluşan kasılmanın %'si olarak hesaplandığında, asetilkolin ile oluşan 69 ± 1 ($n=132$) oranındaki gevşeme yanıtı, çalışılan torasik aort preparatlarının endotel tabakasının sağlam olduğunu ve endotelial NO aracılıklı düz kas gevşemelerinde bir sorun olmadığını göstermektedir.

Dokuların fenilefrin ile önceden kastırılması ve asetilkolin uygulamasının ardından, damar düz kas hücrelerinde NO veya bir NO türevine (S-nitrozotiyol) dönüşerek guanilil siklaz aktivasyonu sonucunda artan siklik GMP aracılığı ile endotelden bağımsız bir şekilde gevşeme oluşturan bir madde olan GTN (10 μ M) uygulanarak düz kasın gevşeme fonksiyonu test edilmiştir (121, 122). GTN 2.58 ± 0.07 g (n= 119) gevşeme oluşturmuştur. Fenilefrin ile oluşan kasılmanın %'si olarak hesaplandığında, GTN ile oluşan 89 ± 1 (n= 119) oranındaki gevşeme yanıtı, çalışılan torasik aorta preparatlarının, endotelial NO'dan bağımsız bir şekilde gelişen düz kas gevşemelerinde bir sorun olmadığını göstermektedir.

Krebs-Henseleit çözeltisi ile yıkanarak başlangıç ön-gerimine ulaşan dokularda noradrenalin (0.001-1000 μ M) ile kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrileri çıkarılmıştır (kontrol). Sıçan torasik aorta preparatlarının 100 μ g/ml konsantrasyonda endotoksin ile 5-24 saat inkübasyonu sonrasında α -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılmaların azaldığı ve aynı zamanda iNOS aktivitesi ve NO oluşumunun arttığı gösterildiğinden (123-126), dokularda iNOS indüksiyonu için endotoksin 100 μ g/ml konsantrasyonda kullanılmıştır. Noradrenalin ile kontrol konsantrasyon-yanıt eğrilerinin alınmasının ardından, noradrenalin ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra dokular 100 μ g/ml endotoksin ile 1, 2, 4 veya 6 saat inkübe edilmesinin ardından noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrileri tekrarlanmıştır. Yapılan ön deneylerde, endotoksin ile 4 saat inkübe edilen torasik aorta preparatlarında, noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC_{50} değerinin (6.20 ± 1.16 μ M, n= 7) kontrol grubu değerine (2.77 ± 0.84 μ M, n= 7) göre daha fazla ($P = 0.0085$), E_{maks} değerinin ise daha az olduğu görülmüştür (kontrol $E_{maks} = 3.80 \pm 0.31$ g, n= 7; endotoksin $E_{maks} = 3.02 \pm 0.35$ g, n= 7) ($P = 0.0089$). Diğer yandan, dokuların gerek 4 saat bekleme öncesinde (EC_{50} 0.52 ± 0.16 μ M; E_{maks} 3.13 ± 0.32 g, n= 4), gerekse sonrasında (EC_{50} 0.86 ± 0.38 μ M; E_{maks} 2.75 ± 0.16 g, n= 4) elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC_{50} ve E_{maks} değerleri arasında da fark olmadığı görüldüğünden ($P > 0.05$), dokuların 4 saat organ banyosunda beklemesi ile α -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarının değişmediği kabul edilmiştir.

Çeşitli enzim inhibitörleri kullanılarak yapılan daha sonraki deneylerde, dokuların ortamda endotoksin (100 μ g/ml) ve/veya 1,3-PBIT (selektif iNOS inhibitörü)

(0.1, 1 ve 10 µg/ml; 0.23, 2.30 ve 23 µM), MAFF (selektif sitozolik FLA₂ inhibitörü) (0.1, 1 ve 10 µg/ml; 0.27, 2.70 ve 27 µM) ve U0126 (selektif MEK1/2 inhibitörü) (0.1, 1 ve 10 µg/ml; 0.23, 2.34 ve 23.44 µM) varken 4 saat inkübasyonunun ardından noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrileri tekrarlanmıştır.

Deneyler sonunda banyodan alınan dokular, homojenatlarda protein ve nitrit ölçümü için, Eppendorf tüplerde ve -20° C'de dondurularak saklanmıştır.

3.2.2 Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Doku homojenatlarının hazırlanması Tunçtan ve ark.'nın (127) tanımladığı yönteme göre yapılmıştır. Dondurulmuş dokular çözündükten sonra tartılmış ve üzerine 0.5 ml fosfat tamponu ilave edilerek homojenize edilmiştir. Homojenatlar Eppendorf tüplere aktararak 12.100 x g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar Eppendorf tüplere alınarak, ölçüm yapıncaya kadar +4° C'de saklanmıştır.

3.2.3 Doku Homojenatlarında Protein Ölçümü

Doku homojenatlarındaki protein miktarı *Coomassie blue* (Bradford) yöntemi ile ölçülmüştür (119, 128). Standart olarak kullanılacak BSA'nın %0.1 (a/h) şeklinde distile suda hazırlanan stok çözeltisinden, 0-50 µl BSA içeren seri dilüsyonları (0-50 µg/ml) hazırlanmış ve toplam hacimleri distile su ile 800 µl'ye ayarlanmıştır. Aynı şekilde, 5 µl doku homojenatı üzerine 795 µl distile su ilave edilerek 800 µl hacimde çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler üzerine 200 µl Bradford reajanı ilave edilmiş, bu çözeltilerden alınan 100 µl örnek (aynı örnekten 2 kez olmak üzere) kültür plağına aktarılmış ve örneklerin verdikleri absorbanlar, kültür plağı okuyucuda, 620 nm'de okunmuştur. BSA konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorbanlardan yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, BSA'nın kalibrasyon doğru denklemleri belirlenmiştir.

Bu denklemlerden yararlanılarak, örneklerde okunan absorbans değerlerinden protein miktarları bulunmuştur. Sonuçlar mg/ml/g doku olarak ifade edilmiştir.

3.2.4 Doku Homojenatlarında Nitrit Ölçümü ve iNOS Aktivitesinin Hesaplanması

Doku homojenatlarındaki nitrit konsantrasyonu, nitrit iyonlarına duyarlı olan Griess reaksiyonu temeline dayanan diazotizasyon yöntemi ile ölçülmüştür (119). Standart olarak kullanılacak sodyum nitritin 2 mM şeklinde distile suda hazırlanan stok çözeltisinden, distile su ile 1 ml hacimde seri dilüsyonları (0.25-100 μ M) hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden ya da homojenatlardan alınan 50 μ l örnek (aynı örnekten 2 kez olmak üzere) 25 μ l sülfanilamid ve 25 μ l NED ile kültür plağında karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika bekleyen örneklerin verdikleri absorbanlar, kültür plağı okuyucuda 540 nm'de okunmuştur. Sodyum nitrit konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorbanlardan yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, sodyum nitritin kalibrasyon doğru denklemleri belirlenmiştir. Bu denklemlerden yararlanılarak, örneklerde okunan absorbans değerlerinden nitrit miktarları bulunmuştur. Sonuçlar μ M olarak ifade edilmiştir.

iNOS aktivitesi, her bir sıçandan elde edilen doku için ölçülen nitrit konsantrasyonlarının, aynı madde uygulanan dokulara ait protein ortalama \pm standart hata değerine oranlanarak hesaplanmıştır. Sonuçlar μ mol/mg protein/g doku olarak ifade edilmiştir.

3.2.5 Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama \pm standart hata şeklinde gösterilmiştir. Farklı sıçanlardan hazırlanan preparat sayısı n ile ifade edilmiştir. Asetilkolin ve GTN ile oluşan gevşemeler, fenilefrin ile elde edilen maksimum kasılmanın %'si olarak hesaplanmıştır. Endotoksin ve/veya 1,3-PBIT, MAFF, veya U0126 varlığında elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinde noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtları gram

cinsinden ifade edilmiştir. Doğrusal olmayan regresyon yöntemi ile EC_{50} ve E_{maks} değerleri hesaplanmıştır. İstatiksel karşılaştırmalar tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi ile Student's t testi kullanılarak yapılmıştır. İstatiksel olarak 0.05'ten küçük P değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Gruplar içerisinde olan uç değerler Grubbs's testi sonuçlarına göre değerlendirmeye alınmamıştır (129). İstatistiksel analizler için GraphPad Prism (V.3.00, 1994-1999) ve GraphPad InStat (V2.04a, 1990-1993) paket programları kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1 Vasküler Kontraktilite Çalışmaları

4.1.1 Ortamda Endotoksin Yokken ve Varken Noradrenalin ile Elde Edilen Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri, EC_{50} ve E_{maks} Değerleri

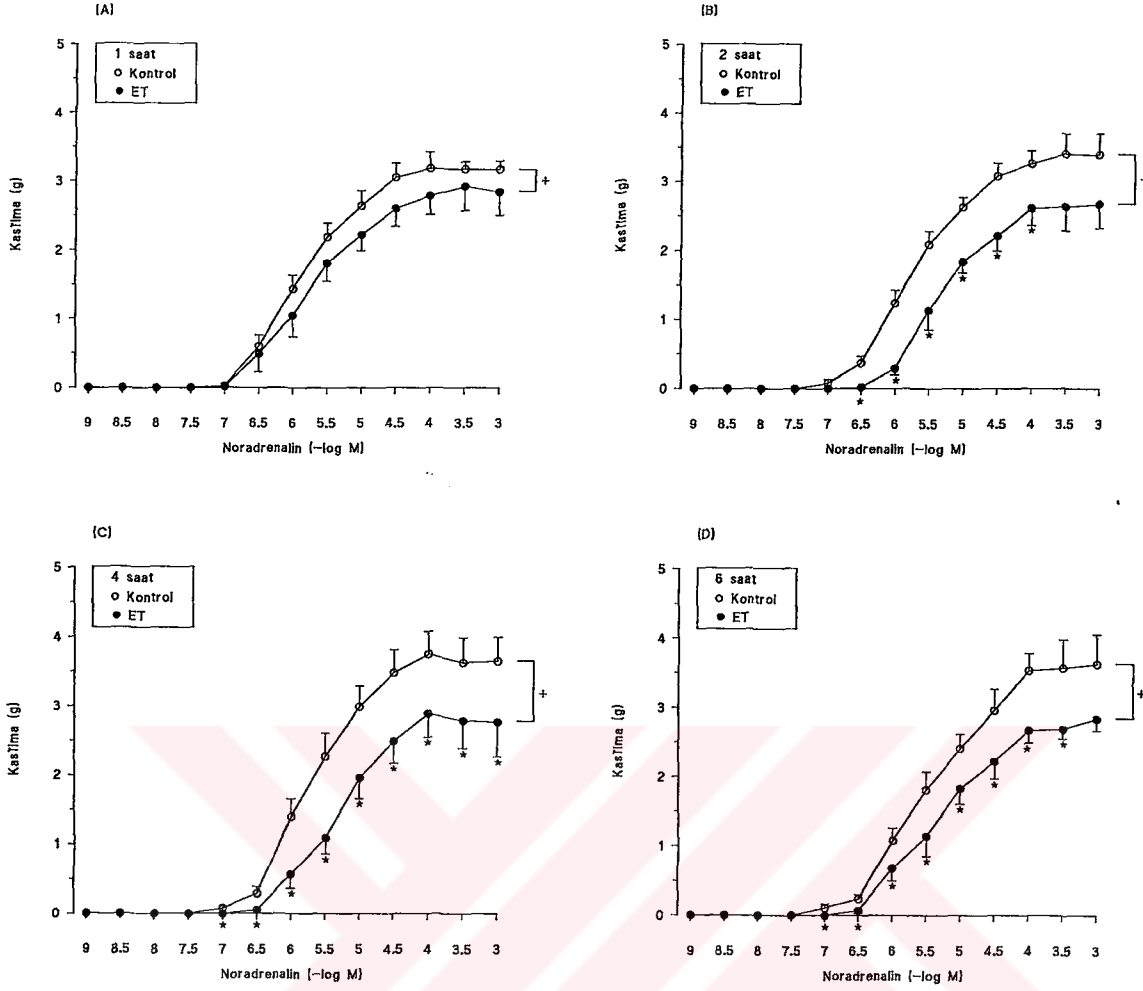
Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri

Sıçan izole torasik aortunda, dokuların ortamda endotoksin yokken ve varken 1, 2, 4 ve 6 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları Şekil 4.1'de verilmiştir.

Noradrenalin 0.001-1000 μ M konsantrasyon aralığında, konsantrasyona bağımlı bir şekilde kasılma oluşturmuştur. Dokuların 1, 2, 4 ve 6 saat süre ile endotoksin ile inkübasyonunun, noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinde meydana getirdiği değişiklikler tek-yönlü varyans analizi kullanılarak analiz edildiğinde kontrol grubundan farklıdır (1 saat: $F= 48.72$, $P < 0.0001$; 2 saat: $F= 70.69$, $P < 0.0001$; 4 saat: $F= 40.11$, $P < 0.0001$; 6 saat: $F= 55.65$, $P < 0.0001$). Kontrol ve endotoksin grupları tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak karşılaştırıldığında, endotoksin uygulanması 1. saatte bir fark oluşturmazken ($P > 0.05$), 2. saat (0.3-100 μ M), 4. saat (0.1-1000 μ M) ve 6. saatte (0.1-300 μ M) noradrenalin ile oluşan kasılma yanıtları azalmıştır ($P < 0.05$).

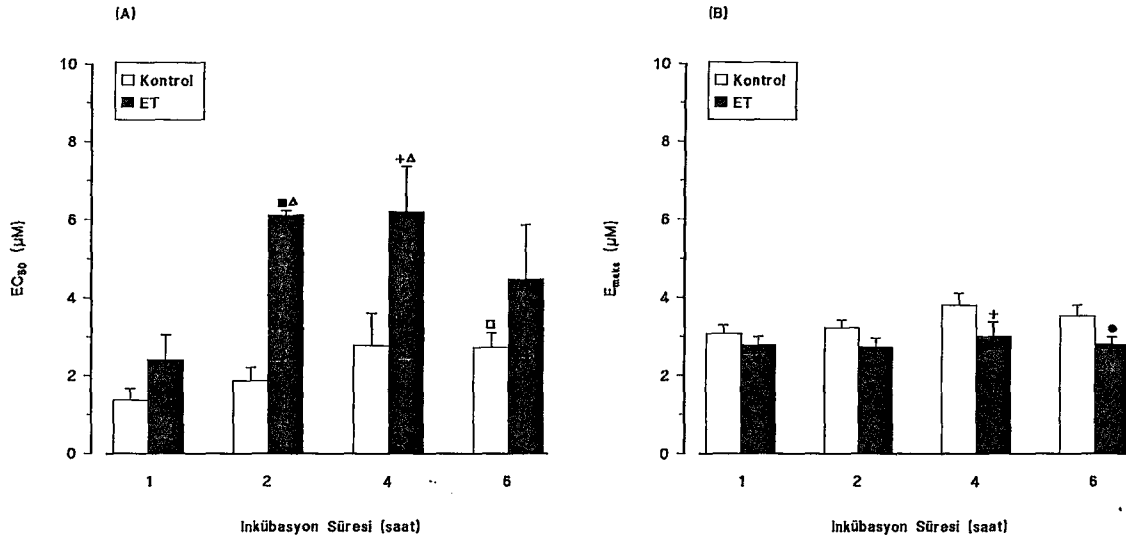
EC_{50} ve E_{maks} Değerleri

Noradrenalin ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC_{50} ve E_{maks} değerleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Sıçan izole torasik aortunda, dokuların inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (ET) (100 µg/ml) ile (A) 1, (B) 2, (C) 4 ve (D) 6 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları. *Kasılma yanıtları gram cinsinden ve ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n= 7-8. + Tek-yönlü varyans analizi (P < 0.0001) ve * tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi ile karşılaştırıldığında kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*

Dokuların endotoksin ile 2 saat inkübasyonu ile elde edilen EC_{50} değerleri, gerek 2 saat inkübasyon öncesi gerekse endotoksin ile 1 saat inkübasyon sonucunda elde edilen değerlerden daha fazladır (*P* değerleri sırası ile 0.0091 ve 0.0152) (Şekil 4.2A). Diğer yandan, kontrol ve endotoksin ile 1 ve 2 saat inkübe edilen dokular birbiri ile karşılaştırıldığında, E_{maks} değerleri, endotoksin uygulanan dokularda kontrol grubu değerlerine göre daha az olmakla birlikte, aralarındaki fark anlamlı değildir (*P* > 0.05) (Şekil 4.2B).



Şekil 4.2 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ile (A) 1, (B) 2, (C) 4 ve (D) 6 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden elde edilen kasılma yanıtlarından hesaplanan (A) EC₅₀ ve (B) E_{max} değerleri. ET, Endotoksin. EC₅₀ değerleri µM ve E_{max} değerleri g cinsinden ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n= 7-8. + 4. Saat kontrol (Student-t testi; P < 0.05), □ 1. saat kontrol, ■ 2. saat kontrol, ● 6. saat kontrol ve Δ 1. saat endotoksin grubu değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 0.05).

Dokuların endotoksin ile 4 saat inkübasyonu ile elde edilen EC₅₀ değeri, gerek 4 saat inkübasyon öncesi, gerekse endotoksin ile 1 saat inkübasyon sonucunda elde edilen değerlerden daha fazladır (P değerleri sırası ile 0.0465 ve 0.0141) (Şekil 4.2A). Dokuların ortamda endotoksin yokken (EC₅₀ 2.77±0.84 µM, n= 7) ve varken (EC₅₀ 6.20±1.16 µM, n= 7) 4 saat süre ile inkübasyonu sonrasında elde edilen EC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında, endotoksin uygulanan dokularda EC₅₀ değeri daha fazladır (P= 0.0085) (Şekil 4.2A). Dokuların endotoksin ile 4 saat inkübasyonu ile elde edilen E_{max} değeri ise, 4 saat inkübasyon öncesinde elde edilen değerden daha azdır (kontrol E_{max}= 3.80±0.31 g, n= 7; endotoksin E_{max}= 3.02±0.35 g, n= 7) (P= 0.0089) (Şekil 4.2A).

Dokuların endotoksin ile 6 saat inkübasyonu ile elde edilen EC₅₀ değeri, gerek 6 saat inkübasyon öncesi, gerekse endotoksin ile 1 saat inkübasyon sonucunda elde edilen değerlerden daha fazla ve 2 ve 4 saat inkübasyon sonrasında elde edilen değerlerden daha az olmasına karşın, aralarındaki fark anlamlı değildir (P > 0.05) (Şekil 4.2A). Dokuların ortamda endotoksin yokken 6 saat inkübasyonu sonrasında elde edilen EC₅₀ değeri, 1 saat inkübasyon sonrasında elde edilen değerden daha fazladır (P < 0.05).

Diğer yandan, dokuların endotoksin ile 6 saat inkübasyon öncesinde elde edilen E_{maks} değeri ile karşılaştırıldığında, endotoksin E_{maks} değerinde azalmaya neden olmuştur ($P=0.0034$) (Şekil 4.2B).

Bu bulgular, endotoksin ile 4 saat inkübe edilen torasik aorta preparatlarında, noradrenalin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin hem sağa kaydığını ve hem de kasılma yanıtlarında azalma olduğunu göstermektedir.

4.1.2 Ortamda Endotoksin Yokken ve Varken Noradrenalin ile Elde Edilen Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri, EC_{50} ve E_{maks} Değerleri Üzerinde 1,3-PBIT'nin Etkisi

Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri

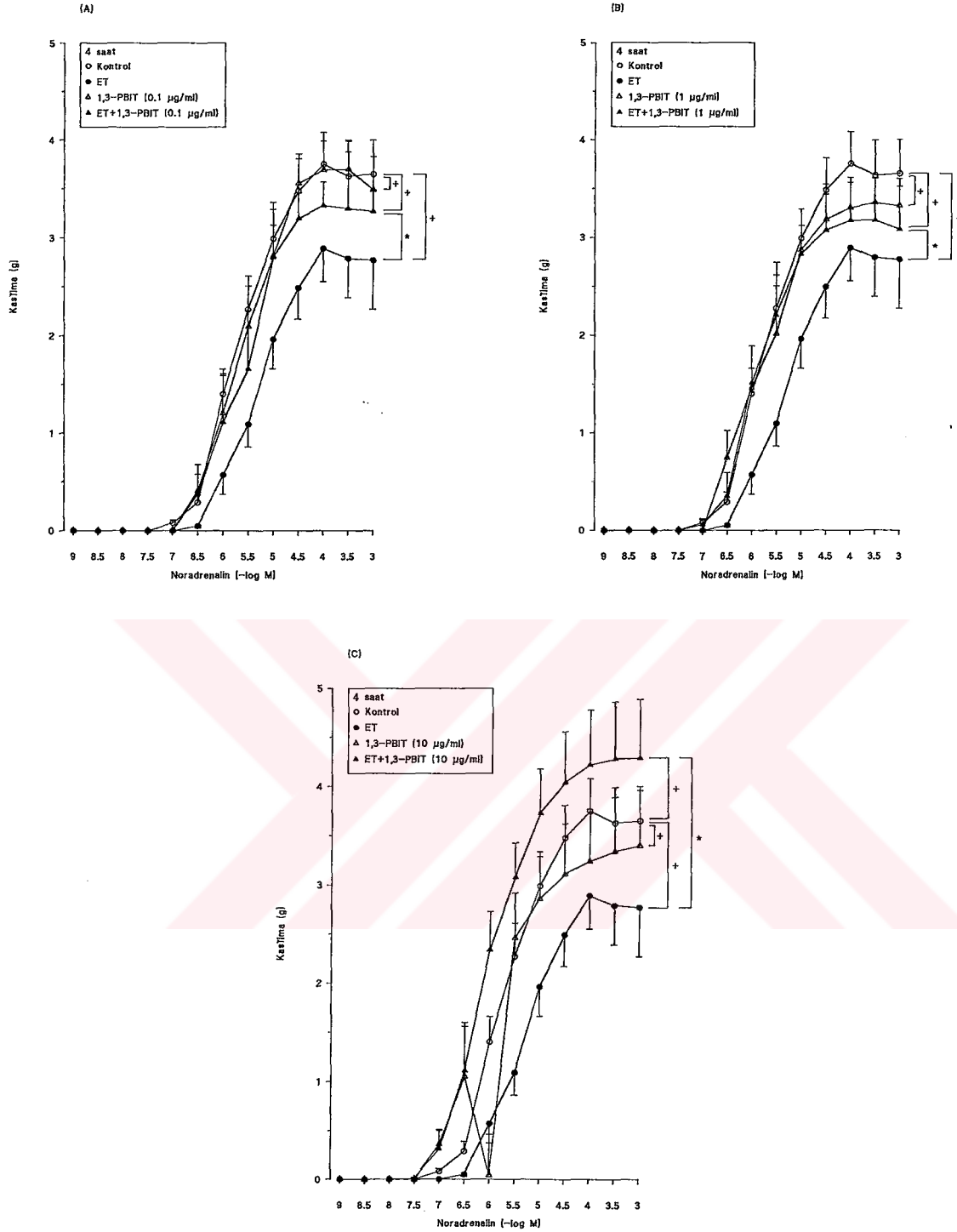
Torasik aorta preparatlarının ortamda endotoksin yokken ve varken selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT (0.1, 1 ve 10 $\mu\text{g/ml}$) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 μM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrileri sonucunda elde edilen kasılma yanıtları Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

Dokuların 0.1, 1 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda 1,3-PBIT ile inkübasyonunun, noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinde meydana getirdiği değişiklikler kontrol grubu ile tek-yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlıdır (0.1 $\mu\text{g/ml}$ ile $F=38.88$; 1 $\mu\text{g/ml}$ ile $F=40.73$; 10 $\mu\text{g/ml}$ ile $F=26.29$; $P < 0.0001$) (Çizelge 4.1; Şekil 4.3). Dokuların 1,3-PBIT ile inkübe edildikten sonra elde edilen noradrenalin kasılmaları kontrol grubu ile tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak karşılaştırıldığında, 1,3-PBIT 0.1 ve 1 $\mu\text{g/ml}$ ile anlamlı olmak üzere 0.1 μM noradrenalin konsantrasyonlarında elde edilen kasılmalar kontrole göre daha azdır ($P < 0.05$); 10 $\mu\text{g/ml}$ 1,3-PBIT aynı noradrenalin konsantrasyonlarında bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$) (Çizelge 4.1; Şekil 4.3).

Çizelge 4.1 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) veya selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları.

		Noradrenalin (µM)												
		0.001	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	100	300	1000
Kontrol														
0.00	±	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.29	1.40	2.27	2.99	3.48	3.75	3.63	3.65
0.00	(n=7)	0.00	(n=7)	0.00	(n=7)	0.03	(n=7)	0.26	(n=7)	0.30	(n=7)	0.33	(n=5)	0.35
1,3-PBIT (0.1 µg/ml)														
0.00	±	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ⁺	0.41	1.20	2.09	2.81	3.56	3.69	3.70	3.49
0.00	(n=7)	0.00	(n=7)	0.00	(n=7)	0.00	(n=7)	0.39	(n=7)	0.55	(n=7)	0.30	(n=7)	0.34
1,3-PBIT (1 µg/ml)														
0.00	±	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ⁺	0.74	1.46	2.01	2.87	3.18	3.30	3.35	3.32
0.00	(n=6)	0.00	(n=6)	0.00	(n=6)	0.00	(n=6)	0.43	(n=6)	0.25	(n=6)	0.26	(n=6)	0.28
1,3-PBIT (10 µg/ml)														
0.00	±	0.00	0.00	0.00	0.00	0.36	1.05	2.04	2.46	2.86	3.11	3.24	3.34	3.40
0.00	(n=5)	0.00	(n=5)	0.00	(n=5)	0.15	(n=5)	0.42	(n=5)	0.48	(n=5)	0.53	(n=5)	0.56

1,3-PBIT, Phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide; iNOS, induklenebilir nitrik oksit sentaz. Kasılma yanıtları gram cinsinden ve ortalama±ortalamların standart hatası olarak verilmiştir. n, farklı sıçanlardan hazırlanan preparat sayısını göstermektedir. Aynı noradrenalin konsantrasyondaki + kontrol grubu değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 0.05).



Şekil 4.3 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ve/veya (A) 0.1, (B) 1 ve (C) 10 µg/ml konsantrasyonlarda selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları. 1,3-PBIT, *Phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide*; ET, endotoksin; iNOS, *indüklenebilir nitrik oksit sentaz*. Kasılma yanıtları gram cinsinden ve ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n= 5-7. + Kontrol ve * endotoksin grubu değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü varyans analizi; P < 0.0001).

Dokuların 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda 1,3-PBIT ile inkübasyonunun, noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinde meydana getirdiği değişiklikler endotoksin grubu ile tek-yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlıdır (0.1 µg/ml ile $F= 28.34$; 1 µg/ml ile $F= 22.08$; 10 µg/ml ile $F= 27.82$; $P < 0.0001$) (Şekil 4.3). 1,3-PBIT ile noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinde olan değişiklikler kontrol grubu ile tek-yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldığında da aralarındaki fark anlamlıdır (0.1 µg/ml ile $F= 38.38$; 1 µg/ml ile $F= 40.73$; 10 µg/ml ile $F= 46.29$; $P < 0.0001$) (Şekil 4.3). İstatistiksel analizler tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak yapıldığında, endotoksin varlığında elde edilen noradrenalin kasılma yanıtları, dokuların endotoksin ile birlikte 0.1 µg/ml 1,3-PBIT ile inkübasyonu sonucunda değişmezken ($P > 0.05$) (Şekil 4.3A), 1 µg/ml 1,3-PBIT, endotoksin varlığında 1 µM noradrenalin konsantrasyonlarında elde edilen kasımlarda artışa neden olmuştur ($P < 0.05$) (Şekil 4.3B). Diğer yandan, 10 µg/ml 1,3-PBIT, endotoksin varlığında 0.3-30 µM noradrenalin konsantrasyonlarında elde edilen kasımlarda artışa neden olmuştur ($P < 0.05$) (Şekil 4.3C); bu kasımlar 0.1 µM noradrenalin konsantrasyonlarında elde edilen kontrol grubundaki kasımlardan da fazladır ($P < 0.05$) (Şekil 4.3C).

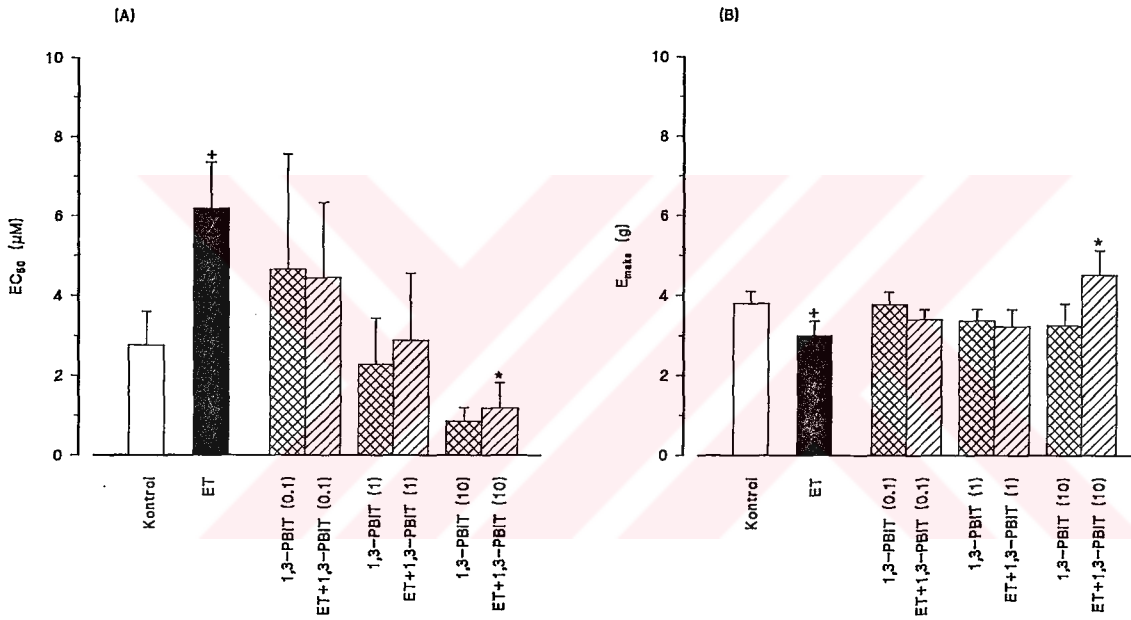
EC₅₀ Değerleri

Ortamda 1,3-PBIT (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ve/veya endotoksin varken noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4A'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC₅₀ ve E_{maks} değerleri.

	EC ₅₀	E _{maks}
Kontrol	2.77±0.84 (n= 7)	3.80±0.31 (n= 7)
1,3-PBIT		
0.1 µg/ml	4.66±2.89 (n= 7)	3.77±0.32 (n= 7)
1 µg/ml	2.28±1.16 (n= 6)	3.37±0.29 (n= 6)
10 µg/ml	0.85±0.35 (n= 5)	3.26±0.54 (n= 5)

1,3-PBIT, Phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz. EC₅₀ değerleri µM ve E_{maks} değerleri gram cinsinden ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n, farklı sıçanlardan hazırlanan preparat sayısını göstermektedir.



Şekil 4.4 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ve/veya selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A) EC₅₀ ve (B) E_{maks} değerleri. 1,3-PBIT, Phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz. EC₅₀ değerleri µM ve E_{maks} değerleri gram cinsinden ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n= 5-7. + Kontrol (Student's t testi; P < 0.05) ve * endotoksin (tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 0.05) grubu değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı.

Dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde ve 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda 1,3-PBIT ile 4 saat inkübasyonu sonrasında elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri arasında fark yoktur ($P > 0.05$) (Çizelge 4.2; Şekil 4.4A).

Dokuların 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda 1,3-PBIT ile inkübasyonu, endotoksin varlığında elde edilen EC₅₀ değerinde konsantrasyona bağlı bir azalma oluşturmuştur (Şekil 4.4A); ancak, oluşan değişiklikler 0.1 ve 1 µg/ml 1,3-PBIT ile anlamlı değildir ($P > 0.05$) (Şekil 4.4A). 1,3-PBIT ile azalan EC₅₀ değerleri, 1,3-PBIT tek başına elde edilen değerden de farklı değildir ($P > 0.05$) (Şekil 4.4A, Çizelge 4.2). Diğer yandan, dokuların 10 µg/ml 1,3-PBIT ile inkübasyonu, endotoksin ile artan EC₅₀ değerini ($P = 0.0465$), kontrol grubu değerine düşürmüştür ($P < 0.05$) (Şekil 4.4A); 1,3-PBIT ile azalan EC₅₀ değeri, 1,3-PBIT tek başına elde edilen değerden de farklı değildir ($P > 0.05$) (Şekil 4.4A, Çizelge 4.2).

E_{maks} Değerleri

Ortamda 1,3-PBIT (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ve/veya endotoksin varken noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan E_{maks} değerleri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4B'de gösterilmiştir.

Dokuların 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda 1,3-PBIT ile inkübasyonu ile elde edilen E_{maks} değerleri, kontrol grubu değerlerinden farklı değildir ($P > 0.05$) (Çizelge 4.2; Şekil 4.4B).

Dokuların 10 µg/ml 1,3-PBIT ile inkübasyonu, endotoksin ile azalan E_{maks} değerini ($P = 0.0089$), kontrol grubu değerine yükseltmiştir ($P < 0.05$) (Şekil 4.4B); 1,3-PBIT ile artan E_{maks}, 1,3-PBIT tek başına elde edilen değerden farklı değildir ($P > 0.05$) (Şekil 4.4B, Çizelge 4.2). Endotoksin ile azalan E_{maks} değeri, anlamlı olmamakla birlikte, 0.1 veya 1 µg/ml 1,3-PBIT ile artmıştır ($P > 0.05$) (Şekil 4.4B); 1,3-PBIT ile

artan E_{maks} , 1,3-PBIT tek başına elde edilen değerlerden farklı değildir ($P > 0.05$) (Şekil 4.4B, Çizelge 4.2).

Bu bulgular, torasik aorta preparatlarının endotoksin ile inkübasyonu sonucunda noradrenalin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sağa kayması ve kasılma yanıtlarının azalmasından, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde endotoksinin etkisi ile iNOS aktivitesinin artması sonucunda oluşumu artan NO'nun sorumlu olabileceğini göstermektedir.

4.1.3 Ortamda Endotoksin Yokken ve Varken Noradrenalin ile Elde Edilen Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri, EC_{50} ve E_{maks} Değerleri Üzerinde MAFF'nin Etkisi

Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri

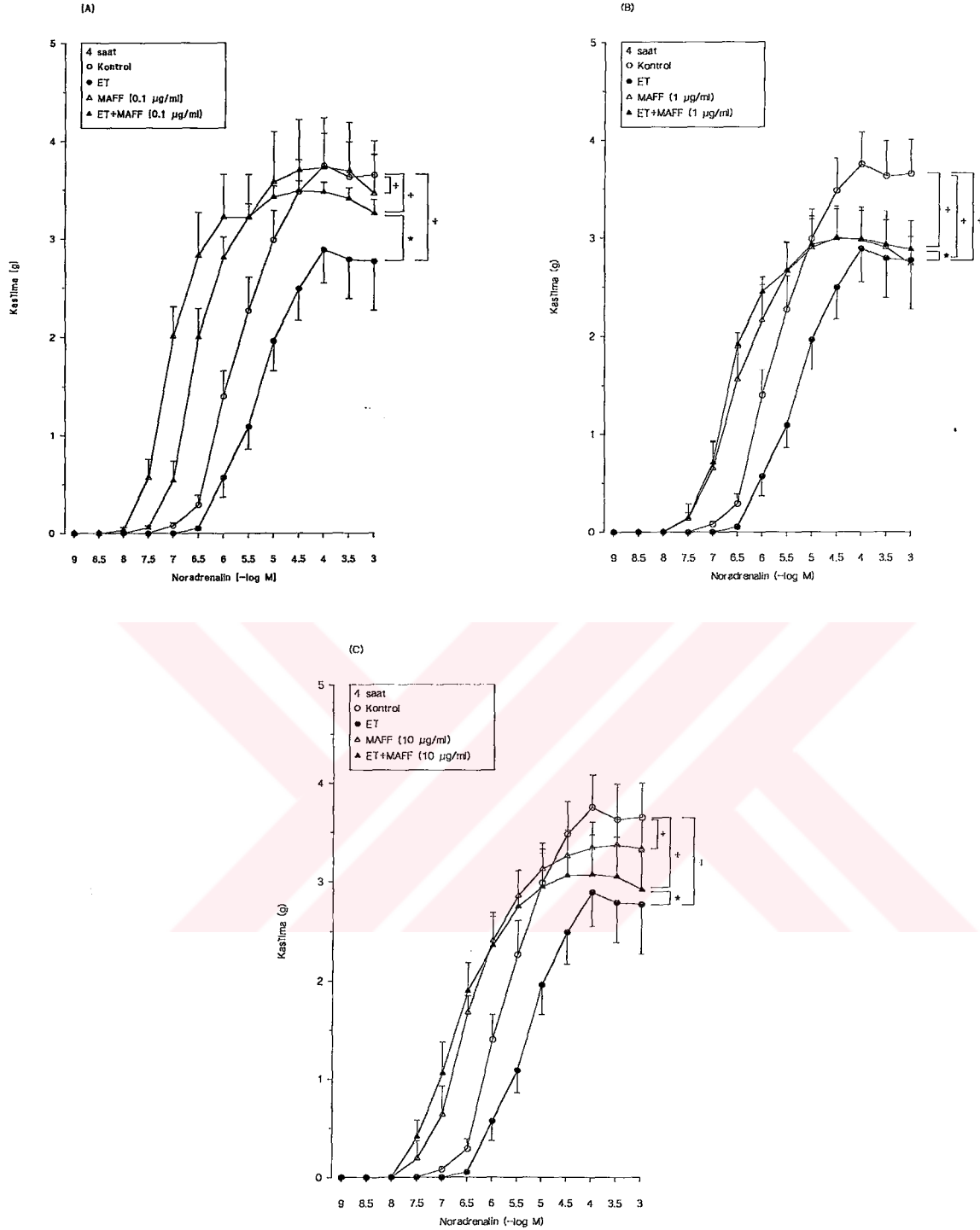
Torasik aorta preparatlarının ortamda endotoksin yokken ve varken selektif sitozolik FLA₂ inhibitörü MAFF (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrileri sonucunda elde edilen kasılma yanıtları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.5'te verilmiştir.

Dokuların 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda MAFF ile inkübasyonunun, noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinde meydana getirdiği değişiklikler kontrol grubu ile tek-yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlıdır (0.1 µg/ml ile $F= 32.55$; 1 µg/ml ile $F= 36.64$; 10 µg/ml ile $F= 45.55$; $P < 0.0001$) (Çizelge 4.3; Şekil 4.5). Dokuların MAFF ile inkübe edildikten sonra elde edilen noradrenalin kasılmaları kontrol grubu ile tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak karşılaştırıldığında, MAFF 0.1 µg/ml ile 0.1-1 µM, 1 µg/ml ile 0.03-0.3 µM ve 10 µg/ml ile 0.03-1 µM noradrenalin konsantrasyonunda elde edilen kasılmalar kontrole göre daha fazladır ($P < 0.05$) (Çizelge 4.3; Şekil 4.5).

Çizelge 4.3 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) veya selektif sitozolik FLA₂ inhibitörü MAFF (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları.

Noradrenalin (µM)													
	0.001	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	100	300	1000
Kontrol													
0.00 ±	0.00 ±	0.00 ±	0.00 ±	0.08 ±	0.29 ±	1.40 ±	2.27 ±	2.99 ±	3.48 ±	3.75 ±	3.63 ±	3.65 ±	3.65 ±
(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=5)	(n=5)	(n=5)
MAFF (0.1 µg/ml)													
0.00 ±	0.00 ±	0.00 ±	0.03 ±	0.57 ⁺ ±	2.01 ⁺ ±	2.83 ⁺ ±	3.22 ±	3.58 ±	3.70 ±	3.73 ±	3.69 ±	3.46 ±	3.46 ±
(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)
MAFF (1 µg/ml)													
0.00 ±	0.00 ±	0.00 ±	0.14 ⁺ ±	0.65 ⁺ ±	1.56 ⁺ ±	2.16 ±	2.66 ±	2.90 ±	3.00 ±	2.98 ±	2.90 ±	2.73 ±	2.73 ±
(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)
MAFF (10 µg/ml)													
0.00 ±	0.00 ±	0.00 ±	0.19 ⁺ ±	0.64 ⁺ ±	1.68 ⁺ ±	2.41 ⁺ ±	2.86 ±	3.13 ±	3.26 ±	3.34 ±	3.37 ±	3.33 ±	3.33 ±
(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)

FLA, Fosfolipaz; MAFF, metilarakidonil florofofonat. Kasılma yanıtları gram cinsinden ve ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n, farklı sıçanlardan hazırlanan preparat sayısını göstermektedir. Aynı noradrenalin konsantrasyonundaki * kontrol grubu değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 0.05).



Şekil 4.5 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ve/veya (A) 0.1, (B) 1 ve (C) 10 µg/ml konsantrasyonlarda selektif sitozolik FLA₂ inhibitörü MAFF ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları. *ET*, Endotoksin; *FLA*, fosfolipaz; *MAFF*, metilarakidonil florofosfonat. Kasılma yanıtları gram cinsinden ve ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n= 5-8. * Kontrol ve * endotoksin grubu değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü varyans analizi; P < 0.0001).

Dokuların 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda MAFF ile inkübasyonunun, noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinde meydana getirdiği değişiklikler endotoksin grubu ile tek-yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlıdır (0.1 µg/ml ile $F= 50.24$; 1 µg/ml ile $F= 32.34$; 10 µg/ml ile $F= 24.76$; $P < 0.0001$) (Şekil 4.5). MAFF ile noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinde olan değişiklikler kontrol grubu ile tek-yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldığında da aralarındaki fark anlamlıdır (0.1 µg/ml ile $F= 32.55$; 1 µg/ml ile $F= 36.64$; 10 µg/ml ile $F= 45.55$; $P < 0.0001$) (Şekil 4.5). İstatistiksel analizler tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak yapıldığında, endotoksin varlığında elde edilen noradrenalin kasılma yanıtları, MAFF 0.1 µg/ml ile 0.03-30 µM, 1 µg/ml ile 0.03-3 µM ve 10 µg/ml ile 0.03-1 µM noradrenalin konsantrasyonlarında elde edilen kasılmalarda artışa neden olmuştur ($P < 0.05$) (Şekil 4.5); bu kasılmalar MAFF 0.1 µg/ml ile 0.03-10 µM, 1 µg/ml ile 0.03-1 µM ve 10 µg/ml ile 0.03-1 µM noradrenalin konsantrasyonlarında elde edilen kontrol grubundaki kasılmalardan farklıdır ($P < 0.05$) (Şekil 4.5).

EC₅₀ Değerleri

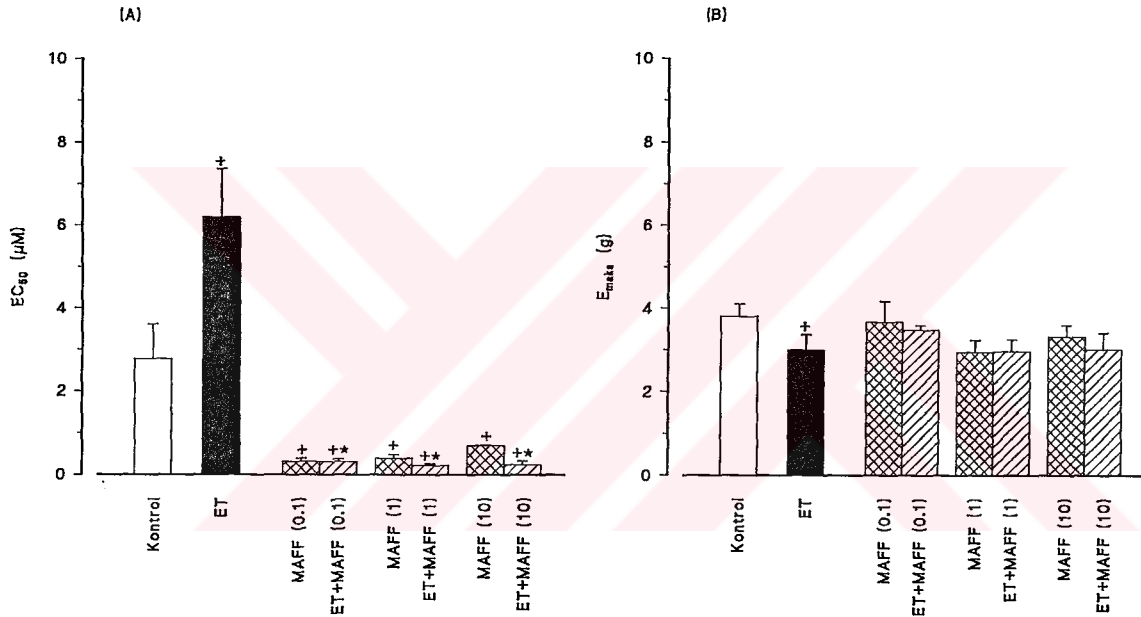
Ortamda MAFF (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ve/veya endotoksin varken noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.6A'da gösterilmiştir.

Dokuların 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda MAFF ile 4 saat inkübasyonu sonrasında elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri kontrol grubuna göre daha azdır (P değerleri sırası ile 0.0357, 0.0247 ve 0.0382) (Çizelge 4.4; Şekil 4.6A).

Çizelge 4.4 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve selektif sitozolik FLA₂ inhibitörü MAFF (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC₅₀ ve E_{maks} değerleri.

	EC ₅₀	E _{maks}
Kontrol	2.77±0.84 (n= 7)	3.80±0.31 (n= 7)
MAFF		
0.1 µg/ml	0.32±0.08 (n= 5) ⁺	3.67±0.50 (n= 5)
1 µg/ml	0.39±0.10 (n= 6) ⁺	2.94±0.29 (n= 6)
10 µg/ml	0.37±0.008 (n= 5) ⁺	3.31±0.28 (n= 5)

FLA, Fosfolipaz; MAFF, metilarakidonil florofofonat. EC₅₀ değerleri µM ve E_{maks} değerleri gram cinsinden ortalama±ortalamların standart hatası olarak verilmiştir. n, farklı sıçanlardan hazırlanan preparat sayısını göstermektedir. ⁺ Kontrol grubu değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 0.05).



Şekil 4.6 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ve/veya selektif sitozolik FLA₂ inhibitörü MAFF (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A) EC₅₀ ve (B) E_{maks} değerleri. ET, Endotoksin; FLA, fosfolipaz; MAFF, metilarakidonil florofofonat. EC₅₀ değerleri µM ve E_{maks} değerleri gram cinsinden ortalama±ortalamların standart hatası olarak verilmiştir. n= 5-7. ⁺ Kontrol (Student's t testi veya tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 0.05) ve ^{*} endotoksin (tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 0.05) grubu değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı.

Dokuların 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda MAFF ile inkübasyonu, endotoksin ile artan EC₅₀ değerinde ($P= 0.0465$) azalmaya neden olmuştur ($P < 0.05$) (Şekil 4.6A); MAFF ile azalan EC₅₀ değeri, MAFF tek başına elde edilen değerlerden farklı değildir ($P > 0.05$) (Şekil 4.6A, Çizelge 4.4).

E_{maks} Değerleri

Ortamda MAFF (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ve/veya endotoksin varken noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan E_{maks} değerleri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.6B'de gösterilmiştir.

Dokuların 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda MAFF ile inkübasyonu ile elde edilen E_{maks} değerleri, kontrol grubu değerlerinden farklı değildir ($P > 0.05$) (Çizelge 4.4; Şekil 4.6B).

Dokuların 0.1 µg/ml MAFF ile inkübasyonu, anlamlı olmamakla birlikte, endotoksin ile azalan E_{maks} değerini ($P= 0.0089$) artırmıştır ($P > 0.05$) (Şekil 4.6B); MAFF ile artan E_{maks}, MAFF tek başına elde edilen değerden farklı değildir ($P > 0.05$) (Şekil 4.6B, Çizelge 4.4). Dokuların 1 veya 10 µg/ml MAFF ile inkübasyonu, anlamlı olmamakla birlikte, endotoksin ile azalan E_{maks} değerini azaltmıştır ($P > 0.05$) (Şekil 4.6B); MAFF ile azalan E_{maks}, MAFF tek başına elde edilen değerlerden farklı değildir ($P > 0.05$) (Şekil 4.6B, Çizelge 4.4).

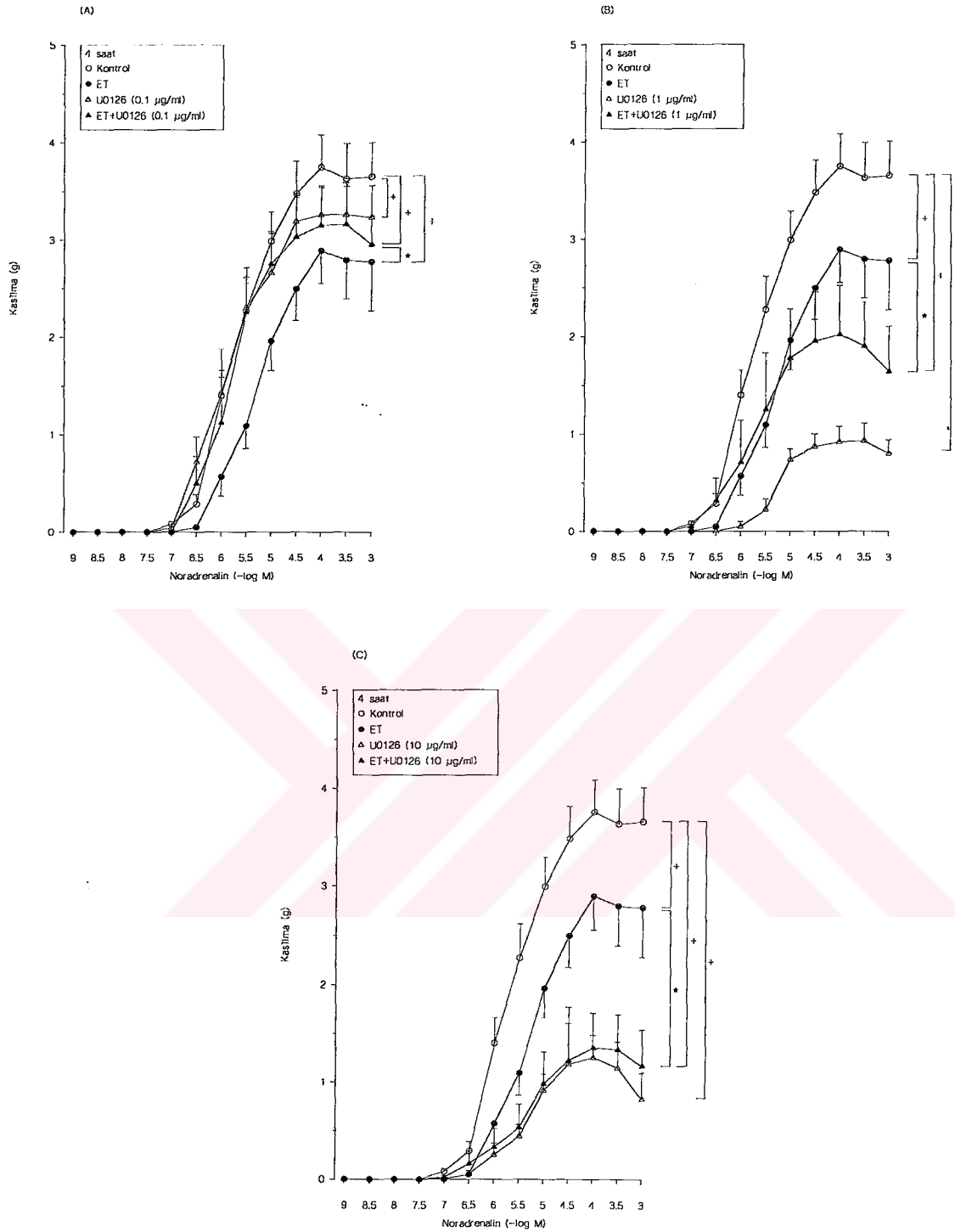
Bu bulgular, torasik aorta preparatlarının endotoksin ile inkübasyonu sonucunda noradrenalin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sağa kayması ve kasılma yanıtlarının azalmasından, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde endotoksinin etkisi ile FLA₂ aktivitesinin artması sonucunda oluşumu artan vazodilatör etkili FLA₂ yolu ürünlerinin kısmen sorumlu olabileceğini göstermektedir.

4.1.4 Ortamda Endotoksin Yokken ve Varken Noradrenalin ile Elde Edilen Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri, EC_{50} ve E_{maks} Değerleri Üzerinde U0126'nın Etkisi

Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri

Torasik aorta preparatlarının ortamda endotoksin yokken ve varken selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 (0.1, 1 ve 10 $\mu\text{g/ml}$) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 μM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrileri sonucunda elde edilen kasılma yanıtları Çizelge 4.5 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

Dokuların 0.1, 1 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda U0126 ile inkübasyonunun, noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinde meydana getirdiği değişiklikler kontrol grubu ile tek-yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlıdır (0.1 $\mu\text{g/ml}$ ile $F= 37.85$; 1 $\mu\text{g/ml}$ ile $F= 49.90$; 10 $\mu\text{g/ml}$ ile $F= 44.86$; $P < 0.0001$) (Çizelge 4.5; Şekil 4.7). Dokuların U0126 ile inkübe edildikten sonra elde edilen noradrenalin kasımları kontrol grubu ile tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak karşılaştırıldığında, U0126 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ile 0.1 μM , 1 $\mu\text{g/ml}$ ile 0.1-1000 μM ve 10 $\mu\text{g/ml}$ ile 0.1 ile 1-1000 μM noradrenalin konsantrasyonunda elde edilen kasımlar ise kontrole göre daha azdır ($P < 0.05$) (Çizelge 4.5; Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde ve endotoksin (100 µg/ml) ve/veya (A) 0.1, (B) 1 ve (C) 10 µg/ml konsantrasyonlarda selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan kasılma yanıtları. *ET*, Endotoksin; *MEK*, mitojen ile aktive edilen protein kinaz; *U0126*, 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien. Kasılma yanıtları gram cinsinden ve ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n= 5-7. + Kontrol ve * endotoksin grubu değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü varyans analizi; $P < 0.0001$).

Dokuların 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda U0126 ile inkübasyonunun, noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinde meydana getirdiği değişiklikler endotoksin grubu ile tek-yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlıdır (0.1 µg/ml ile $F= 26.57$; 1 µg/ml ile $F= 13.99$; 10 µg/ml ile $F= 18.03$; $P < 0.0001$) (Şekil 4.7). U0126 ile noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinde olan değişiklikler kontrol grubu ile tek-yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldığında da aralarındaki fark anlamlıdır (0.1 µg/ml ile $F= 37.85$; 1 µg/ml ile $F= 49.90$; 10 µg/ml ile $F= 44.86$; $P < 0.0001$) (Şekil 4.7). İstatistiksel analizler tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak yapıldığında, endotoksin varlığında elde edilen noradrenalin kasılma yanıtları, U0126 0.1 µg/ml ile 0.3 ve 3 µM noradrenalin konsantrasyonlarında elde edilen kasımlarda artışa (Şekil 4.7A), 10 µg/ml ile 10-1000 µM noradrenalin konsantrasyonlarında elde edilen kasımlarda ise azalmaya neden olmuştur ($P < 0.05$) (Şekil 4.7C); bu kasımlar U0126 0.1 µg/ml ile 0.1 µM ve 10 µg/ml ile 0.1 ve 1-1000 µM noradrenalin konsantrasyonlarında elde edilen kontrol grubundaki kasımlardan farklıdır ($P < 0.05$) (Şekil 4.7A, C). Endotoksin varlığında elde edilen noradrenalin kasılma yanıtları 1 µg/ml U0126 ile değişmemiştir ($P > 0.05$) (Şekil 4.7B).

EC₅₀ Değerleri

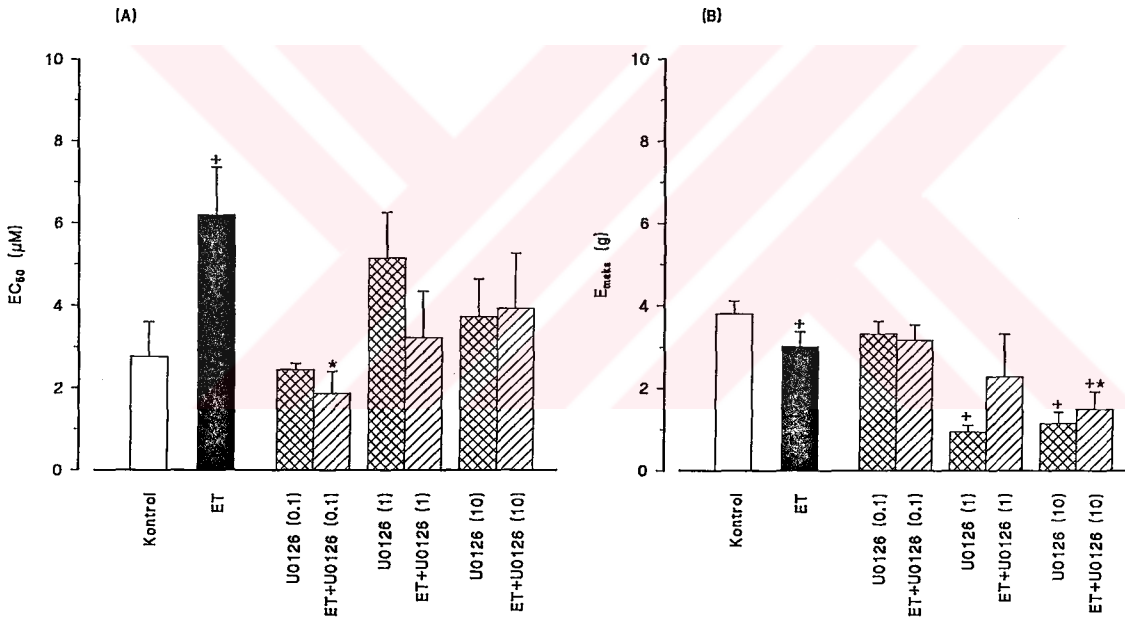
Ortamda U0126 (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ve/veya endotoksin varken noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8A'da gösterilmiştir.

Dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde ve 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda U0126 ile 4 saat inkübasyonu sonrasında elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri arasında fark yoktur ($P > 0.05$) (Çizelge 4.6; Şekil 4.8A).

Çizelge 4.6 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC₅₀ ve E_{maks} değerleri.

	EC ₅₀	E _{maks}
Kontrol	2.77±0.84 (n= 7)	3.80±0.31 (n= 7)
U0126		
0.1 µg/ml	2.44±0.15 (n= 5)	3.31±0.31 (n= 5)
1 µg/ml	5.13±1.12 (n= 5)	0.94±0.16 (n= 5) ⁺
10 µg/ml	3.72±0.91 (n= 6)	1.14±0.27 (n= 6) ⁺

MEK, Mitojen ile aktive edilen protein kinaz kinaz; U0126, 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien. EC₅₀ değerleri µM ve E_{maks} değerleri gram cinsinden ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n, farklı sıçanlardan hazırlanan preparat sayısını göstermektedir. ⁺ Kontrol grubu değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 0.05).



Şekil 4.8 Sıçan izole torasik aortunda, dokuların 4 saat inkübasyon öncesinde (kontrol) ve endotoksin (100 µg/ml) ve selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 (0.1, 1 ve 10 µg/ml) ile 4 saat inkübasyonu sonrasında, noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan (A) EC₅₀ ve (B) E_{maks} değerleri. ET, Endotoksin; MEK, mitojen ile aktive edilen protein kinaz kinaz; U0126, 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien. EC₅₀ değerleri µM ve E_{maks} değerleri gram cinsinden ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n= 5-7. ⁺ Kontrol (Student's t testi veya tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 0.05) ve ^{*} endotoksin (tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 0.05) grubu değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı.

Dokuların 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda U0126 ile inkübasyonu, endotoksin ile elde edilen EC₅₀ değerinde konsantrasyon ile ilişkili azalma oluşturmuştur; ancak, oluşan değişiklikler 1 veya 10 µg/ml U0126 ile anlamlı değildir ($P > 0.05$) (Şekil 4.8A). Diğer yandan, dokuların 0.1 µg/ml U0126 ile inkübasyonu, endotoksin ile artan EC₅₀ değerini ($P = 0.0465$), kontrol grubu değerine düşürmüştür ($P < 0.05$) (Şekil 4.8A); U0126 ile azalan EC₅₀, U0126 tek başına elde edilen değerden farklı değildir ($P > 0.05$) (Şekil 4.8A, Çizelge 4.6).

E_{maks} Değerleri

Ortamda U0126 ve/veya endotoksin varken noradrenalin (0.001-1000 µM) ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan E_{maks} değerleri Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8B’de gösterilmiştir.

Dokuların 0.1 µg/ml konsantrasyonda U0126 ile inkübasyonu ile elde edilen E_{maks} değerleri, kontrol grubu değerlerinden farklı değildir ($P > 0.05$); ancak, 1 ve 10 µg/ml U0126 ile elde edilen değerler kontrol grubu E_{maks} değerinden daha azdır ($P < 0.0001$) (Çizelge 4.6; Şekil 4.8B).

Dokuların 10 µg/ml U0126 ile inkübasyonu, endotoksin ile azalan E_{maks} değerini ($P = 0.0352$), daha da azaltmıştır ($P < 0.05$) (Şekil 4.8B). 10 µg/ml U0126 ile azalan E_{maks}, U0126 ile tek başına elde edilen değerden farklı değilken ($P > 0.05$), kontrol grubu değerine göre daha azdır ($P < 0.05$) (Şekil 4.8B). 0.1 µg/ml U0126, anlamlı olmamakla birlikte, endotoksin ile azalan E_{maks} değerini artırmıştır ($P > 0.05$) (Şekil 4.8B); U0126 ile artan E_{maks}, U0126 ile tek başına elde edilen değerden farklı değildir ($P > 0.05$) (Şekil 4.8B, Çizelge 4.6). 1 µg/ml U0126 ise, endotoksin ile azalan E_{maks} değerini, anlamlı olmamakla birlikte, daha da azaltmıştır ($P > 0.05$) (Şekil 4.8B); U0126 ile azalan E_{maks}, U0126 ile tek başına elde edilen değerden farklı değildir ($P > 0.05$) (Şekil 4.8B, Çizelge 4.6).

Bu bulgular, torasik aorta preparatlarının endotoksin ile inkübasyonu sonucunda noradrenalin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sağa kaymasından, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1/2 ile ilişkili vazodilatasyona aracılık eden olayların rolü olabileceğini göstermektedir. Diğer yandan, maksimum kasılma yanıtının azalmasından ise, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde MEK1/2 ile ilişkili vazodilatasyondan çok, vazokonstriksiyona aracılık eden olayların baskılanması sorumlu olabilir.

4.2 iNOS Aktivitesi Ölçümü

4.2.1 iNOS Aktivitesi Üzerinde 1,3-PBIT'nin Etkisi

Sıçan izole torasik aortunda, iNOS aktivitesinin bir göstergesi olarak endotoksin (100 µg/ml) ile artan nitrit miktarı üzerinde selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT (10 µg/ml)'nin etkisi Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 Sıçan izole torasik aortunda, endotoksin (100 µg/ml) ile artan nitrit miktarı üzerinde selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT (10 µg/ml)'nin etkisi.

	Nitrit
Kontrol	46.25±3.95 (n= 4)
ET	73.40±4.08 (n= 5) ⁺
1,3-PBIT (10 µg/ml)	40.75±9.47 (n= 4)
ET+1,3-PBIT (10 µg/ml)	52.00±5.31 (n= 4) [*]

1,3-PBIT, Phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothioureia] dihydrobromide; ET, endotoksin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz. Nitrit miktarları µmol/mg protein/g doku olarak ortalama±ortalamaların standart hatası olarak ifade edilmiştir. n, farklı sıçanlardan hazırlanan preparat sayısını göstermektedir. ⁺ Kontrol (Student's t testi veya tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 005) ve ^{} endotoksin değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 0.05).*

Vasküler kontraktilete çalışmalarında kullanılan 10 µg/ml konsantrasyonunda, dokuların endotoksin ile 4 saat inkübasyonu sonrasında noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC₅₀ ve E_{maks} değerlerini kontrol düzeylerine getiren 1,3-

PBIT, endotoksin ile artan nitrit miktarını ($P= 0.0022$) da azaltmıştır ($P < 0.05$). 1,3-PBIT tek başına kullanıldığında ölçülen nitrit miktarı kontrol ve ET+1,3-PBIT gruplarından farklı değildir ($P > 0.05$).

Bu bulgular, torasik aorta preparatlarının endotoksin ile inkübasyonu sonucunda noradrenalin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sağa kayması ve kasılma yanıtlarının azalmasından, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde endotoksinin etkisi ile iNOS aktivitesinin artması sonucunda oluşumu artan NO'nun sorumlu olduğunu göstermektedir.

4.2.2 iNOS Aktivitesi Üzerinde MAFF'nin Etkisi

Sıçan izole torasik aortunda, iNOS aktivitesinin bir göstergesi olarak endotoksin (100 µg/ml) ile artan nitrit miktarı üzerinde selektif sitozolik FLA₂ inhibitörü MAFF (0.1, 1 ve 10 µg/ml)'nin etkisi Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 Sıçan izole torasik aortunda, endotoksin (100 µg/ml) ile artan nitrit miktarı üzerinde selektif sitozolik FLA₂ inhibitörü MAFF (0.1, 1 ve 10 µg/ml)'nin etkisi.

	Nitrit
Kontrol	46.25±3.95 (n= 4)
ET	73.40±4.08 (n= 5) ⁺
MAFF (0.1 µg/ml)	46.00±9.82 (n= 5)
ET+MAFF (0.1 µg/ml)	17.00±6.04 (n= 4) ^{+*}
MAFF (1 µg/ml)	24.20±2.54 (n= 5) ⁺
ET+MAFF (1 µg/ml)	37.00±5.54 (n= 5) [*]
MAFF (10 µg/ml)	21.60±4.39 (n= 5) ⁺
ET+MAFF (10 µg/ml)	27.20±3.18 (n= 5) ^{+*}

ET, Endotoksin; FLA, fosfolipaz; MAFF, metilarakidonil florofosfonat. Nitrit miktarları µmol/mg protein/g doku olarak ortalama±ortalamaların standart hatası olarak ifade edilmiştir. n, farklı sıçanlardan hazırlanan preparat sayısını göstermektedir. ⁺ Kontrol (Student's t testi veya tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; $P < 005$) ve ^{*} endotoksin değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; $P < 0.05$).

Vasküler kontraktilete çalışmalarında kullanılan 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında, dokuların endotoksin ile 4 saat inkübasyonu sonrasında noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan E_{maks} değerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmaksızın, EC_{50} değerinde gerek kontrol gerekse endotoksin grubuna göre daha fazla azalma oluşturan MAFF, endotoksin ile artan nitrit miktarını ($P=0.0022$) da azaltmıştır ($P < 0.05$); 0.1 ve 10 µg/ml MAFF ile oluşan değişiklikler kontrol grubundan daha azdır ($P < 0.05$). MAFF tek başına kullanıldığında ölçülen nitrit miktarı 0.1 µg/ml konsantrasyonda kontrol grubundan, 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında ise ET+MAFF grubundan farklı değildir ($P > 0.05$). Diğer yandan, MAFF 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda kullanıldığında ölçülen nitrit miktarı kontrol grubuna göre daha azdır ($P < 0.05$).

Bu bulgular, torasik aorta preparatlarının endotoksin ile inkübasyonu sonucunda noradrenalin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sağa kayması ve kasılma yanıtlarının azalmasından, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde endotoksinin etkisi ile FLA_2 aktivitesinin artması sonucunda oluşumu artan vazodilatör etkili FLA_2 yolu ürünleri ile birlikte, iNOS aktivitesinin artması sonucunda oluşumu artan NO'nun sorumlu olduğunu göstermektedir.

4.2.3 iNOS Aktivitesi Üzerinde U0126'nın Etkisi

Sıçan izole torasik aortunda, iNOS aktivitesinin bir göstergesi olarak endotoksin (100 µg/ml) ile artan nitrit miktarları üzerinde selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 (0.1 µg/ml)'nin etkisi Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 Sıçan izole torasik aortunda, endotoksin (100 µg/ml) ile artan nitrit miktarı üzerinde selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 (0.1 ve 10 µg/ml)'nin etkisi.

	Nitrit
Kontrol	46.25±3.95 (n= 4)
ET	73.40±4.08 (n= 5) ⁺
U0126 (0.1 µg/ml)	66.00±8.04 (n= 4)
ET+U0126 (0.1 µg/ml)	50.60±3.03 (n= 5) [*]
U0126 (10 µg/ml)	54.00±6.35 (n= 3)
ET+U0126 (10 µg/ml)	45.67±4.86 (n= 5) [*]

ET, Endotoksin; MEK, mitojen ile aktive edilen protein kinaz kinaz; U0126, 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien. Nitrit miktarları µmol/mg protein/g doku olarak ortalama± ortalamaların standart hatası olarak ifade edilmiştir. n, farklı sıçanlardan hazırlanan preparat sayısını göstermektedir. ⁺ Kontrol (Student's t testi veya tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 005) ve ^{} endotoksin değerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü varyans analizi ve takiben Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; P < 0.05).*

Vasküler kontraktilite çalışmalarında kullanılan 0.1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında, dokuların endotoksin ile 4 saat inkübasyonu sonrasında noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC₅₀ değerini azaltan ve E_{maks} değerinde gerek kontrol gerekse endotoksin grubuna göre daha fazla azalma oluşturan U0126, endotoksin ile artan nitrit miktarını (P= 0.0022) da azaltmıştır (P < 0.05). U0126 tek başına kullanıldığında ölçülen nitrit miktarları 0.1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda kontrol ve ET+U0126 gruplarından farklı değildir (P > 0.05).

Bu bulgular, torasik aorta preparatlarının endotoksin ile inkübasyonu sonucunda noradrenalin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sağa kaymasından, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde endotoksinin etkisi ile aktive olan MEK1/2 ile ilişkili vazodilatör ürünlerden birinin iNOS kaynaklı NO olabileceğini göstermektedir. Diğer yandan, gerek kontrol gerekse endotoksin gruplarında kasılma yanıtlarının azalmasından ise, NO ile birlikte MEK1/2 aracılıklı vazokonstriktör olayların baskılanması sorumlu olabilir.

5. TARTIŞMA

Sıçan izole torasik aortunda *in vitro* olarak yapılan bu çalışmada, G_q ve $G_{12/13}$ proteinleri ile kenetli olan α -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtları üzerinde endotoksinin oluşturduğu etkilere iNOS, sitozolik FLA₂ ve MEK1/2 enzimlerinin katkısı araştırılmıştır. α -adrenerjik reseptör agonisti noradrenalin ile selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT, selektif sitozolik FLA₂ inhibitörü MAFF ve selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 kullanılarak yapılan bu çalışmanın bulguları (1) endotoksin ile 4 saat inkübe edilen torasik aortada noradrenalin ile oluşan α -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtlarının azalırken aynı zamanda doku nitrit oluşumunun da artması ve (2) 1,3-PBIT, MAFF ve U0126'nın endotoksin ile bozulan noradrenalin kasılma yanıtlarını düzeltirken, dokularda artan NO oluşumunu da azaltmalarıdır.

Sıçan torasik aorta preparatlarının 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda endotoksin ile 5-24 saat inkübasyonu sonrasında α -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılmaların azaldığı ve aynı zamanda iNOS aktivitesi ve NO oluşumunun arttığı bir çok çalışmada gösterilmiştir (123-126). Endotoksin ile 4 saat inkübe edilen torasik aorta preparatlarında, noradrenalin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin hem sağa kayması hem de kasılma yanıtlarının azalması, damar preparatlarının endotoksin ile inkübasyonun *in vitro* olarak izole organ banyosunda yapıldığı ve α -adrenerjik reseptör agonistlerinin kullanıldığı çalışmaların sonuçları ile uyumludur (64, 126, 130, 131).

Deney hayvanlarında *in vivo*, *ex vivo* ve *in vitro* olarak yapılan çalışmalarda, endotoksin ile çeşitli hücrelerde ekspresyon ve aktivitesi artan iNOS'un vasküler hiporeaktiviteye ve vazopresörler ile geri çevrilemeyen şiddetli hipotansiyona önemli ölçüde katkıda bulunduğu, selektif iNOS inhibitörleri kullanılarak gösterilmiştir. Deneylerimizde de selektif iNOS inhibitörü olarak kullanılan 1,3-PBIT (insan iNOS, eNOS ve nNOS enzimleri için K_i değerleri sırası ile 0.047, 9 ve 0.25 μM) (132), 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda endotoksin ile artan EC_{50} değerini azaltmış ve azalan E_{maks} değerini artırmıştır; 1,3-PBIT tek başına kullanıldığında ise kontrol noradrenalin EC_{50} değerinde bir değişiklik oluşturmamıştır. Diğer yandan, 1,3-PBIT'nin yine 10 $\mu\text{g/ml}$

konsantrasyonda, endotoksin ile artan doku NO miktarını azaltırken, bazal nitrit düzeyini değiştirmemesi, endotoksin ile artan nitrit miktarının iNOS aktivitesinin artışına bağlı olduğunu göstermektedir. 1,3-PBIT 0.1, 1 ve 10 µg/ml (0.23, 2.3 ve 23 µM) konsantrasyonlarda tek başına kullanıldığında her ne kadar EC₅₀ ve E_{maks} değerlerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmada, kontrol noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sola kaymasına neden olmuştur. 1,3-PBIT'nin bu etkisinin nedeni, daha önce Ichihara ve ark. (133) tarafından bildirildiği gibi, kontrol ve endotoksemik sıçanlardan izole edilen renal arterlerde 1,3-PBIT'nin 1 µM ve düşük konsantrasyonlarda iNOS'u bloke ederken, 10 µM ve daha yüksek konsantrasyonlarda iNOS ve yNOS'u da inhibe etmesi olabilir. Ancak, bizim çalışmamızda 1,3-PBIT 10 µg/ml konsantrasyonda bazal doku nitrit miktarlarında bir azalma oluşturmamıştır. Sonuç olarak, bu bulgular, torasik aorta preparatlarının endotoksin ile inkübasyonu sonucunda noradrenalin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sağa kayması ve kasılma yanıtlarının azalmasından, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde endotoksinin etkisi ile iNOS aktivitesinin artması sonucunda oluşumu artan NO'nun sorumlu olduğunu göstermektedir.

Endotoksemik hayvanlar ve sepsisli insanlarda iNOS ile birlikte COX-2 ekspresyonunun da artması ile birlikte oluşumu artmış olan prostaglandinlerin sistemik hipotansiyon ve organ hasarına katkıda bulunduğu bilinmektedir (30, 119, 134-139). Endotoksemi sırasında, sıçanlarda karaciğer iNOS mRNA'sı ile birlikte (140), CYP 4A1, -A2 ve -A3 mRNA'larının da karaciğer ve böbrekte indüklendiği (140, 141), ancak diğer hepatik CYP gen ürünlerinin *down-regüle* olduğu bildirilmiştir (142-145). Endotoksin ile *in vitro* olarak inkübe edilen sıçan aortu preparatlarında ve α-adrenerjik reseptör agonistlerinin kullanıldığı çalışmalarda, endotoksin ile elde edilen kasılma yanıtlarının azalmasından vazodilatör etkili prostaglandinlerden çok, siklik GMP oluşumunu artırarak etkilerini oluşturan düz kas ve/veya endotel hücresi kaynaklı NO ve/veya diğer serbest radikallerin sorumlu olduğu gösterilmiştir (130, 131). Ancak, COX ve CYP ürünleri ile NO arasında olan etkileşmeler sepsis patojenezinin daha da kompleks olmasına neden olmaktadır. Çeşitli *in vitro* çalışmalarda prostaglandinlerin iNOS aktivitesi ve NO oluşumunu inhibe ettiği (146, 147), arttırdığı (148, 149) veya etkilemediği gösterilmiştir (150). Milano ve ark. (149) PGE₂'nin 1 and 10 ng/ml

konsantrasyonda iNOS ekspresyonu ve NO oluşumunu artırdığını, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda (> 50 ng/ml) iNOS aktivitesi üzerinde inhibitör etkili olduğunu göstermişlerdir. Sıçan ventriküler miyositlerinde yapılan bir çalışmada ise, COX değil de LO yolu ürünlerinin İL-1 β ile artan iNOS ekspresyon ve aktivitesine aracılık ettiği gösterilmiştir (151). Diğer yandan, NO'nun prostaglandin sentezi üzerindeki etkileri de çelişkilidir. Çeşitli NOS inhibitörleri ile yapılan *in vitro* (150, 152) ve *in vivo* (153-155) çalışmalarda, NO'nun prostaglandinlerin oluşumunu stimüle ettiği ve aynı zamanda COX-2 ekspresyon ve aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (156-158). Makrofaj hücre kültüründe yapılan bir çalışmada da NO'nun COX-1'i aktive ettiği, ancak COX-2 aracılığı ile prostaglandin oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (159). Diğer yandan, NO ve prostaglandin sentezi arasında bir ilişki bulunmadığını ileri süren araştırmacılar da bulunmaktadır (160-162). Ancak araştırmacıların çoğunun inandığı görüş NO'nun COX-2 ile direkt etkileşerek prostaglandinlerin sentezini artırması şeklindedir. Diğer yandan, NO'nun inflamatuvar olaylarda potent bir COX aktivatörü olan peroksinitritin prekürsörü olarak etkiyerek COX aktivitesini artırdığı da bildirilmiştir (163). NOS ve COX yolları arasındaki etkileşmeler ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda bu şekilde farklı sonuçlar elde edilmesinin nedenleri olarak farklı hücre dizilerinin, hücre aktivasyon yöntemlerinin veya inflamatuvar modellerin kullanılmış olması ileri sürülmüştür (22).

Bu çalışmada, endotoksin ile oluşan vasküler hiporeaktiviteye vazodilatör COX ve CYP ürünlerinden prostaglandinler ve epoksieikozatrienoik asit (EET)'lerin katkısı, selektif sitozolik FLA₂ inhibitörü olarak kabul edilen MAFF ile araştırılmıştır (102, 164-166). Daha önce, formil-metiyonil-lösil-fenilalanin ile aktive edilen insan polimorfonükleer lökositleri ve TAF ile aktive edilen P388D1 hücrelerinde sitozolik ve ayrıca intraselüler FLA₂'yi geri dönüşümsüz bir şekilde inhibe ettiği bildirilen IC₅₀ değerlerinin (0.01 ve 0.5 μ M) (164, 165, 167) altında veya üzerinde kullandığımız 0.1, 1 ve 10 μ g/ml (0.27, 2.7 ve 27 μ M) konsantrasyonlarda MAFF, endotoksin ile artan EC₅₀ değerini tüm konsantrasyonlarda azaltırken, azalan E_{maks} değerini ise değiştirmemiştir. MAFF tek başına kullanıldığında da 0.1, 1 ve 10 μ g/ml konsantrasyonlarda kontrol noradrenalin E_{maks} değerinde bir değişiklik yapmazken, EC₅₀ değerinde azalmaya neden olmuştur. Diğer yandan, MAFF tüm konsantrasyonlarda, endotoksin ile artan doku NO

miktarında azalmaya neden olmuştur; MAFF 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda tek başına kullanıldığında ise bazal doku NO miktarını da azaltmıştır. Selektif inhibitörler olan arakidonil triflorometil keton ve MAFF kullanılarak yapılan hücre kültürü çalışmalarında, endotoksinin sitozolik FLA₂ aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (168-176). Sıçan damar düz kas hücre kültüründe yapılan bir çalışmada ise, arakidonil triflorometil ketonun NO ile sitozolik FLA₂ aktivasyonunu ve aynı zamanda NO aracılıklı apoptozisi önlediği gösterilmiştir (177). Diğer yandan, Raw264.7 makrofaj hücrelerinde endotoksin ile NF-κB aracılığı ile artan iNOS ekspresyonu ve aktivitesinin selektif sekreter FLA₂ inhibitörleri ile önlenirken, selektif sitozolik FLA₂ inhibitörleri ile etkilenmediği gösterilmiştir (178). MAFF 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda tek başına kullanıldığında her ne kadar E_{maks} değerlerinde bir değişiklik oluşturmaya da kontrol noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sola kaymasına ve EC₅₀ değerlerinin azalmasına neden olmuştur. MAFF'nin bu etkisinin nedeni, damarlarda düz kas tonüsünün düzenlenmesinde önemli rolü olan EET'ler, PGI₂, PGD₂ ve PGE₂ gibi vazodilatör etkili arakidonik asit ürünlerinin oluşumunu önlemesi olabilir. MAFF 1 ve 10 µg/ml ile bazal doku nitrit miktarlarının azalmasının nedeni ise vazodilatör etkili prostaglandinler ile NO arasındaki sinerjistik etkileşimler olabilir. *Ex vivo* olarak endotoksemik sıçanlarda yapılan bir çalışmada, hipotansiyon, periferik vazodilatasyon ve vazokonstriktör maddeler ile oluşan vasküler hiporeaktiviteye iNOS kaynaklı NO dışında, K_{Ca} kanallarının aktivasyonuna neden bir başka ürün(ler) olabileceği ileri sürülmüştür (179). CYP'nin epoksijenaz ürünlerinden olan EET'lerin damar düz kasında K_{Ca} kanallarını açarak hiperpolarizasyona ve böylece vazodilatasyona neden olduğu bilinmektedir. Diğer yandan, CYP'nin ω-hidroksilaz ürünlerinden olan 20-HETE, damar düz kas hücrelerinde K_{Ca} kanallarını inhibe ederek vazodilatör EET'lerin etkisini önlerken, aynı zamanda PKC ve Rho kinaz aracılığı ile hücrenin kalsiyuma duyarlılığının artmasına ve böylece vazokonstriksiyona neden olmaktadır. Endotoksinin etkisi ile iNOS aktivitesindeki artış sonucunda aşırı miktarlarda oluşan NO ise bir yandan 20-HETE oluşumundan sorumlu CYP 4A1 enzimini inhibe ederek, diğer yandan da gerek direkt gerekse siklik GMP/PKG yolu aracılığı ile indirekt olarak 20-HETE'nin K_{Ca} kanallar üzerindeki etkisinin tersini oluşturarak vazodilatasyona neden olmaktadır (23). *Ex vivo* ve *in vitro* olarak yapılan çeşitli çalışmalarda, endotoksemi veya endotoksinin özellikle 20-HETE oluşumundan sorumlu CYP izoformlarının

ekspresyon ve/veya aktivitelerinde azalma oluşturduğu ve bu azalmanın NOS inhibitörleri ile geri çevrilebildiği bildirilmiştir (138, 139, 145, 180-183). Literatür ile birlikte tartışıldığında bulgularımız, torasik aorta preparatlarının endotoksin ile inkübasyonu sonucunda noradrenalin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sağa kayması ve kasılma yanıtlarının azalmasından, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde endotoksinin etkisi ile FLA₂ aktivitesinin artması sonucunda oluşumu artan vazodilatör etkili prostaglandinler ve CYP'nin epoksijenaz ürünlerinden EET'ler ile birlikte, iNOS aktivitesinin artması sonucunda oluşumu artan NO'nun sorumlu olduğunu göstermektedir.

Damar düz kaslarında yapılan çalışmalarda, α_1 - ve/veya α_2 -adrenerjik reseptörlerin aktivasyonun MAPK/ERK yolunu aktive ettiği bildirilmiştir (89, 184, 185-188). Aktive olan ERK'in ise kaldezmone molekülünü fosforile ederek aktinomyozin ATPaz'ın kalmodulin aracılıklı salıverilmesinin inhibisyonuna bağlı olarak düz kas kasılmasına neden olduğu gösterilmiştir (41, 189-191). Ancak, her ne kadar damar düz kas hücrelerinde fenilefrin ve noradrenalin gibi agonistlerin ERK yolunu aktive ettiği bildirilmişse de (41, 89, 185, 186), noradrenalin ile oluşan α -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılmalarda tirozin kinaz(lar) veya ERK yolunun katkısı ile bulgular çelişkilidir (89, 192, 193-196). Sıçan kuyruğundan izole edilen endotel tabakası uzaklaştırılmış arterlerde yapılan bir çalışmada, noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtlarının MEK1/2 inhibitörü U0126 (50 μ M) ile azaldığı gösterilmiştir (196). Çalışmamızda daha düşük konsantrasyonlarda kullanılan U0126 (0.1, 1 ve 10 μ g/ml; 0.23, 2.34 ve 23.44 μ M), endotoksin ile artan EC₅₀ değerini 0.1 μ g/ml konsantrasyonda azaltmış ve azalan E_{maks} değerini ise 10 μ g/ml konsantrasyonda artırmıştır. U0126 tek başına kullanıldığında ise 0.1, 1 ve 10 μ g/ml konsantrasyonlarda kontrol noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sola kaymasına neden olmuş, ayrıca noradrenalin EC₅₀ değerinde bir değişiklik oluşturmazken, 1 ve 10 μ g/ml konsantrasyonlarda kontrol noradrenalin E_{maks} değerini azaltmıştır. Diğer yandan, U0126 0.1 ve 10 μ g/ml konsantrasyonlarda, endotoksin ile artan doku NO miktarında azalmaya neden olmuştur; U0126 0.1 ve 10 μ g/ml konsantrasyonlarda tek başına kullanıldığında ise bazal doku NO miktarında bir değişiklik oluşturmamıştır. Sıçan torasik aorta düz kas hücre kültüründe yapılan bir çalışmada, 100 μ g/ml konsantrasyonda kullanılan

endotoksinin ERK1/2 fosforilasyonuna neden olduğu, fosforilasyon üzerindeki etkisinin 30 dakikada maksimuma ulaştığı ve 4 saat devam ettiği, ayrıca ERK1/2 aktivasyonunun spesifik MEK inhibitörü PD98059 ile önlenemediği gösterilmiştir (36). Aynı araştırmacılar, ayrıca, endotoksinin İκB yıkımı ve NF-κB aktivasyonuna da neden olduğunu, ancak endotoksinin bu etkisinin PD98059 ile önlenemediğini bildirmişlerdir. Sıçan damar düz kas hücre kültüründe yapılan diğer çalışmalarda ise, İL-1β ile geçici olarak NF-κB aktivitesinin artmasının ardından iNOS ekspresyon ve aktivitesindeki artışın ERK fosforilasyonunun selektif inhibitörleri olarak kullanılan PD98059 (20 μM) ve U0126 (20 μM) ile inhibe edilebildiği gösterilmiştir (197, 198). Benzer sonuçlar, İL-1β ile uyarılan sıçan kardiyak miyositlerinde iNOS ve COX-2 için bildirilmiştir (199). Diğer yandan, Komalavilas ve ark. (200)'nin sıçan aort düz kas hücre kültüründe yaptıkları bir çalışmada, NO/siklik GMP yolunda siklik GMP'ye bağımlı bir kinaz olan PKG'nin MEK1/2'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Hücre kültürlerinde NO'nun ERK1/2 aktivasyonuna neden olduğunu gösteren başka çalışmalar da bulunmaktadır (201). *Madine-Darby canine kidney* (MDCK) hücreleri ile yapılan bir çalışmada, U0126 (10 μM) ile MEK1/2 inhibe edildiğinde ATP ve iyonmisine yanıt olarak arakidonik asit salıverilmesinin inhibe edildiği de gösterilmiştir (202). Araştırmacılar, sitozolik FLA₂'nin membran fosfolipidlerini hidroliz etme yeteneğinin MEK/ERK yolunun inhibisyonu ile azaldığını ve MEK/ERK aktivitesindeki bu azalmanın sitozolik FLA₂'nin fosforilasyonu ve membrana translokasyonundan bağımsız olduğunu ileri sürmüşlerdir. U0126 ile MEK/ERK yolunun inhibisyonu sonucunda elde edilen bu bulgular, çalışmamızda U0126 ile gördüğümüz MEK/ERK yolunun inhibisyonunun endotoksin ile oluşan vasküler hiporeaktivitede yaptığı düzelmeyi ve aynı zamanda doku NO miktarlarındaki azalmayı kısmen açıklayabilmektedir. Literatür ile birlikte tartışıldığında bulgularımız, torasik aorta preparatlarının endotoksin ile inkübasyonu sonucunda noradrenalin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sağa kaymasından, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde endotoksinin etkisi ile aktive olan MEK1/2 ve ardından ERK1/2 aktivasyonu sonucunda NF-κB aracılığı ile ekspresyonu ve aktivitesi artan iNOS ve ondan oluşan NO'nun sorumlu olabileceğini göstermektedir. Diğer yandan, gerek kontrol gerek endotoksin gruplarında kasılma yanıtlarının azalmasından ise, NO'dan çok, MEK1/2 ve ardından ERK1/2 aktivasyonu sonucunda

kaldezman aracılıklı düz kasılması ile ilgili olaylarının baskılanması önemli rol oynayabilir.

Sonuç olarak, G_q proteini ile kenetli olan α -adrenerjik reseptör agonisti noradrenalin ile selektif iNOS inhibitörü 1,3-PBIT, selektif sitozolik FLA₂ inhibitörü MAFF ve selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 kullanılarak yapılan bu çalışmanın bulgularına göre (1) endotoksin ile 4 saat inkübe edilen torasik aortada α -adrenerjik reseptör aracılıklı kasılma yanıtları azalmaktadır, (2) vasküler hiporeaktiviteden endotel ve/veya düz kas hücrelerinde endotoksinin etkisi ile iNOS aktivitesinin artması sonucunda oluşumu artan NO ve sitozolik FLA₂ aktivitesinin artması sonucunda oluşumu artan vazodilatör etkili FLA₂ yolu ürünleri sorumlu olabilir, (3) endotoksinin etkisi ile oluşumu artan vazodilatör etkili FLA₂ ürünlerinin iNOS aktivitesi ve NO oluşumunu artırıcı yönde olan ürün düzeyindeki etkileşmeler vasküler hiporeaktiviteye katkı sağlayabilir ve (4) endotoksin ile ekspresyonu ve/veya aktivitesi artan MEK1/2 ile ilişkili vazodilatör ürünlerden biri iNOS kaynaklı NO olabilir ve vasküler hiporeaktiviteden NO ve MEK1/2 aracılıklı vazokonstriksiyona aracılık eden olayların baskılanması sorumlu olabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Endotoksinin etkisi ile sıçan torasik aortu endotel ve/veya düz kas hücrelerinde iNOS ve sitozolik FLA₂ aktivitesinin artması sonucunda oluşumu artan NO ve vazodilatör etkili FLA₂ yolu ürünleri ve bu ürünler arasındaki sinerjistik etkileşmelerin vasküler hiporeaktivitede rolü vardır. Ayrıca, MEK1/2 ekspresyonu ve/veya aktivitesinin artması ile ilişkili vazodilatasyon ve vazokonstriksiyona aracılık eden olayların da hiporeaktiviteye katkısı olabilir. Yapılan literatür taramasında, spesifik MEK1/2 ile sitozolik FLA₂ inhibitörlerinin, sepsiste görülen vasküler hiporeaktivite üzerindeki etkilerine yönelik bir çalışmaya rastlanmadığından, ilk kez yapılan bu çalışmanın sonuçlarının literatüre katkısı önemli olacaktır.

In vitro olarak yapılan bu çalışmada, sıçan torasik aorta preparatlarının endotoksin ile 4 saat inkübasyonu sonucunda noradrenalin ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin sağa kayması ve kasılma yanıtlarının azalmasından sorumlu olan iNOS ve NO'nun kaynağının endotel ve/veya düz kas hücresi olup olmadığının anlaşılabilmesi için, endotel tabakası uzaklaştırılmış preparatlarda çalışılması gerekmektedir. Aort düz kasında endotoksin ile aktive olduğu düşünülen MEK1/2 ile ilişkili vazodilatasyona ve vazokonstriksiyona aracılık eden mekanizmaların birbirinden ayırt edilebilmesi için fosforile ERK1/2 ekspresyon düzeylerinin de ölçülmesi gerekmektedir. Ayrıca, iNOS inhibitörü ile birlikte sitozolik ve intraselüler FLA₂ ve/veya ERK1/2 inhibitörlerinin birlikte kullanılması da vazodilatör/ vazokonstriktör ürünlerin ve aralarındaki etkileşmelerin endotoksin ile oluşan vasküler hiporeaktivitedeki rollerinin nasıl olduğunu netleştirebilecektir. Diğer yandan, iNOS ile birlikte sitozolik FLA₂, COX-2, CYP 4A ve ERK1/2 enzim ekspresyon ve aktivitesinin ölçümü ile yapılacak olan çalışmalar ile de, endotoksin ile oluşan vasküler hiporeaktivitede NO, prostaglandinler, EET'ler ve 20-HETE'nin rolleri açıklığa kavuşturulabilecektir. Bu çalışmalar tamamlandıktan sonra elde edilecek bulgulara göre, endotoksemik sıçanlarda enzim inhibitörleri ile *in vivo* veya *ex vivo* çalışmalar yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D.** Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*, 2001; 53:135-159.
2. **Roerig S, Wolf, R, Grisham MB.** Nitric oxide, chronic joint inflammation, and pain. In: Ignarro LJ. Eds. *Nitric oxide: biology and pathobiology*, California: Academic Press, 2000:873-894.
3. **Szabo, C.** Pathophysiological roles of nitric oxide in inflammation. In: Ignarro LJ. Eds. *Nitric oxide: biology and pathobiology*, California: Academic Press, 2000:841-872.
4. **Zamora, R, Vodovotz Y, Billiar TR.** Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med*, 2000; 6:347-373.
5. **Feihl F, Waeber B, Liaudet L.** Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacol Ther*, 2001; 91: 179-213.
6. **Fretland DJ, Connor JR, Pitzele BS, Currie MG, Manning PT.** Inhibition of nitric oxide synthase and prospects for therapy in inflammatory diseases. *Curr Pharm Des*, 1997; 3:447-462.
7. **Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S.** Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999; 39:191-220.
8. **Ruetten H, Thiemermann C.** Nitric oxide and septic shock. In: Ignarro LJ. Eds. *Nitric oxide: biology and pathobiology*, California: Academic Press, 2000:747-757.
9. **Wolfe TA, Dasta JF.** Use of nitric oxide synthase inhibitors as a novel treatment for septic shock. *Ann Pharmacother*, 1995; 29:36-46.
10. **Vallance P, Rees D, Moncada S.** Nitric Oxide. In: Born GVR, Cuatrecasas P, Ganten D, Herken H, Starke K, Taylor P. Eds. *Handbook of experimental pharmacology*, Berlin Heidelberg: SpringerVerlag, 2000:385-397.
11. **Preiser, JC.** Role of nitric oxide in cardiovascular alterations. *Sepsis*, 2000; 4:99-109.
12. **Cobb MH.** MAP kinase pathways. *Prog Biophysics Mol Biol*, 1999; 71:479-500.
13. **Dong C, Davis RJ, Flavell RA.** MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*, 2002; 20:55-72.

14. **Hagemann C, Blank JL.** The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal*, 2001;13(12):863-875.
15. **Kolch W.** Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, 2000; 35(2):289-305.
16. **Lowes VL, Ip NY, Wong YH.** Integration of signals from receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors. *Neurosignals*, 2002; 11:5-19.
18. **Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G.** Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J*, 2001; 15(12):2057-2072.
19. **Turini ME, DuBois RN.** Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med*, 2002; 53:35-57.
20. **Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC.** Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161:1781-1785.
21. **West MA, Heagy W.** Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med*, 2002; 30(1):S64-S73.
22. **Goodwin DC, Landino LM, Marnett LJ.** Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J*, 1999; 13:1121-1136.
23. **Roman RJ.** P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*, 2002; 82:131-185.
24. **Arbabi S, Maier RV.** Mitogen-activated protein kinases. *Crit Care Med*, 2002; 30(1):S74-S79.
25. **Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA.** Regulation and inhibition of phospholipaseA₂. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999; 39:175-189.
26. **English JM, Cobb MH.** Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci*, 2002; 23(1):40-45.
27. **Bone HG.** Nitric oxide synthase inhibition in septic shock-a question of the right time, the right drug, and the right model? *Crit Care Med*, 1998; 26(12):1945-1947.
28. **Heller A, Koch T, Schmeck J, van Ackern K.** Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs*, 1998; 55(4):487-496.

29. **Scott KF, Bryant KJ, Bidgood MJ.** Functional coupling and differential regulation of the phospholipase A₂-cyclooxygenase pathways in inflammation. *J Leukoc Biol*, 1999; 66(4):535-541.
30. **Tunçtan B, Altug S.** The use of nitric oxide synthase inhibitors in inflammatory diseases: a novel class of anti-inflammatory agents. *Current Medicinal Chemistry: Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents (baskıda)* 2004;3.
31. **Durando MM, Meier KE, Cook JA.** Endotoxin activation of mitogen-activated protein kinase in THP-1 cells; diminished activation following endotoxin desensitization. *J Leukoc Biol*, 1998; 64(2):259-264.
32. **Kan W, Zhao KS, Jiang Y, Yan W, Huang Q, Wang J, Qin Q, Huang X, Wang S.** Lung, spleen, and kidney are the major places for inducible nitric oxide synthase expression in endotoxic shock: role of p38 mitogen-activated protein kinase in signal transduction of inducible nitric oxide synthase expression. *Shock*, 2004; 21(3):281-287.
33. **Schumann RR, Pfeil D, Freyer D, Buerger W, Lamping N, Kirschning CJ, Goebel UB, Weber JR.** Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2, and p38 in astrocytes. *Glia*, 1998; 22(3):295-305.
34. **Wang PL, Sato K, Oido M, Fujii T, Kowashi Y, Shinohara M, Ohura K, Tani H, Kuboki Y.** Involvement of CD14 on human gingival fibroblasts in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-mediated interleukin-6 secretion. *Arch Oral Biol*, 1998; 43(9):687-694.
35. **Watters JJ, Sommer JA, Pfeiffer ZA, Prabhu U, Guerra AN, Bertics PJ.** A differential role for the mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide signaling: the MEK/ERK pathway is not essential for nitric oxide and interleukin 1beta production. *J Biol Chem*, 2002; 277(11):9077-9087.
36. **Yamakawa T, Eguchi S, Matsumoto T, Yamakawa Y, Numaguchi K, Miyata I, Reynolds CM, Motley ED, Inagami T.** Intracellular signaling in rat cultured vascular smooth muscle cells: roles of nuclear factor-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase on tumor necrosis factor-alpha production. *Endocrinology*, 1999; 140(8):3562-3572.
37. **Chen CC, Wang JK.** p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol*, 1999; 55(3):481-488.
38. **Nishiya T, Uehara T, Edamatsu H, Kaziro Y, Itoh H, Nomura Y.** Activation of Stat1 and subsequent transcription of inducible nitric oxide synthase gene in C6 glioma cells is independent of interferon-gamma-induced MAPK activation that is mediated by p21ras. *FEBS Lett*, 1997; 408(1):33-38.
39. **Kim SH, Kim J, Sharma RP.** Inhibition of p38 and ERK MAP kinases blocks endotoxin-induced nitric oxide production and differentially modulates cytokine expression. *Pharmacol Res*, 2004; 49(5):433-439.

40. **Adam LP, Franklin MT, Raff GJ, Hathaway DR.** Activation of mitogen-activated protein kinase in porcine carotid arteries. *Circ Res*, **1995**; 76(2):183-190.
41. **Dessey C, Kim I, Sougnez CL, Laporte R, Morgan KG.** A role for MAP kinase differentiated smooth muscle contraction evoked by α -adrenoceptor stimulation. *Am J Physiol*, **1998**; 275:C1081-C1086.
42. **Khalil RA, Morgan KG.** PKC-mediated redistribution of mitogen-activated protein kinase during smooth muscle cell activation. *Am J Physiol*, **1993** ; 265(2 Pt 1):C406-C411.
43. **Menice CB, Hulvershorn J, Adam LP, Wang CA, Morgan KG.** Calponin and mitogen-activated protein kinase signaling in differentiated vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, **1997**; 272(40):25157-25161.
44. **Mii S, Khalil RA, Morgan KG, Ware JA, Kent KC.** Mitogen-activated protein kinase and proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **1996**; 270(1 Pt 2):H142-50.
45. **Suhasini M, Li H, Lohmann SM, Boss GR, Pilz RB.** Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*, **1998**; 18(12):6983-6994.
46. **Yu SM, Hung LM, Lin CC.** cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation*, **1997**; 95(5):1269-1277.
47. **Gorene I, Su X, Moreland RS.** Inhibition of p42 and p44 MAP kinase does not alter smooth muscle contraction in swine carotid artery. *Am J Physiol*, **1998**; 275(1 Pt 2):H131-H138.
48. **Ganster R W, Geller D A.** *Molecular regulation of inducible nitric oxide* In: Ignarro LJ Eds. *Nitric oxide, biology and pathobiology* A.B.D: Academic Press, **2000**: 129-156.
49. **Lincoln TM, Komalavilas P.** Cyclic GMP-mediated signaling mechanisms in smooth muscle. In: Ignarro LJ Eds. *Nitric oxide, biology and pathobiology*, A.B.D:Academic Press, **2000**:401-425
50. **Kim S, Iwao H.** Stress and vascular responses: mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 as promising therapeutic targets of vascular remodeling. *J Pharmacol Sci*, **2003**; 91(3):177-181.
51. **Torres M, Forman HJ.** Nitric oxide, oxidative stress and signal transduction In: Ignarro LJ Eds. *Nitric Oxide, biology and pathobiology*, A.B.D:Academic Press, **2000**:329-343.
52. **Perez J, Dellinger P.** Sepsis definitions. *Evolving Concepts In Sepsis And Septic Shock*. A.B. D.: Kluwer Academic Publishers, **2001**: 1-15.

53. **Lazaron V, Barke RA.** Gram-negative bacterial sepsis and the sepsis syndrome. *Urol Clin North Am*, 1999; 26(4):687-699.
54. **Young LS.** Sepsis syndrome. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Eds. *Principles and practice of infectious diseases*, 5th Ed. New York: Churchill Livingstone, 2000:806-819.
55. **Astiz ME, Rackow EC.** Septic shock. *Lancet*, 1998; 351:1501-1505.
56. **Carlstedt F, Lind L.** Hypocalcemic syndromes. *Crit Care Clin*, 2001; 17(1):139-153.
57. **Appelmeik BJ, Lynn WA.** The cause of sepsis: bacterial cell components that trigger the cytokine cascade. In: Dhainaut JF, Thijs LG, Park G. Eds. *Septic shock*, 1st Ed. Çin: W.B Saunders Co, 2000:21-26.
58. **Carlson RW, Geheb M.** Sepsis and septic shock. *Critical Care Clinics*, 2000; 16(2):198-200.
59. **Kang-Birken SL, Dipiro JT.** Sepsis and septic shock. In: Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. Eds. *Pharmacotherapy*, 5th Ed. A.B.D: McGraw-Hill Medical Publishing, 2002:2029-2034.
60. **Dinarelo C.** Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr Topics Microbiol Immunol*, 1996; 216:135-165.
61. **Pugin J.** Toll like receptors. In: Eichacker PQ, Pugin J. Eds. *Evolving concepts in sepsis and septic shock*, 1st Ed. A.B.D: Kluwer Academic Publishers, 2001:28-33.
62. **Pugin J, Schürer-Maly C, Leturco D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS.** Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci*, 1993; 90:2744-2748.
63. **Thiermann C.** Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol*, 1997; 29(2):159-166.
64. **Suba EA, McKenna TM, Williams TJ.** In vivo and in vitro effects of endotoxin on vascular responsiveness to norepinephrine and signal transduction in the rat. *Circ Shock*, 1992; 36:127-133.
65. **Appelmeik BJ, An YQ, Thijs BG, Maclaren DM, de Graaff J.** Recombinant human bactericidal/ permeability-increasing protein (rBPI₂₃) is a universal lipopolysaccharide binding ligand. *Infect Immunity*, 1994; 62(8):3564-3567.
66. **Bone RC.** Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med*, 1996; 125(8):680-687.

67. **Astiz M, Saha D, Lustbader D, Lin R, Rackow E.** Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *J Lab Clin Med*, **1996**; 128(6):594-600.
68. **Klosterhalfen B, Bhardwaj RS.** Septic shock. *Gen Pharmacol*, **1998**; 31(1):25-32.
69. **Parillo JE.** Pathogenetic mechanisms of septic shock. *New Engl J Med* , **1993**; 328:1471-1477.
70. **Bone RC.** The sepsis syndrome. Definition and general approach to management. *Clin Chest Med*, **1996**; 17:175-181.
71. **Crouser ED, Dorinsky PM.** Metabolic consequences of sepsis. Correlation with altered intracellular calcium homeostasis. *Clin Chest Med*, **1996**; 17:249-261.
72. **Elasser S, Schächinger H, Werner S.** Adjunctive drug treatment in severe hypoxic respiratory failure. *Drugs*, **1999**; 58:429-446.
73. **Castillo L, Sanchez M.** Septic shock: pathogenesis and treatment. *Indian J Pediatr*, **1993**; 60:367-379.
74. **Oh HML.** Emerging therapies for sepsis and septic shock. *Ann Acad Med*, **1998**; 27:738-743.
75. **Kilbourn RG, Traber DL, Szabó C.** Nitric oxide and shock. *Dis Mon*, **1997**; 43:277-348.
76. **Brady AE, Limbird LE.** G protein-coupled receptor interacting proteins: Emerging roles in localization and signal transduction. *Cell Signal*, **2002**; 297:309.
77. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Cell communication. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P Eds. *Molecular biology of the cell*. 4th Ed. A.B.D: Garland Science, **2002**; 850-870.
78. **Rang HP, Dale MM, Ritter SM, Gardner P.** *Pharmacology*, 4th Ed. A B.D: Churchill Livingstone, **2001**:19-46.
79. **Brody TM, Garrison JC.** Sites of action: receptors. *Human pharmacology molecular to clinical*, 3th Ed. A.B.D: Mosby, **1998**: 9-25.
80. **Kayaalp O.** *Tıbbi Farmakoloji*. 9. Baskı, Ankara: Feryal Matbaacılık, **2000**: 1117-1135.
81. **Bourne HR.** Drug receptors & pharmacodynamics. *Basic & clinical pharmacology*. 7th Ed. A.B.D: Appleton & Lange, **1998**:9-33.
82. **Radhika V, Dhanasekaran N.** Transforming G proteins. *Oncogene*, **2001**; 20:1607-1614.

83. **Brown DA.** G proteins. In: Foreman JC, Johansen T. Eds. *The textbook of receptor pharmacology*, 2nd Ed. A.B.D: CRC Press, **2003**:213-220.
84. **Michelotti GA, Price DT, Schwinn DA.** α_1 -Adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics*, **2000**; 88:281-309.
85. **Horie K, Itoh H, Tsujimoto G.** Hamster alpha 1B-adrenergic receptor directly activates Gs in the transfected Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol*, **1995**; 48:392-400.
86. **Guarino RD, Perez DM, Piascik MT.** Recent advances in the molecular pharmacology of the alpha 1-adrenergic receptors. *Cell Signal*, **1996**; 8:323-333.
87. **Gürdal H, Tilakaratne N, Brown RD, Fonseca M, Friedman E, Johnson MD.** The expression of alpha 1 adrenoceptor subtypes changes with age in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, **1995**; 275:1656-1662.
88. **Miller JW, Hu ZW, Okazaki M, Fujinaga M, Hoffman BB.** Expression of alpha 1 adrenergic receptor subtype mRNAs in th rat cardiovascular system with aging. *Mech Ageing Dev*, **1996**; 87:75-89.
89. **Xin X, Yang N, Eckhart AD, Faber JE.** α_{1D} -adrenergic receptors and mitogen activated protein kinase mediate increased protein synthesis by arterial smooth muscle. *Mol Pharmacol*, **1997**; 51:764-775.
90. **Piascik MT, Guarino RD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL Jr, Perez DM.** The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995; 275(3):1583-1589.
91. **Marinissen MJ, Gutkind JS.** G protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*, **2001**; 22(7):368-376.
92. **Devi LA.** Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci*, **2001**; 22(10):532-537.
93. **Ilasaca ML.** Signaling from G-protein coupled receptors to mitogen activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol*, **1998**; 56:269-277.
94. **Gutkind JS.** Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*, **1998**; 17:1331-1342.
95. **Hawes BE, van Biesen T, Koch WJ, Luttrell LM, Lefkowitz RJ.** Distinct pathways of G_i and G_q mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, **1995**; 270(29):17148-17153.

96. **Garrington TP, Johnson GL.** Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Cell Biol*, 1999; 11:211-218.
97. **Pelaia G, Cuda G, Varella A, Fratto D, Tagliaferri P, Maselli R, Costanzo FS, Marsico SA.** Mitogen-activated protein kinases: New molecular targets for pharmacological treatment of inflammatory lung diseases. *Curr Med Che.-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*, 2003; 2:131-141.
98. **Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Brecher P, Cohen RA.** Temporal control of NF-kappaB activation by ERK differentially regulates interleukin-1beta-induced gene expression. *J Biol Chem*, 2004;279(2):1323-1329.
99. **Hu ZW, Shi XY, Lin RZ, Chen J, Hoffman BB.** alpha1-Adrenergic receptor stimulation of mitogenesis in human vascular smooth muscle cells: role of tyrosine protein kinases and calcium in activation of mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999; 290(1):28-37.
100. **Cain AE, Tanner DM, Khalil RA.** Endothelin-1-induced enhancement of coronary smooth muscle contraction via MAPK dependent and MAPK independent $[Ca^{2+}]_i$ sensitization pathways. *Hypertension*, 2002; 39:543-549.
101. **D'Angelo G, Adam LP.** Inhibition of ERK attenuates force development by lowering myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002; 282:H602-H610.
102. **Taketo MM, Sonoshita M.** Phospholipase A₂ and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 2002; 55972:1-5.
103. **Kudo I, Murakami M.** Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002; 68(69):3-58.
104. **Murakami M, Kudo I.** Recent advances in molecular biology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res*, 2004; 43:3-35.
105. **Underwood KW, Song C, Kriz RW, Chang XJ, Knopf JL, Lin LL.** A novel calcium independent phospholipase A₂, cPLA₂-γ, that is prenylated and contains homology to cPLA₂. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998; 273(34):21926-21932.
106. **Song C, Chang XJ, Bean KM, Proia MS, Knopf JL, Kriz RW.** Molecular characterization of cytosolic phospholipase A₂-β. *J Biol Chem*, 1999; 274(24):17063-17067.
107. **Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL.** A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, 1991; 65(6):1043-1051.
108. **Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA.** Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Letters*, 2002; 531:2-6.

109. **Capper EA, Marshall LA.** Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *Prog Lipid Res*, 2001; 40(3):167-197.
110. **Gijon MA, Leslie CC.** Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. *J Leukoc Biol*, 1999; 65(3):330-6.
111. **Nathan C, Xie QW.** Nitric oxide synthases: roles, tolls, controls. *Cell*, 1994; 78:915-918.
112. **Kleinert H, Boissel J-P, Schwarz P M, Förstermann U.** Regulation of the expression of nitric oxide synthase isoforms. In: Ignarro LJ Eds. *Nitric oxide, biology and pathobiology* A.B.D: Academic Pres, 2000: 105-128.
113. **Masters BS.** Structural variations to accomodate functional themes of the isoforms of nitric oxide synthase. In: Ignarro LJ Eds. *Nitric oxide, biology and pathobiology* A.B.D: Academic Pres, 2000: 91-104.
114. **Kirkebøen KA, Strand ØA.** The role of nitric oxide in sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1999; 43:275-288.
115. **Calver A, Collier J, Vallance P.** Nitric oxide and cardiovascular control. *Exp Physiol*, 1993; 78:303-326.
116. **Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO.** Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg*, 1995; 82:1598-1610.
117. **Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S.** Endogenous NO inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 1987; 2:1057-1058.
118. **Tunçtan B, Altuğ S, Uludağ O, Abacıoğlu N.** Effects of econazole on receptor-operated and depolarization-induced contractions in rat isolated aorta. *Life Sci*, 2000; 67:2393-2402
119. **Tsukahara T, Hongo K, Kassell NF, Ogawa H.** Characterization of muscarinic cholinergic receptors on the endothelium and the smooth muscle of the rabbit thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1989; 13:870-878.
120. **Tunçtan B, Altuğ S, Uludağ O, Demirkay B, Abacıoğlu N.** Effects of cyclooxygenase inhibitors on nitric oxide production and survival in a mice model of sepsis. *Pharmacol Res*, 2003; 48:37-48
121. **Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA.** Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981; 218:739-749.

122. **Malta E.** Studies on the biphasic relaxant curve of glyceryl trinitrate in rat aorta: role of GTN metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **1989**; 16(11):829-385.
123. **Grissom TE, Bina S, Hart J, Muldoon SM.** Effect of phenlephrine-induced vascular smooth muscle contractions in endotoxin-exposed rat aortic rings. *Crit Care Med*, **1996**; 24(2):287-293.
124. **Wileman SM, Mann GE, Baydoun AR.** Induction of L-arginine transport and nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells: synergistic actions of proinflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol*, **1995**; 116(8):3243-3250.
125. **Zhou J, Struthers A D, Lyles G A.** Differential effects of some cell signalling inhibitors upon nitric oxide synthase expression and nuclear factor-kappaB activation induced by lipopolysaccharide in rat aortic smooth muscle cells. *Pharmacol Res*, **1999**; 39(5):363-733.
126. **Wylam ME, Metkus AP, Umans JG.** Nitric oxide dependent and independent effects of in vitro incubation or endotoxin on vascular reactivity in rat aorta. *Life Sci*, **2001**; 69:455-467.
127. **Tunçtan B, Weigl Y, Dotan A, Peleg L, Zengil H, Ashkenazi I, Abacıoğlu N.** Circadian variation of nitric oxide synthase activity in mouse tissue. *Chronobiol Int* **2002**;19(2), 393-394.
128. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **1976**; 72:248-254.
129. **Barnett V, Lewis T, Rothamsted V.** Outliers in statistical data (Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics. Applied Probability and Statistics) John Wiley & Sons, **1994**.
130. **Beasley D, Cohen RA, Levinsky NG.** Endotoxin inhibits contraction of vascular smooth muscle in vitro. *Am J Physiol*, **1990**; 258:H1187-H1192.
131. **Beasley D.** Interleukin 1 and endotoxin activate soluble guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Am J Physiol*, **1990**; 259:R38-R44.
132. **Garvey EP, Oplinger JA, Tanoury GJ, Sherman PA, Fowler M, Marshall S, Harmon MF, Paith JE, Furfine ES.** Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. *J Biol Chem*, **1994**; 269(43):26669-26676.
133. **Ichihara A, Hayashi M, Navar GL, Saruta T.** Inducible nitric oxide synthase attenuates endothelium-dependent renal microvascular vasodilation. *J Am Soc Nephrol*, **2000**; 11:1807-1812.
134. **Pérez-Sala D, Lamas S.** Regulation of cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide in cells. *Antioxid Red*, **2001**; 3:231-248 .
135. **Arons MM, Wheeler AP, Bernard GR, Christman BW, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, Fulkerson W, Wright P, Dupont WD, Swindell BB.** Effect of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. Ibuprofen in sepsis study group. *Crit Care Med*, **1999**; 27:699-707.

136. **Tunçtan B, Uludağ O, Altuğ S, Abacıoğlu N.** Effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Pharmacol Res*, **1998**; 38(5):405-411.
137. **Tunçtan B, Altuğ S, Uludağ O, Abacıoğlu N.** Time-dependent variations in serum nitrite, 6-keto-prostaglandin F_{1α} and thromboxane B₂ levels induced by lipopolysaccharide in mice. *Biol Rhythm Res*, **2000**; 31(4):499-514.
138. **Tunçtan, B, Yaghini, FA, Estes A, Malik KU.** Prostaglandins inhibit cytochrome P450 4A activity and contribute to endotoxin-induced hypotension in rats via nitric oxide production. *Experimental Biology: Translating to Genome*. Washington DC, April 17-21 **2004**:A1034.
139. **Tunçtan B, Yaghini FA, Estes A, Malik KU.** Inhibition by nitric oxide of cytochrome P450 4A activity contributes to endotoxin-induced hypotension in rats. *Experimental Biology: Translating to Genome*, Washington DC, April 17-21 **2004**:A1037.
140. **Sewer MB, Koop DR, Morgan ET.** Differential inductive and suppressive effects of endotoxin and particulate irritants on hepatic and renal cytochrome P-450 expression. *J Pharmacol Exp Ther*, **1997**; 280(3):1445-1454.
141. **Mitchell SR, Sewer MB, Kardar SS, Morgan ET.** Characterization of CYP4A induction in rat liver by inflammatory stimuli: dependence of sex, strain, and inflammation-evoked hypofagia. *Drug Metab Dispos*, **2001**; 29:17-22.
142. **Renton KW, Nicholson TE.** Hepatic and central nervous system cytochrome p450 are downregulated during lipopolysaccharide-evoked localized inflammation in brain. *J Pharmacol Exp Ther*, **2000**; 294:524-530.
143. **Sewer MB, Morgan ET.** Down-regulation of the expression of three major rat liver cytochrome P450s by endotoxin in vivo occurs independently of nitric oxide production. *J Pharmacol Exp Ther*, **1998**; 287:352-358.
144. **Sewer MB, Koop DR, Morgan ET.** Differential inductive and suppressive effects of endotoxin and particulate irritants on hepatic and renal cytochrome P-450 expression. *J Pharmacol Exp Ther*, **1996**; 280:1445-1454.
145. **Takemura S, Minamiyama Y, Imaoka S, Funae Y, Hirohashi K, Inoue M, Kinoshita H.** Hepatic cytochrome P450 is indirectly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J Hepatol*, **1999**; 30:1035-1044.
146. **Marotta P, Sautebin L, Di Rosa M.** Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774.2 cells. *Br J Pharmacol*, **1992**; 107:640-641.
147. **Raddasi K, Petit JF, Lemaire G.** LPS-induced activation of primed murine peritoneal macrophages is modulated by prostaglandins and cyclic nucleotides. *Cell Immunol*, **1993**; 149:50-64.

148. Gaillard T, Mulsch A, Klein H, Decker K. Regulation by prostaglandin E₂ of cytokine-elicited nitric oxide synthesis in rat liver macrophages. *Biol Chem*, 1992; 373:897-902.
149. Milano S, Arcoleo F, Dieli M, D'Agostino R, D'Agostino P, De Nucci G, et al. Prostaglandin E₂ regulates inducible nitric oxide synthase in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins*, 1995; 49:105-115.
150. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90:7240-7244.
151. Lapointe MC, Sitkins JR. Phospholipase A₂ metabolites regulate inducible nitric oxide synthase in myocytes. *Hypertension*, 1998; 31:218-224.
152. Watkins DN, Garlepp MJ, Thompson PJ. Regulation of the inducible cyclo-oxygenase pathway in human cultured airway epithelial (A549) cells by nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 1997; 121(7):1482-8.
153. Soler M, Camacho M, Molins-Pujol AM, Vila L. Effect of an imidazolineoxyl nitric oxide on prostaglandin synthesis in experimental shock: possible role of nitrogen dioxide in prostacyclin synthase inactivation. *J Infect Dis*, 2001; 183:105-112.
154. Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br J Pharmacol*, 1995; 114:1171-1178.
155. Sautebin L, Di Rosa M. Nitric oxide modulates prostacyclin biosynthesis in the lung of endotoxin-treated rats. *Eur J Pharmacol*, 1994; 262:193-196.
156. Amin AR, Vyas P, Aattur M, Leszczynska-Piziak J, Patel I, Weissmann G, et al. The mode of action of aspirin-like drugs: effect on inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 92:7926-7930.
157. Habib A, Bernard C, Leuret M, Creminon C, Esposito B, Tedgui A, et al. Regulation of the expression of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in rat peritoneal macrophages. *J Immunol*, 1997; 158:3845-3851.
158. Swierkosz TA, Mitchell JA, Warner TD, Botting RM, Vane JR. Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. *Br J Pharmacol*, 1995; 114:1335-1342.
159. Clancy R, Varenika B, Huang W, Ballou L, Attur M, Amin AR, Abromson SB. Nitric oxide synthase/COX cross-talk: Nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2 derived prostaglandin production. *J Immunol*, 2000; 165:1582-1587.
160. Boquet M, Cebal E, Motta A, Beron De Astrada M, Gimeno MA. Relationship between mouse uterine contractility, nitric oxide and prostaglandin production in early pregnancy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1998; 59:163-167.

161. **Curtis JF, Reddy NG, Mason RP, Kalyanaraman B, Eling TE.** Nitric oxide: a prostaglandin H synthase 1 and 2 reducing cosubstrate that does not stimulate cyclooxygenase activity or prostaglandin H synthase expression in murine macrophages. *Arch Biochem Biophys*, **1996**; 335:369-376.
162. **Hamilton LC, Warner TD.** Interactions between inducible isoforms of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in vivo: Investigations using the selective inhibitors, 1400W and celecoxib. *Br J Pharmacol*, **1998**; 125:335-340.
163. **Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ.** Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**; 93:15069-15074.
164. **Balsinde J, Dennis E A.** Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A₂ enzymes present in P388D1 macrophages. *J Biol Chem*. **1996**; 271(12): 6758-6765.
165. **Lio YC, Reynolds LJ, Balsinde J, Dennis EA.** Irreversible inhibition of Ca⁽²⁺⁾-independent phospholipase A₂ by methyl arachidonyl fluorophosphonate. *Biochim Biophys Acta*, **1996**; 1302(1):55-60.
166. **El Mahdani NE, Ameyar M, Cai Z, Colard O, Masliah J, Chouaib.** Resistance to TNF-induced cytotoxicity correlates with an abnormal cleavage of cytosolic phospholipase A₂. *J Immunol*, **2000**; 165:6756-6761.
167. **Surette M E, Dallaire N, Jean N, Picard S, Borgeat P.** Mechanisms of the priming effect of lipopolysaccharides on the biosynthesis of leukotriene B₄ in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. *FASEB J*, **1998**; 12:1521-1531.
168. **Vivancos M, Moreno JJ.** Role of Ca⁽²⁺⁾-independent phospholipase A₂ and cyclooxygenase/lipoxygenase pathways in the nitric oxide production by murine macrophages stimulated by lipopolysaccharides. *Nitric Oxide*, **2002**; 6(3):255-262.
169. **Nagase T, Uozumi N, Aoki-Nagase T, Terawaki K, Ishii S, Yomita T, Yamamoto H, Hashizume K, Ouchi Y, Shimizu T.** A potent inhibitor of cytosolic phospholipase A₂, arachidonyl trifluoromethyl ketone, attenuates LPS-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **2003**; 284:L720-L726.
170. **Burgermeister E, Tibes U, Stockinger H, Scheuer WV.** Activation of nuclear factor-κB by lipopolysaccharide in mononuclear leukocytes is prevented by inhibitors of cytosolic phospholipase A₂. *Eur J Pharmacol*, **1999**; 369:373-386.
171. **Dieter P, Kolada A, Kamionka S, Schadow A, Kaszkin M.** Lipopolysaccharide-induced release of arachidonic acid and prostaglandins in liver macrophages: Regulation by Group IV cytosolic phospholipase A₂, but not by Group V and Group IIA secretory phospholipase A₂. *Cell Signal*, **2002**; 14:199-204.

172. **Syrbu SI, Waterman WH, Molski TF, Nagarkatti D, Hajjar JJ, Sha'afi RI.** Phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ and the release of arachidonic acid in human neutrophils. *J Immunol*, 1999; 162(4):2334-2340.
173. **Naraba H, Murakami M, Matsumoto H, Shimbara S, Ueno A, Kudo I, Oh-ishi S.** Segregated coupling of phospholipases A₂, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. *J Immunol*, 1998; 160(6):2974-2982.
174. **Roshak A, Sathe G, Marshall LA.** Suppression of monocyte 85-kDa phospholipase A₂ by antisense and effects on endotoxin-induced prostaglandin biosynthesis. *J Biol Chem*, 1994; 269(42):25999-6005.
175. **Barnett CC Jr, Moore EE, Silliman CC, Abdalla EK, Partrick DA, Curley SA.** Cytosolic phospholipase A(2)-mediated ICAM-1 expression is calcium dependent. *J Surg Res*, 2001; 99(2):307-310.
176. **Balsinde J, Balboa MA, Yedgar S, Dennis EA.** Group V phospholipase A(2)-mediated oleic acid mobilization in lipopolysaccharide-stimulated P388D(1) macrophages. *J Biol Chem*, 2000; 275(7):4783-4786.
177. **Pilane CM, LaBelle EF.** Arachidonic acid release by cPLA₂ may be causally related to NO-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 2002; 191(2):191-197.
178. **Baek S-H, Kwon TG, Lim J-H, Lee Y-J, Chang H-W, Lee S-J, KimJ-H, Kwun K-B.** Secretory phospholipase A₂-potentiated inducible nitric oxide synthase expression by macrophages requires NF-κB activation. *J Immunol*, 2000; 164:6359-6365.
179. **Wu CC, Chen SJ, Yen MH.** Nitric oxide-independent activation of soluble guanylyl cyclase contributes to endotoxin shock in rats. *Am J Physiol*. 1998; 275(4 Pt 2): H1148-H1157.
180. **Khatsenko OG, Boobis AR, Gross SS.** Evidence for nitric oxide participation in down-regulation of CYP1/2 gene expression at the pretranslational level. *Toxicol Lett*, 1997; 90:207-216.
181. **Khatsenko OG, Kikkawa Y.** Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997; 280:1463-1470.
182. **Müller CM, Scierka A, Stiller RL, Kim YM, Cook DR, Lancaster JR, Buffington CW, Watkins WD.** Nitric oxide mediates hepatic cytochrome P450 dysfunction induced by endotoxin. *Anesthesiology*, 1996; 84:1435-1442.
183. **Wang MH, Wang J, Chang HH, Zand BA, Jiang M, Nasjletti A, Laniado-Schwartzman M.** Regulation of renal CYP4A expression and 20-HETE synthesis by nitric oxide in pregnant rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003; 285:F295-F302.

184. **Trevisi L, Bova S, Cargnelli G, Ceolotto G, Luciani S.** Endothelin-1-induced arachidonic acid release by cytosolic phospholipase A2 activation in rat vascular smooth muscle via extracellular signal-regulated kinases pathway. *Biochem Pharmacol*, **2002**; 64(3):425-431.
185. **Hu ZW, Shi XY, Lin RZ, Chen J, Hoffman BB.** α 1-Adrenergic receptor stimulation of mitogenesis in human vascular smooth muscle cells: role of tyrosine protein kinases and calcium in activation of mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther*, **1999**; 290(1): 28-37.
186. **Uddin MR, Muthalif MM, Karzoun NA, Benter IF, Malik KU.** Cytochrome P-450 metabolites mediate norepinephrine-induced mitogenic signaling. *Hypertension*, **1998**; 31(1 Pt 2):242-247.
187. **Xiao XH, Rand MJ.** Alpha 2-adrenoceptor agonists enhance vasoconstrictor responses to alpha 1-adrenoceptor agonists in the rat tail artery by increasing the influx of Ca^{2+} . *Br J Pharmacol*, **1989**; 98(3):1032-1038.
188. **Medgett IC, Langer SZ.** Heterogeneity of smooth muscle alpha adrenoceptors in rat tail artery in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, **1984**; 229(3): 823-830.
189. **Adam LP, Hathaway DR.** Identification of mitogen-activated protein kinase phosphorylation sequences in mammalian h-Caldesmon. *FEBS Lett*, **1993**; 322(1):56-60.
190. **Khalil RA, Menice CB, Wang CL, Morgan KG.** Phosphotyrosine-dependent targeting of mitogen-activated protein kinase in differentiated contractile vascular cells. *Circ Res*, **1995**; 76(6):1101-1108.
191. **Katoch SS, Moreland RS.** Agonist and membrane depolarization induced activation of MAP kinase in the swine carotid artery. *Am J Physiol*, **1995**; 269(1 Pt 2):H222-H229.
192. **Di Salvo J, Steusloff A, Semenchuk L, Satoh S, Kolquist K, Pfitzer G.** Tyrosine kinase inhibitors suppress agonist-induced contraction in smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **1993**; 190(3):968-974.
193. **Abebe W, Agrawal DK.** Role of tyrosine kinases in norepinephrine-induced contraction of vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*, **1995**; 26(1):153-159.
194. **Merkel LA, Rivera LM, Colussi DJ, Perrone MH.** Inhibition of EGF-induced vasoconstriction in isolated rabbit aortic rings with the tyrosine kinase inhibitor RG50864. *Biochem Biophys Res Commun*, **1993**; 192(3):1319-1326.
195. **Sauro MD, Thomas B.** Tyrphostin attenuates platelet-derived growth factor-induced contraction in aortic smooth muscle through inhibition of protein tyrosine kinase(s). *J Pharmacol Exp Ther*, **1993**; 267(3):1119-1125.

196. **Watts SW.** 5-Hydroxytryptamine-induced potentiation of endothelin-1- and norepinephrine-induced contraction is mitogen-activated protein kinase pathway dependent. *Hypertension*, **2000**; 35(1 Pt 2):244-248.
197. **Jiang B, Brecher P, Cohen RA.** Persistent activation of nuclear factor-kappaB by interleukin-1beta and subsequent inducible NO synthase expression requires extracellular signal-regulated kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2001**; 21(12):1915-1920.
198. **Jiang B, Xu S, Brecher P, Cohen RA.** Growth factors enhance interleukin-1 beta-induced persistent activation of nuclear factor-kappa B in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2002**; 22(11):1811-1816.
199. **LaPointe MC, Isenovic E.** Interleukin-1 β regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes. *Hypertension*, **1999**; 33:276-282.
200. **Komalavilas P, Shah PK, Jo H, Lincoln TM.** Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **1999**; 274(48):34301-34309.
201. **Schindler H, Bogdan C.** NO as a signaling molecule: effects on kinases. *Ent Immunopharmacology*. **2001**; 1:1443-1455.
202. **Evans JH, Fergus DJ, Leslie CC.** Inhibition of the MEK1/ERK pathway reduces arachidonic acid release independently of cPLA₂ phosphorylation and translocation. *BMC Biochem*, **2002**; 3(1):30.

ÖZGEÇMİŞ

24 Temmuz 1978 tarihinde Mersin’de doğmuştur. İlkokul öğrenimini Mersin 3 Ocak İlköğretim Okulu’nda, orta ve lise öğrenimini ise İçel Anadolu Lisesi’nde tamamlamıştır. 2001 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden mezun olmuştur. 2002 yılında Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Anabilim Dalı Farmakoloji Yüksek Lisans Programı’na başlamış ve Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır. Halen aynı Fakülte’de Kasım 2002 tarihinden itibaren Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir. İngilizce bilmektedir.

