

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI
MERSİN

**DİYABETİK FARE AORTU, KORPUS KAVERNOZUMU VE GASTRİK
FUNDUSUNDA RHO/RHO-KİNAZ YOLAĞININ İNCELENMESİ**

Dr. İsmail ÜN

UZMANLIK TEZİ

Tez yöneticisi

Doç. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR

MERSİN-2003

TEŐEKKÖR ve DESTEKLEYEN KURULUŞ

Tezimin baŐlangıcından itibaren değerli fikirleri ile bana yol gÖsteren Anabilim Dalı BaŐkanımız ve tez danıŐmanım Sn. Doç. Dr. Kansu BÖyÖkafŐar'a teŐekkÖr ederim.

Tezim sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Sn. Yrd. Doç. Dr Mustafa Ark, mesai arkadaŐım ArŐ. GÖr. Dr. Adnan Levent, ArŐ. GÖr. Ecz. Elif Özveren, ArŐ. GÖr. Ecz. Belma Korkmaz ve Ecz. Onur Arıkan'a katkılarından dolayı diğer hocalarım ve ęalıŐma arkadaŐlarım ile teknik ve idari personele teŐekkÖr ederim.

ĘalıŐma sırasında beni sÖrekli manevi olarak destekleyen eŐim ve aileme teŐekkÖrlerimi sunarım.

Bu ęalıŐma TÖrkiye Bilimler Akademisi tarafından desteklenmiŐtir. (K.B./TÖBA-GEBİP/2002-1-5).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
TEŞEKKÜR ve DESTEKLEYEN KURULUŞ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Diyabetin tarihçesi	4
2.2. Diyabetin tanımı	4
2.3. Diyabetin tanı kriterleri	4
2.4. Diyabetin sınıflandırılması	4
2.5. Deneysel diyabet modelleri	5
2.6. Diyabetin komplikasyonları	6
2.6.1. Non-enzimatik glikozilasyon	8
2.6.2. Oksidatif stres	8
2.6.3. Protein kinaz C aktivasyonu	9
2.6.4. Polyol yolağının aktivasyonu	10
2.7. Diyabette endotelial disfonksiyon	10
2.8. Diyabetin vasküler düz kaslar üzerine etkileri	12
2.8.1. Diyabetin postreseptör olaylar üzerine etkisi	12
2.8.2. Diyabetin neden olduğu fonksiyonel değişiklikler	13
2.8.3. Diyabetin neden olduğu yapısal değişiklikler	15
2.9. Diyabette erektil disfonksiyon	16

2.10. Diyabetin gastrointestinal sistem üzerine etkileri	17
2.10.1. Diyabetin gastrointestinal düz kaslar üzerine etkisi	18
2.10.1.1. Diyabetin neden olduğu yapısal değişiklikler	18
2.10.1.2. Diyabetin neden olduğu fonksiyonel değişiklikler	18
2.10.1.3. Diyabetin postreseptör olaylar üzerine etkisi	19
2.11. Rho kinaz yolağı	20
2.11.1. Rho aktivitesinin düzenlenmesi	22
2.11.2. Vasküler doku ve Rho kinaz ilişkisi	24
2.11.2.1. Diyabetik vasküler doku ve Rho kinaz ilişkisi	28
2.11.3. Rho/Rho-kinaz yolağının kavernoza dokudaki fonksiyonu	30
2.11.4. Rho kinaz yolağını gastrointestinal sistemdeki rolü	31
2.11.4.1. Diyabetik gastrointestinal sistem ve Rho kinaz yolağı	32
2.11.5. Rho kinaz yolağının diğer bazı sistem ve olaylarla olan ilişkisi	32
2.12. Diyabetin tedavisi	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM	35
3.1. Kullanılan kimyasal ajanlar	35
3.2. Aort deneyleri	36
3.3. Korpus kavernoza deneyleri	36
3.4. Gastrik fundus deneyleri	36
3.5. Sonuçların değerlendirilmesi	36
4. BULGULAR	38
4.1. Kontrol ve diyabetik farelerin kan glikoz seviyeleri ve vücut ağırlığı değişimleri	38
4.1. Aort bulguları	38
4.2. Korpus kavernoza bulguları	39
4.3. Gastrik fundus bulguları	39
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
5.1. Aort	50
5.2. Korpus kavernoza	51
5.3. Gastrik fundus	52
6. KAYNAKLAR	54

TABLO LİSTESİ

	sayfa no
Tablo I: Rho kinaz substratları	25
Tablo II: Kontrol ve diyabet oluşturulan farelerin 0. ve 30. günlerdeki ağırlık ve kan glikoz düzeyleri.	38
Tablo III: Aortta çeşitli gevşetici ajanlara ait pEC ₅₀ değerleri	39



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa no
Şekil 1: Düz kas kasılmasının düzenlenmesinde Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağının rolü.	26
Şekil 2: Kontrol ve diyabetik aortlarda fasudil ve Y-27632 gevşemeleri	41
Şekil 3: Kontrol ve diyabetik aortlarda asetilkolin papaverin ve sodyum nitroprussiyat gevşemeleri	42
Şekil 4: Kontrol ve diyabetik korpus kavernozumlarında asetilkoin ve EFS gevşemeleri	43
Şekil 5: Kontrol ve diyabetik korpus kavernozumlarında fasudil ve Y-27632 gevşemeleri	44
Şekil 6: Kontrol ve diyabetik gastrik funduslarda karbakol kasılmaları	45
Şekil 7: Kontrol ve diyabetik gastrik funduslarda fasudil ve Y-27632 gevşemeleri	46
Şekil 8: Kontrol ve diyabetik gastrik funduslarda fasudil inkübasyonundan sonra karbakol kasılmaları	47
Şekil 9: Kontrol ve diyabetik gastrik funduslarda Y-27632 inkübasyonundan sonra karbakol kasılmaları	48

ÖZET

Bu çalışmada streptozotosin (100 mg/kg/gün, 2 gün) ile indüklenen diyabetik farelerin çeşitli dokularında (aort, kavernöz ve gastrik fundus) Rho kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudile karşı gelişen gevşetici cevaplardaki olası değişiklikler araştırıldı. Çevre dokulardan tamamen temizlenerek hazırlanan dokular, Krebs solüsyonu içeren sıcaklığı 37 °C’de sabit tutulmuş, % 95 O₂ ve % 5 CO₂ karışımıyla sürekli olarak gazlandırılan bir banyo ortamında 0.5 gram ön gerim altında asıldı ve dengelenme periyodu olarak bir saat beklendi.

Aort ringlerinde 10⁻⁶ M fenilefrinle kasılmayı takiben asetilkolin (10⁻⁹-10⁻⁴ M), ile elde edilen gevşeme yanıtları diyabetik aortta belirgin olarak baskılanmıştı, oysa sodyum nitroprusiyat (10⁻⁹-3x10⁻⁶ M), papaverin (10⁻⁸-10⁻⁴ M) ile gevşeme yanıtları kontrole göre değişiklik göstermedi. Diyabetik aortta, Y-27632 (10⁻⁸-10⁻⁵ M) ve fasudil (10⁻⁸-10⁻⁴ M) gevşeme yanıtları değişmemişti. Y-27632’nin kontrol ve diyabetteki pEC₅₀ değerleri sırasıyla 6.24±0.09 ve 6.22±0.07 (P>0.05) iken fasudilin aynı dokudaki pEC₅₀ değerleri ise 5.56±0.07 ve 5.46±0.07 (P>0.05) idi.

Kavernöz doku 5x10⁻⁵ M fenilefrinle kastırıldı ve düzenli bir kasılma düzeyi elde edildikten sonra sırasıyla 1, 2, 4, 8 ve 16 Hz frekansında (0.5 ms, 40 V) elektriksel saha stimülasyonu (ESS) 2 dakika aralıklarla 15 sn boyunca uygulanarak gevşeme yanıtları elde edildi. Ayrıca ön kastırılmış dokularda asetilkolin (10⁻⁹-3x10⁻⁵ M), fasudil (10⁻⁹-3x10⁻⁵ M) ve Y-27632 (10⁻⁹-3x10⁻⁵ M)’e ait gevşeme yanıtları da kaydedildi. Diyabetik kavernöz dokuda ESS ve asetilkolin ile indüklenen gevşeme yanıtları belirgin olarak baskılanırken, Y-27632 ve fasudil yanıtları değişmemişti.

Diyabetik ve kontrol gastrik fundus şeritlerinde karbakolün kümülatif (10⁻⁹-10⁻⁵ M) uygulanmasıyla konsantrasyon-cevap eğrileri elde edildi. Kasılma eğrileri kuvvet (mN) olarak ifade edildiğinde karbakol kasılmalarının diyabette önemli ölçüde baskılandığı bulundu. Buna karşılık Rho kinaz inhibitörlerine verilen gevşeme yanıtları diyabetik dokularda değişmemiştir. Ayrıca bu inhibitörler varlığında karbakole olan kasılma cevapları, kontrol dokuları ile karşılaştırıldığında, diyabetik dokularda önemli bir değişikliğe uğramamıştır.

Sonuç olarak diyabette Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağının "upregüle" olduğu bildirilmiş olmasına rağmen bu enzim inhibitörlerine karşı çeşitli dokularda (aort, kavernöz ve gastrik fundus) oluşan fonksiyonel cevapların değişmediği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler

I-Diyabet II-Rho kinaz III-Aort IV-Korpus kavernozum V-Gastrik fundus

ABSTRACT

Possible alteration in the relaxant responses to Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil was examined in the isolated aorta, corpus cavernosum and gastric fundus obtained from streptozotocin-induced (100 mg/kg/day, 2 days) diabetic mice. The tissues were cleaned off adherent tissues and placed in organ chambers maintained at 37° C, filled with the Krebs-bicarbonate solution gassed with 95 % O₂ and 5 % CO₂. All preparations were equilibrated for 1 h, under an initial tension of 0.5 g.

After, a steady state of contraction was obtained with 10⁻⁶ M phenylephrine (Phe), acetylcholine (ACh, 10⁻⁹-10⁻⁴ M) evoked relaxation was markedly suppressed in diabetic aorta; however, relaxant responses to fasudil (10⁻⁸-10⁻⁴ M) and Y-27632 (10⁻⁸-10⁻⁵ M) were not altered. pEC₅₀ values for Y-27632 were 6.22±0.07 M in diabetic and 6.24±0.1 M in control aorta (*P*>0.05), respectively. pEC₅₀ values for fasudil were 5.48±0.087 in the diabetic and 5.57±0.08 in control aorta (*P*>0.05), respectively. Similarly, neither sodium nitroprusside (10⁻⁹-3x10⁻⁶ M) nor papaverin (10⁻⁸-10⁻⁴ M) induced relaxation was modified in diabetic aorta.

Cavernosal strips were precontracted with 5x10⁻⁵ M Phe. Thereafter, electrical field stimulation (EFS, 0.5 msec, 40 V; 1, 2, 4, 8, 16 Hz) was performed with 2 minutes interval for 15 seconds. In addition, ACh (10⁻⁹-3x10⁻⁵ M), fasudil (10⁻⁹-3x10⁻⁵ M) and Y-27632 (10⁻⁹-3x10⁻⁵ M) induced relaxation were also obtained. ACh and EFS-induced relaxations were markedly suppressed in diabetic cavernosal strips; however, relaxant responses to Y-27632 and fasudil were not altered.

In the gastric fundus, carbachol (CCh, 10⁻⁹-10⁻⁵ M)-induced contraction was suppressed in diabetes when expressed as mN but not as mN/g tissue weight. However, the relaxant responses to Y-27632 (10⁻⁸-10⁻⁵ M) and fasudil (10⁻⁸-3x10⁻⁵ M) were not modified in diabetic strips when compared to the control ones. Neither were the responses to the incubation of the strips changed except that Y-27632 incubation further depressed the CCh-induced contraction when the responses were expressed as mN of force.

These results may indicate that the functional responses to the Rho-kinase inhibitors are not altered in different kind of tissues from streptozotocin-diabetic mice, although it has been reported that Rho/Rho-kinase signalling could be upregulated in diabetic vascular smooth muscle.

Key words

I-Diabetes II-Rho-kinase III-Aorta IV-Corpus cavernosum V-Gastric fundus



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Diyabet insülin hormon sekresyonunun ve/veya insülin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır (160). Diyabet bu hastalıkla bağlantılı mortalite ve morbiditeden sorumlu koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, serebrovasküler hastalık, nefropati, retinopati, tromboz, iskemik ve kan akımının azalması ve nöropati gibi ağır kardiyovasküler komplikasyonlarla bağlantılıdır (90). Diğer taraftan diyabetli kişilerde gastropati ve erektil disfonksiyon da önemli komplikasyonlardır. Diyabetik erektil disfonksiyonlu kişiler için ana risk faktörleri otonomik nöropati, vasküler yetersizlik, ve hipertansiyondur (3, 51).

Diyabetik hayvanların vasküler düz kaslarının, vazokonstriktör ajanlara karşı duyarlılık artışı oluşturabileceği bildirilmiş olmasına rağmen azalmış ve değişmemiş cevaplar da rapor edilmiştir (108). Bu artan kasılmalar, sitoplazmik serbest Ca^{2+} artışından ziyade, artmış Ca^{2+} duyarlılığına bağlanabilir (2, 43, 157). Küçük molekül ağırlıklı bir GTPaz olan Rho ve onun alt inisiyatiförü Rho kinazın, Ca^{2+} duyarlılığında rol aldığı bildirilmiştir. Bu duyarlaşma, myozin hafif zincirinin fosforilasyonu sonucu, kasılmanın sitoplazmik serbest Ca^{2+} düzeyi değişikliklerinden bağımsız olarak düzenlenmesi şeklinde tanımlanmıştır (135). Diğer taraftan diyabette mitojenle aktive olan protein kinaz ve Rho kinaz gibi sinyal iletim yollarında bazı değişiklikler olabilir. Bu değişiklikler, artmış kasılma, hücresel proliferasyon, sitokin üretimi ve permeabilite artışında rol oynayabilir (61, 82). Streptozotosinle indüklenen diyabetik ratların baziller arterlerinde Rho'nun transkripsiyonel düzeyde arttığı ve aktive olduğu bildirilmiştir (91). Sonuç olarak Rho/Rho-kinaz sinyal yolağı diyabette artmış olan hipertansiyon ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalık riskiyle ilişkili olabilir (126).

Diyabette bu yolağın aktive olduğu (151) bulgusundan hareketle, streptozotosinle indüklenen diyabetik farelerin izole aortunda Rho kinaz inhibitörleri olan Y-27632 ve fasudile cevaplarının nasıl değişeceğini araştırdık.

Diyabetik erektil disfonksiyonlu hastalardan izole edilen korpus kavernozumda hem nörojenik hem de endotelyal gevşemeler bozulmuştur. Benzer sonuçlar alloxanla indüklenen diyabette de açık olarak görülmüştür (139). Diğer taraftan, Rho/Rho-kinaz yolağının erektil fonksiyonlarda da rol oynadığı ve Rho kinaz inhibitörlerinin gerek in vitro ve gerekse in vivo olarak ereksiyona neden olduğu bildirilmiştir (93, 121, 32). Kavernozaal düz kasları innerve eden nitretrjik sinirler, elektriksel uyarıyla nitrik oksid salıverirler. Nitrik oksid vazodilatasyondan ve böylece penis ereksiyonundan sorumlu ana nörotransmitterdir. Nöronal salgılanma dışında nitrik oksid aynı zamanda kavernozaal dokunun endotel hücrelerinden de salıverilir (21). Bununla birlikte anjiyotensin II, noradrenalin ve fizyolojik olarak nitrik oksidin antagonisti olarak kabul edilen endotelin-1 gibi damar kastırıcılarının inhibisyonu da penis ereksiyonuna neden olabilir (32). Bu damar kastırıcılar küçük GTPaz Rho ve onun alt inisi efekörü olan Rho kinazı aktive eden reseptörlerini stimüle ederler (111, 121, 155). Bu sinyal yolağı intrasellüler serbest kalsiyumdan bağımsız olan, myozin hafif zincir fosforilasyonu ve kasılma gücünün düzenlenmesi olarak tanımlanan Ca^{2+} duyarlığında rol oynayabilir (135). Rho kinazın insan ve tavşan korpus kavernozumunda eksprese edildiğı ve ayrıca Rho kinazın antagonize edilmesinin, rat penil ereksiyonunu stimüle ettiğı bildirilmiştir (122, 32, 93). Diyabet, olasılıkla endotelyal disfonksiyon üzerinden nitrik oksid aracılı vazodilatasyonda bir bozukluğa neden olur (65). Ayrıca diyabetik tablonun, rat kavernozaal düz kaslarda nitretrjik nörotransmisyonu da zayıflattığı bildirilmiştir (156, 51). Ratlarda streptozotosin ile indüklenen diyabet, aynı zamanda, kavernozaal gevşetici etkisi olan prostaglandin I_2 (prostasiklin) sentezinde de belirgin bir inhibisyon oluşturur (77).

Bir Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632 penil ereksiyona neden olmasına rağmen, diyabetik korpus kavernozum üzerine etkileri henüz çalışılmamıştır. Bu bakımdan biz iki Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632 ve fasudile gevşeme yanıtlarının streptozotosin-diyabetik fare korpus kavernozumunda nasıl değıştığını araştırdık.

Diyabette etkilenen bir diğere sistem gastrointestinal sistemdir. Diyabetik durum, disfaji, abdominal ağrı, mide bulanması, kusma, malabsorbsiyon, fekal inkontinans, diyare ve parezi gibi gastrointestinal komplikasyonlara neden olur (159). Diyabetin geç dönem komplikasyonlarından biri de diyare, dispepsi, hipoklorhidri ve gastropareziyi içeren gastroenteropatidir (100). Başka bir komplikasyon da midenin atonik dilatasyonudur (60). Diyabetik gastroparezi, gastrik boşalmanda gecikmedir ve bunun altında yatan mekanizmalar kompleks görünmektedir ve tam

olarak anlayamamıştır. Ancak otonomik nöropati ve barsak hormonlarındaki anormalliklerin ana rol oynayabileceği görünmektedir (97). Diyabetik hayvanlarda gastrik boşalmanın, nitrik oksid, vazoaktif intestinal polipeptid, ATP ve sodyum nitroprussiyat ile indüklenen gevşemeler değil fakat, nitrejik sinir aracılı gevşemelerin bozulduğu bildirilmiştir (102, 66, 74).

Rho GTPaz ailesinin üyeleri hücre yüzeyi reseptörleri ile kastırıcı aparat arasında yer alan düzenleyici proteinlerdir (88). Rho kinaz intestinal düz kaslarda myozin fosfataz aktivitesini düzenleyerek, myozin fosforilasyonu ve kasılmada önemli rol oynar (140). Düz kas veya diğer hücrelerin yüzeyinde yerleşmiş olan muskarinik reseptörlerin karbakol ile aktivasyonu, küçük GTPaz Rho ve onun alt inisi etkörü olan Rho kinazı içerir (112, 94). Diyabetik gastrointestinal dokularda fundal, pilorik gevşemelerin ve ayrıca elektriksel aktivitenin zayıfladığı bildirilmiştir (80). Ayrıca gastrik fundus, distansiyona cevap olarak yeterince gevşeyememektedir (117). Bu azalmış adaptif gevşemenin enterik nöronlardan azalmış nöronal input ve azalmış inhibitör kavşak sonrası potansiyellerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (158). Ayrıca, eksitator nörotransmitterlere olan sinyaller de diyabetik durumlarda zayıflamıştır.

Sonuç olarak diyabetik gastrointestinal dokularda hem gevşetici hem de kastırıcı aktivite küntleşmiş olabilir. Biz de bu çalışmada, diyabetin Rho/Rho-kinaz yolağı üzerinde olası etkilerini inceledik. Bu amaçla diyabetik gastrik fundal düz kasının Rho-kinaz inhibitörleri olan Y-27632 ve fasudile olan gevşetici etkilerindeki olası değişmeyi araştırdık. Ayrıca, bu inhibitörlerin varlığında karbakole olan kontraktıl aktivitedeki olası değişmeleri inceledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabetin tarihçesi

Diyabetin (şeker hastalığı) ilk tarifine milattan 1500 yıl öncelerine ait Ebers papirüslerinde rastlanmaktadır. Burada bol su içme ve bol idrardan bahsedilmektedir. Hint uygarlığının "Vedalar" çağında da poliüriden bahsedilir. Hippokrat, Galen, Bharad-wajne Atreya adlı ünlü hekimlerin öğretileri "Charak Samhita" isimli tıp kitabında M.Ö. 600 yıllarında toplanmıştır. Burada "Madhumeh" adı verilen bir hastalık tarif edilmekte, tarif bugünkü diyabet tanımına çok uymaktadır. Bu hastalıkla ilgili olarak (diğer adıyla tatlı idrar hastalığı), hastaların genelde şişman insanlar oldukları, çok su içip çok idrara çıktıkları, hızla zayıfladıkları ve idrarlarına karıncaların toplandığı yazılmaktadır. Ayrıca hastaların kuruyarak ve ağızlarının kokarak öldükleri belirtilmektedir (160).

2.2. Diyabetin tanımı

Diyabet insülin hormonu sekresyonunun ve/veya insulin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır. Diyabet klinik olarak polidipsi, poliüri, polifaji, pruritus, glikozüri, ketonüri, ağırlık kaybı gibi klasik belirtiler ve hastalığa spesifik retinopati, nöropati, nefropati gibi komplikasyonlar ile şüphe edilebilir veya tanınabilir. Özellikle insüline bağımlı olmayan diyabet bu belirtileri göstermeyebilir, böyle durumlarda tanı, kan ve idrar testine göre konur (160).

2.3. Diyabetin tanı kriterleri

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Amerikan Diyabet Derneği (ADA) tarafından konulan yeni kriterlere göre diyabet semptomları ile birlikte rasgele plazma glikoz düzeyinin 200 mg/dl üzerinde olması veya açlık plazma glikozunun 126 (ADA)-140 (WHO) mg/dl olması veya oral glikoz tolerans testi esnasında 2. saat değeri ve bir diğer parametrenin 200 mg/dl veya üzerinde bulunması ile tanı konur (103).

2.4. Diyabetin sınıflandırılması

Esas olarak tip I ve tip II olmak üzere iki primer diyabet tipi tanımlanmıştır. Bunlar şişmanlık otoimmünite, insüline bağımlı olup olmama gibi durumlara göre de kendi aralarında sınıflandırılmıştır. Sekonder diyabet nedenleri arasında ise pankreas hastalığı, hormon anomalileri, ilaçlar ve kimyasal maddeler, insülin reseptör anomalileri, genetik sendromlar ve diğer nedenler yer alır (103).

2.5. Deneysel diyabet modelleri

2.5.1. Cerrahi diyabet: Total veya subtotal pankreatektomi yapılır, nadir kullanılan bir yöntemdir.

2.5.2. Kimyasal diyabet: Çok sayıda ilaç ve kimyasal kullanılmasına rağmen bunlar arasında alloksan ve streptozosin en spesifik ve uygun olanlarıdır (38).

2.5.3. Spontan diyabet

2.5.3.1. Çin hamsteri

2.5.3.2. BB Wistar rat; Bazı yönleriyle insanlardakine benzeyen insüline bağımlı diyabetin gelişmesini başlatan otozomal resesif genler taşır. Aynı zamanda otoimmün diyabetin bazı özelliklerini taşır.

2.5.3.3. OB(DB; c57BL/KSJDB) faresi; İnsanlardaki erişkin başlangıçlı diyabete benzer ve belirgin obezite, infertilite, hiperfaji ve belirgin hiperglisemi ile karakterizedir.

2.5.3.4 Spontan diyabetin diğer deneysel modelleri; *Macaca nigra, Yellow mice, Japanese KK mouse, Welesley hybrid mice, Spiny mice, Sand rats, Zucker rats, Goto-Kakizaki Rat* vs. (126)

2.5.4. Viral diyabet: Viral enfeksiyonlar insanlar ve hayvanlardaki diyabetin nedeni olarak belirtilmiştir. Bazı hayvan türlerinde deneysel diyabeti indükleyen birkaç virüs bildirilmiştir: Ansefalomyokardit virüsünün M-varyantı, Koksaki virüsleri, ayak ve ağız hastalığı virüsü, Kızamıkçık virüsü, Reovirüsler, Venezuela at ensafalopatisi virüsü. Genetik olarak hassas olan fare ırkları virüsle enfekte olduklarında pankreasın Langerhans adacık lezyonlarına diyabet eşlik eder (108).

Deneysel diyabet modelleri klinik diyabetin çoğu özelliklerini taşır bununla birlikte bunların hiçbiri tam olarak klinik diyabete eşit değildir. Deneysel diyabet modellerinde hiperglisemi ortak özelliktir.

2.5.5 Streptozosinle indüklenen diyabet

Streptozotosin pankreasın β hücreleri için, yüksek derecede efektif ve sitotoksik bir ajandır ve streptozotosin uygulanmış hayvanlar, insüline bağımlı diyabetin bir modeli olarak değerlendirilmiştir. Streptozotosin, nitrik oksid üreterek pankreas adacıklarında β hücrelerinin hasarı sonucu diyabetojenez neden olur (98, 162). Aynı zamanda iki günlük ratlara intraperitoneal streptozotosin enjeksiyonu ile insüline bağımlı olmayan diyabet benzeri hiperglisemi oluşturmakta mümkün olmuştur (108, 53).

Plazmadaki total kolesterol ve düşük dansiteli lipoprotein miktarı, streptozotosin ile indüklenmiş 1 haftalık diyabetik ratlarda değişmezken 4 veya 10 haftalık diyabetik ratlarda belirgin olarak artmıştır (79). Diyabetik ratlarda kilo kaybı, hiperglisemi ve bradikardi saptanmıştır. Kalp ağırlığı ve aortik striplerde ağırlık kaybı varken vaz deferens ve anokoksigeus kasında ağırlık kaybı olmamıştır. Diyabetik ratların kalpleri noradrenaline bir duyarlık azalması gösterirken aortik stripler noradrenaline duyarlık artışı göstermiştir (68, 39). Genellikle streptozotosin-diyabetik ratları in vivo olarak azalmış total periferal rezistans, azalmış ortalama arteryel basınç ve artmış bölgesel kan akışı ile artmış atım volümü sergilerler (108).

Ratlarda streptozotosin ile indüklenen diyabette plazma T_3 ve T_4 düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Tiroid hormonu verilmesinin düz kasları da içeren bazı dokularda bozulan fonksiyonları geri çevirdiği bildirilmiştir. Örneğin T_4 verilmesi, streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratların mezenterik arterlerinin azalmış β -adrenerjik cevaplarını geri çevirmiştir (16). Streptozotosin-diyabetik ratlarında aldosteron, gastrin, TSH, LH, FSH, prolaktin düzeylerinin azaldığı buna karşılık enteroglukagon, vazopresin ve oksitosin düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (108, 79).

2.6. Diyabetin komplikasyonları

Diyabet (DM) tüm dünyada yaklaşık 140 milyon kişide görülen kronik bir rahatsızlıktır (40). Diyabetik hastalarda çok çeşitli erken ve geç dönem komplikasyonları oluşabilir (108). Ketoasidoz ve hiperozmolar hiperglisemi, düzenli tedavi edilseler bile hem tip I'de hem de tip II'de görülebilen diyabetin iki akut metabolik komplikasyonudur (9). Ayrıca laktik asidoz da diyabetin akut metabolik komplikasyonları arasında yer alır (103).

Vücutta çok değişik sistemleri etkileyen farklı diyabetik komplikasyonlar bildirilmiştir. Bu komplikasyonlar şu kategorilere ayrılır;

1. Nörolojik
2. Kardiyovasküler
3. Gastrointestinal
4. Ürolojik
5. Respiratuvar
6. Oftalmik
7. Reprodüktif
8. Hematolojik
9. Biyokimyasal
10. İlaç metabolizması ve farmakokinetiğiyle ilgili komplikasyonlar (108, 90).

Diyabetteki metabolik bozukluk bağ dokusunda da değişiklik sonucu çok değişik yollardan iskelet kas sistemini etkileyebilir (113).

İnsüline bağımlı diyabet bu hastalıkla bağlantılı mortalite ve morbiditeden sorumlu koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, serebrovasküler hastalık, nefropati, retinopati, tromboz, iskemi ve kan akımının azalması ve nöropati gibi ağır kardiyovasküler komplikasyonlarla bağlantılıdır (90).

Diyabetik nefropati küçük damarlardaki kan akışı değişiklikleri ile mezengial hücrelerde artış ve ekstrasellüler matriksin yoğun akımından kaynaklanır. Hiperglisemi tarafından indüklenen erken retinal anormallikler retinal kan akımının bozulmuş otoregülasyonu ve retinal kapillerden endoteli destekleyen perisitlerin kaybı ile bağlantılı azalmış retinal kan akımının bir sonucudur. Bu değişiklikleri endotelyal hücre permeabilite değişiklikleri ve retinal kapiller oklüzyonla izler. Diyabetik periferik nöropatide vaza nervorumda kapiller kapanma sık gözlenir ve endonöral kan akışı ile oksijen tansiyonu azalmıştır (44).

"Diabetes Control and Trial" ve "United Kingdom Prospective Diabetes Study" çalışma gruplarının yaptığı araştırmalar hipergliseminin diyabetin mikrovasküler komplikasyonları ve belki de makrovasküler komplikasyonlarının gelişmesinde ana rol oynadığını bildirmiştir (49).

Güncel olarak diyabetik hayvan ve insanlardaki vasküler yapılarda gözlenen patolojik değişiklikleri içeren şu ana mekanizmalar ortaya çıkmaktadır.

1-Protein ve lipidlerin non-enzimatik glikozilasyonu

2-Oksidatif stres

3-PKC (protein Kinaz C) aktivasyonu

4-Polyol yolağının aktivasyonu

Bu mekanizmalar birbirinden bağımsız değildir. Örneğin hiperglisemiyle indüklenmiş oksidatif stres AGE (advanced glycosilation end products) üretimini ve PKC aktivasyonunu artırır (11, 59, 152).

2.6.1. Non-enzimatik glikozilasyon

Başlangıçta glikoz, Schiff bazı oluşturmak üzere proteinlerle nükleofilik birleşmeye girer. Erken glikozilasyon ürünü olan ketomin kimyasal olarak geri dönüşümlüdür; şöyleki, kan glikozu normale döndüğünde çözünebilir. Bununla birlikte hiperglisemi koşulları devam ederse sonuçta Amadori bileşğine dönüşür. Daha ileri reaksiyonlar, yeniden yapılanmalar, dehidratasyon ve kırılma geri dönüşümsüz olarak AGE'ler denilen kahverengi çözünmeyen, çapraz bağlantılı (crosslinking) komplekslerle sonuçlanır. AGE dokulardaki uzun yaşam süreli makro moleküllere akın etme eğilimindedir. AGE proteinlerinin diğer makro moleküllerle çapraz bağlanması hücre ve doku fonksiyonlarında anormallikle sonuçlanır. Ayrıca AGE'ler spesifik bir makrofaj reseptörüne bağlanarak hem mikro hem de makrovasküler yapılarda artmış vasküler permeabiliteye katkıda bulunur. Bu proses endotelial disfonksiyon ve serbest radikal üretimini indükleyen TNF (tümör nekroz faktör), IL-1 (interlökin-1) gibi sitokinlerin sentez ve salıverilmesini indükler (162). AGE'ler, modifiye LDL (düşük dansiteli lipoprotein) ve hiperglisemiyle birlikte anjiyotensin II'nin, NF-κB (nükleer faktör-κB)'nin transkripsiyonunu artırdıkları gösterilmiştir (49). NF-κB aktivasyonundan sonra hücresel özellikler düzenlenebilir. NF-κB proteinleri immun cevapta ve büyümenin kontrolünde yer alan çeşitli hücresel genlerin transkripsiyonunu düzenleyebilir. Aktive edilmiş NF-κB'nin L-argininden NO oluşturan

indüklenebilir nitrik oksid sentaz (iNOS)'ı eksprese ettiğine inanılır. iNOS'ın arteryel yaralanmadan sonra neointimal düz kas hücrelerinde indüklendiğine işaret edilmiştir (98).

2.6.2. Oksidatif stres

Diyabette oksidatif stres belirgin olarak artmıştır. Çünkü hiperglisemiye uzun süreli maruz kalma serbest radikal üretimini artırır ve antioksidan savunma sistemi kapasitesini azaltır (11). Monosakkaritler ve fruktoz-lizin, fizyolojik koşullarda spontan olarak moleküler oksijeni indirgeyebilir. Otoksidatif reaksiyonla oluşan indirgenmiş oksijen ürünleri süperoksid, hidroksil radikali ve hidrojen peroksiddir. Bunların hepsi hem lipidlerde hem de proteinlerde çapraz bağlanma ve parçalanmayla hasar oluşturabilirler. Serbest radikaller aynı zamanda AGE üretimini artırabilir, bu da sonuçta daha fazla serbest radikal üretimiyle sonuçlanır. Süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz, ve askorbik asid ile serbest radikal yakalanmasının (scavenging) azalması diyabetik vasküler patolojiyle bağlantılıdır. Diyabette ayrıca E vitamini, ürik asid, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan bileşiklerin düzeyinde azalma tespit edilmiştir. Hiperglisemiyle artış gösteren süperoksid anyonlarının, NO'in fizyolojik inaktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Süperoksid anyonu, bazal NO salınımını inaktive ederek ve endotel kaynaklı damar kastırıcı prostanoidlerin sentezini stimüle ederek endotele bağımlı damar kastırıcı özellikler sergiler. Serbest radikaller biyolojik komponentler üzerinde büyük miktarda hasar oluşturabilirler. Örneğin DNA kırılmasına neden olabilir ve protein ile lipidlerle reaksiyona girebilirler. Diyabetik hastalarda kollojen, elastin ve laminin gibi uzun ömürlü ekstrasellüler proteinler serbest radikallerin hedefidir. Bu proteinler hiperglisemiye bağlı olarak glikozilasyon yollarıyla glikoprotein oluşturmak üzere değişikliğe uğrarlar. Glikoproteinler daha sonra serbest radikallerle parçacıklara ayrılırlar. Bu ürünlerin yoğun olarak bulunduğu lens, vasküler duvar, bazal membranlardaki değişiklikler katarakt, mikroanjyopati, ateroskleroz ve nefropati gibi komplikasyonların gelişimiyle bağlantılıdır (162, 87).

Matriks metalloproteinazları fizyolojik ve patolojik koşullarda hücrel göç ve doku yenilenmesi (remodeling) için gerekli olan Zn^{2+} ve Ca^{2+} bağımlı endopeptidazlardır. Rat diyabet modelinde aortik homojenatlardaki ve plazmadaki matriks metalloproteinaz-9 aktivitesi kontrol ratları ile karşılaştırıldığında belirgin olarak artmıştır. Kronik hiperglisemik koşullardaki matriks metalloproteinaz-9 ekspresyonu ve aktivitesi endotel hücrelerinde artarken vasküler düz kas

hücreleri ya da makrofajlarda artmamıştı. Bu artış reaktif oksijen türlerine hassas yolla aracılık edilirken PKC ile aracılık edilmemekteydi. Matriks metalloproteinaz-9 promotör bölgesi NF- κ B, aktivator protein-1, stimulator protein-1 ve forbol esterinden sorumlu bölgeler içerir (152).

2.6.3. Protein kinaz C aktivasyonu

Protein kinaz C (PKC), serin-treonin kinaz ailesindedir ve hormonlar ile sitokinler için intrasellüler sinyal transdüksiyonunda anahtar rolü oynar. En az 11 izoformu vardır; klasik PKC (α , β_1 , β_2 , γ), yeni PKC (δ , ϵ , θ) ve atipik PKC (λ , μ) bunların ortak yapısını içerir. Klasik PKC enzimleri forbol esterlerinin bağlanması ve diaçil gliserol ile etkileşim için iki tane sisteinden zengin çubuksu motifte çinko (C_1 bölgesi) ve regülatör ucundan var olduğu sanılan Ca^{2+} bağlama bölgesi içerir. Bu sınıf PKC Ca^{2+} , fosfatidilserin ve DAG ya da forbol esterleri ile aktive edilebilir. PKC'nin aktivasyonu vasküler permeabilite, kontraktilite, hücresel proliferasyon, bazal membran sentezi, değişik sitokin ve hormonların sinyal transdüksiyon mekanizması gibi çok sayıda vasküler fonksiyonu düzenler. PKC β ve PKC δ esasen diyabetli hayvanların aort, kalp ve renal glomerulus ve retinalarında ve yüksek glikoza maruz kalmış aortik düz kas hücrelerinde aktive olurlar. Değişik dokularda değişik PKC izoformları aktive olabilmektedir (58).

2.6.4. Polyol yolağının aktivasyonu

Yükselmiş glikoz düzeylerine maruz kalma aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenazın aktivitesine bağlı olarak intrasellüler sorbitol ve fruktoz miktarını artırır. Sorbitolün fruktoza oksidasyonu NADP'nin NADPH'e indirgenmesine kenetlenmiştir. $NAD^+/NADH$ oranındaki artış prostaglandin hidroperoksidazın NADP ya da NADPH'i indirgen kosubstrat olarak kullanması nedeniyle olabilir. Bu enzim PGG_2 'yi PGH_2 'ye indirgerken önemli miktarda oksijen radikalleri de üretir (162).

Diyabetle ilişkili hiperglisemi ve diğer metabolik hemodinamik anormallikler endotel ve düz kas hücreleri üzerine etki ederek mikroanjyopatiji başlatabilir (64).

2.7. Diyabette endotelyal disfonksiyon

Endotelyal fonksiyonun diyabette anormal olduğu bilinmektedir ve aterosklerotik lezyonların gelişmesinde erken bir basamak olabilir. Hiperglisemi oksidasyon, tromboz, inflamasyon, matriks üretimi, AGE ve diğler metabolitleri artırarak potansiyel olarak vasküler yapıda hasar oluşturabilecek koşulları meydana getirebilir. Hiperglisemi serbest radikal üretimi ve oksidatif stresi artırarak DNA tek zincir kırılması ve Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP) aktivasyonuna neden olur. Böylece hücrenel enerji krizi sonucu endotel hücre disfonksiyonu gelişebilir (44, 136).

İn vitro olarak endotelyal hücrelerin yüksek glikoz ile inkübe edilmesi, PKC aktivasyonu, NOS gen ekspresyonunda ve süperoksid üretiminde artışla sonuçlanmıştır. Endotelyal NOS ekspresyonu artmasına rağmen, diyabetik aortlarda NO'in biyolojik etkinliğı azalmıştır. NOS inhibisyonu (N^G-nitro-L-arginin ile) normal damarlarda süperoksid üretimini artırırken diyabetik damarlarda süperoksid üretimini azaltmıştır. L-arginin ve THBP (tetrahidrobiopterin) yokluğunda nNOS ve eNOS'ta kenetsizleşme (uncoupling) oluşabilir (59).

Diyabetik ya da hipertansif ratların endoteli, monositler için artmış yapışkanlık (adhesiveness) göstermiştir. Bu durum artmış süperoksid anyon üretimi ve MCP-1 ekspresyonu ile ilişkilidir. MCP-1 monosit endotel hücresi etkileşmesinde majör kemokindir ve ekspresyonu oksidan-duyarlı transkripsiyonel yolak olan NF-κB tarafından düzenlenir. Hipertansiyon ve hiperglisemi arasında endotelyal yapışkanlığı ve determinantlarını artırma bakımından pozitif etkileşme vardır. Epidemiyolojik çalışmalar ateroskleroz gelişimi açısından diyabet ve hipertansiyonun bağımsız risk faktörleri olduğunu göstermiştir (150). Yapılan kesitsel bir çalışmada tip I diyabetli hastalarda ve sağlıklı kontrollerde adhezin molekülleri değerlendirilmiştir. ICAM-1 (intrasellüler adezyon molekülü-1) ve VCAM (vasküler hücre adezyon molekülü) konsantrasyonları artmış olarak bulunmuştur (124).

AGE-albümin ile mikro ve makrovasküler endoteli değerlendirmek ve akciğler, böbrek ve aortun ince yapısında indüklenen değişiklikleri değerlendirmek için diyabetik (6 hafta süreli) farelerle çalışılmıştır. Özellikle 6. haftadan sonra aortik endotelde patolojik değişiklikler belirginleşmiştir. Bu durumda endotelyal hücreler dışarıya doğru çıkıntı yapmış ve subendotelyal boşluk sıklıkla birbirleriyle karşı karşıya gelmiştir. Çok sayıda yapılmış plazmalemmal veziküller bol sekretuar

ve degradatif bölümler hem de artmış Weibel-Palade cisimleri diyabetik fare endotelinin ortak özellikleri idi. Araştırmacılar diyabetteki aortik endotelin luminal genişlemesinin endotelyal kasılma sonucu olabileceğini öne sürmüşlerdir (115).

Histamin ve serotonin gibi permeabilite faktörlerinin etkisini saptamaya yönelik damar elektron mikroskopik çalışmaları intraepitelial açıklıkların (openings) kontrol hayvanlarında kolayca görülürken, diyabetik hayvanlarda nadiren görüldüğünü ortaya koymuştur. Diyabetik hayvanlarda azalmış sayıda açıklıklar görülmesine rağmen trombositler tarafından salıverilen bir faktör tarafından endotelin permeabilitesi artmıştır. Endotel permeabilitesindeki bu artış kan elemanlarını subendotelyal boşluğa geçerek fokal bir deskuvamasyon bölgesi oluşturmalarına neden olur. Bu da olgun ateromatöz plağın gelişmesiyle sonuçlanır (47, 35).

Mc Veigh ve ark. ile Williams ve ark. tip II diyabetik hastaların, tip I diyabetik hastalarda tanımlanana benzer şekilde bozulmuş vazodilatör cevap sergilediğini gösterdiler. İnsan ön kol kan akımı üzerinde NOS inhibitörleriyle yapılan çalışmalar bazal NO sentezinin tip I' de bozulup tip II'de bozulmadığını göstermiştir. Bununla birlikte bu bozukluk sadece komplikasyonların net işaretlerinin olduğu hastalarda görülmüştür (114). Yine de insanlardaki kanıtların büyük çoğunluğu endotelyal disfonksiyonun hem tip I'de hem de tip II'de mikroanjyopati ve aterosklerozla yakından bağlantılı olduğuna işaret eder (24).

Vasküler endotelde diyabetle ilişkili değişiklikler:

- 1-von Willebrant faktörün artmış plazma düzeyleri.
 - 2-Endotelin-1'in artmış ekspresyonu, sentezi ve artmış plazma düzeyleri.
 - 3-Azalmış prostasiklin salıverilmesi.
 - 4-Azalmış NO salıverilmesi veya NO'e azalmış cevaplılık (responsiveness).
 - 5-Bozulmuş fibrinolitik aktivite.
 - 6-Artmış endotelyal hücre prokoagülan aktivitesi.
 - 7- Artmış endotelyal hücre yüzey trombomodulini.
 - 8-Glikozillenmiş fibrinin, bozulmuş plazminle degradasyonu.
 - 9-Artmış AGE düzeyleri.
 - 10-Adhezin moleküllerinin artmış ekspresyonu.
- Diyabette görülen metabolik anormallikler.

- 1-LDL, VLDL ve lipoprotein a'nın artmış plazma düzeyleri.
- 2-Azalmış HDL kolesterol düzeyleri.
- 3-Artmış lipoprotein oksidasyonu.
- 4-Artmış lipoprotein glikasyonu.
- 5-Artmış küçük, yoğun LDL kolesterol ürünleri.
- 6-Azalmış lipoprotein lipaz aktivitesi (64).

2.8. Diyabetin vasküler düz kaslar üzerine etkileri

Diyabetin komplikasyonlarında vasküler düz kas hücrelerindeki değişiklikler ani olarak oluşabilir (1).

2.8.1. Diyabetin postreseptör olaylar üzerine etkisi

Deneysel modellerde gözlemlendiği kadarıyla, hem düz kaslardaki reseptörler hem de postreseptör olaylar etkilenmektedir. Diyabetin postreseptör olaylar üzerindeki etkisi sonucu düz kasların kasılma ve gevşeme yetenekleri büyük miktarda değişebilmektedir. Kalsiyumla ilişkili mekanizmalar, fosfoinozitidler, adenilat siklaz/cAMP, guanilat siklaz/cGMP, G proteinler, PKC ve iyonik transport mekanizmaları deneysel diyabet ile etkilenebilecek majör postreseptör olaylardır. Yapılan çok sayıda çalışma deneysel diyabette kalsiyuma vasküler cevabın değiştiğini göstermiştir; bununla birlikte bu çalışmalardaki sonuçlar her zaman uyumlu olmamıştır. Bu farklı sonuçlardaki neden net değildir, fakat genellikle kullanılan diyabetojenin farklılığına, diyabetin süresine, hayvanın cinsiyetine, hayvanın ırkına ve kasılmanın ölçümü ve ifadesi için uygulanan tekniğe bağlanabilir (108).

Genellikle KCl ile indüklenen düz kas kasılma cevaplarının bu dokunun kalsiyum duyarlılığını yansıttığı kabul edilir, çünkü aşırı K^+ düzeyi açık kanal kinetiğini artırır ve intrasellüler depolardan düz kas hücresi içine kalsiyum mobilizasyonuna neden olur (149). Deneysel olarak indüklenen diyabetin, KCl ile indüklenen rat aortu kasılmaları üzerine kasılmayı baskılayıcı, artırıcı ve kasılmayı etkilemediğini belirten farklı sonuçlar bildirilmiştir. Hiperglisemi ve diyabetin deneysel olarak diyabetik hayvanlarda vasküler Na^+/K^+ ATPaz'ı inhibe ederek çeşitli agonistlere artmış kasılma ve endotel kaynaklı NO'e azalmış gevşeme yanıtına

neden olabileceği belirtilmiştir. Streptozotosin-diyabetik rat aortik düz kas hücrelerinde artmış hücre içi kalsiyum düzeyleri gösterilmiştir. Uzun süreli streptozotosin-diyabetik ratlarında azalmış kalmodulin düzeyleri gözlenmiştir fakat kısa süreli diyabette ratlarında bu azalma gözlenmemiştir (108, 101).

Streptozotosin-diyabetik ratlarında araşidonik asid infüzyonuna cevap olarak gelişen azalmış hipotansif cevap, muhtemelen vazodilatör prostanoid üretiminden vazokonstriktör prostanoid üretimine doğru gelişen kaymadan kaynaklanır (84). Diyabetik hayvanların kan damarları damar kastırıcı prostanoidlere (TxA₂ analogları, PGF_{2α}) hiperreaktif, damar gevşetici prostanoidlere (PGI₂) ise hiporeaktif olarak gözlenmiştir (108).

İntrasellüler cGMP miktarının diyabette azaldığını bildiren çalışmalar olduğu gibi cGMP düzeylerinin değişmediğini bildiren çalışmalar da vardır. Hiperglisemide hem artmış hem de azalmış NO üretimi bildirilmiştir (108).

2.8.2. Diyabetin neden olduğu fonksiyonel değişiklikler

PGF_{2α}'ya cevaplar diyabetik rat mezenterik arter ve diyabetik fare mezenterik venlerinde artarken, diyabetik rat vena kavasası gibi büyük damarlarda azalmıştı. Yakın zamanda azalmış prostaglandin I₂, artmış tromboksan A₂, lökotrien C₄ ve D₄ üretimi bildirilmiştir (78).

Wistar ratlarının kuyruk venine 65 mg/kg streptozotosin enjeksiyonu ile oluşturulan diyabette, asetilkoline bozulmuş gevşemeler varken, nitrogliserine olan gevşemeler kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Bazal NO belirgin olarak azalırken bazal eNOS ekspresyonu paradoksik olarak artmıştır (3 kat). NADPH oksidaz aktivasyonu tespit edilirken süperoksit üretimi de üç kat artmış olarak bulunmuştur (59).

Albino ratlarda streptozotosin ile oluşturulan diyabette aortik striplerde α adrenerjik reseptör aktivitesindeki artışın aksine kalpte β-adrenerjik reseptör aktivitesinde azalmayı önermiştir (68).

Streptozotosin ile 1 hafta boyunca diyabet oluşturulmuş anestezi yapılmamış (bilinci açık) ratlar, kontrole göre norepinefrine azalmış hipertansif cevap sergilerken, streptozotosinden 4 hafta sonra cevaplar normal olarak bulunmuştur. Diyabetik aortta norepinefrin, metoksamin, fenilefrin ve serotonine in vitro olarak hem artmış, hem azalmış, hem de değişmemiş kasılma

cevapları tespit edilmiştir. Bir α_2 -adrenoseptör agonisti olan klonidine karşı ise hem artmış hem de azalmış kasılma cevapları farklı araştırmacılar tarafından gözlenmiştir. İnsanlarda ve hayvanlarda diyabet ET-1 düzeylerini artırırken bu ajana karşı azalmış kasılma cevapları bulunmuştur. Alloksan ile oluşturulan diyabetik tavşanlarının izole edilmiş abdominal aortları kontrol ile karşılaştırıldığında nöropeptid Y ile azalmış kasılma yanıtları göstermiştir (108, 56).

İn vivo olarak anjiyotensin II ve vazopresine olan kastırıcı cevaplar streptozotosin-diyabetik ratlarında zayıflamış olarak bulunmuştur (20, 120). Diğer taraftan gevşeme yanıtları ile ilgili olarak diyabetik hayvanların aortlarında in vitro olarak asetilkoline karşı hem atmış, hem azalmış, hem de değişmemiş gevşeme yanıtları bildirilmiştir (108). İn vitro deneyler, β -adrenerjik agonistlere karşı oluşan azalmış hipotansif yanıtın arteriyel düz kaslardaki β -adrenoseptörlerin azalmış duyarlılığına bağlı olabileceğini ortaya çıkarmıştır (69).

Yeni bulgular, endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF)'ün diyabetik arterlerde azalabileceğini önermektedir. Diyabetik ratların mezenterik arterlerinde endotel bağımlı EDHF hiperpolarizasyonunun belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (132). Deneysel olarak diyabetik hayvanların aortlarından histamine karşı in vitro olarak hem azalmış gevşeme hem de artmış gevşeme yanıtları alınmıştır (108).

Endotelle ilgili çalışmalar arasında gözlenen bu farklılıklar diyabetin süresi ve çalışma anındaki metabolik anormalliklerin ağırlığına atfedilebilir (108).

Erişkin erkek *Balb c* farelerinde i.p. 240 mg/kg streptozotosin ile oluşturulan diyabette 8. haftada aortun fenilefrin kasılmaları belirgin olarak azalmıştı. Endotel disfonksiyonu 4. haftada tamamen tespit edilmiş olup, sodyum nitroprussiyat yanıtları deney boyunca değişmemişti. İnsülin uygulanması, hem asetilkolin gevşemelerini hem de fenilefrin kasılmalarını normale getirmiştir. Bu çalışmada NO üretiminde bir artış tespit edilmiştir. İnsülin uygulanması plazma glikozunu normale getirmiş ve nitrit/nitrat artışını önlemiştir. Aynı çalışmada poli (ADP-Riboz) polimeraz inhibitörleri kullanılarak hem in vivo olarak hem de in vitro olarak endotelial disfonksiyonu geri çevirmek mümkün olmuştur (136).

İn vitro deneylerin sonuçlardaki farklılıklar için çok sayıda açıklama yapılmıştır. Örneğin deneysel diyabetin vasküler kasılabilirlik ile ilgili sonuçların oransal veya mutlak değer olarak verilmesi, vasküler endotelin varlığı veya yokluğu ve banyo ortamındaki farklılıklar nedenler arasında olabilir (147).

2.8.3. Diyabetin neden olduğu yapısal değişiklikler

Bir tür kemirgen olan Mongolian *gerbil*'de streptozotosin ile oluşturulan diyabette aorttaki değişiklikler immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik teknikle incelenmiştir. Streptozotosin uygulamasından 1 hafta sonra endotel hücrelerinin şiştiği, nükleusun büyüdüğü ve aort düz kas hücre sitoplazmasında aktin filament dağılımında bir düzensizliğin olduğu tespit edilmiştir. Streptozotosin verilmesinden 4 hafta sonra medya tabakasının perisellüler boşluklarında artmış kollojen fibrilleri gözlenmiştir. Streptozotosin verilmesinden 1 yıl sonra, kontrol hayvanlarıyla karşılaştırıldığında vakoulizasyon ve artmış sitoplazmik organelle beraber vasküler düz kas hücreleri etrafında artmış kollojen fibriller görülmüştür. Streptozotosin verilmesinden 1 yıl sonra 1 hafta ve 4 hafta sonrasına göre iNOS, AGE ve NF- κ B reaksiyon ürünleri endotel hücrelerinde ve vasküler düz kas hücrelerinde daha fazla artmıştı (98).

Diyabetik arteryel düz kaslardaki artmış proliferasyon, endotelial hücre kaybı sonrasında NO sentezinin azalmasına bağlı olabilir. Artmış tromboksan A₂, sentezi, AGE düzeyi, insülin benzeri büyüme faktörü-1 sentezi, azalmış prostasiklin (PGI₂) biyosentezi de neden olabilir. TNF- α ve IL-1 β da, olası nedenler arasındadır. Artmış glikoz ve glikozamin düzeylerine maruz kalmış rat aortik düz kas hücre kültürü artmış büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü α (TGF- α) ve esas fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gen ekspresyonunda artışa neden olmuştur. Benzer değişiklikler spontan olarak diyabetik ratların arteryel düz kaslarında da gözlenmiştir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü- β (PDGF- β) reseptörünün aşırı ekspresyonu, diyabetik tavşanlardaki intimal kalınlaşmanın sebebi olabilir. Yapılan diğer çalışmalarda diyabetin rat arterinde artmış kollojen sentezine neden olduğu tespit edilmiştir. Streptozotosin-diyabetik ratlarda yapılan bir çalışmada elastin glikozilasyonunun, diyabetin erken safhalarında bile aortta kalsiyum birikmesiyle sonuçlandığını bildirmiştir. Alloksan ile oluşturulan diyabette tavşan arteryel düz kas hücresi kalınlaşmasına bağlı olarak transarteryel oksijen gradiyenti azalmıştır (108, 146, 127).

Diyabette glikozun PKC'yi aktive ederek, vasküler düz kas hücresi apoptozisini in vitro ve in vivo olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Yakın zamanda benzer bulgular insan aortik düz kas hücrelerinde de gözlenmiştir. Buradan yola çıkılarak diyabetik vaskülopatinin kısmen PKC ile indüklenen vasküler düz kas hücresi büyümesiyle aracılık edilebileceği ileri sürülmüştür (54).

Deneyisel diyabet düz kas ve düz kasla ilişkili yapılarda hem makroskopik hem de mikroskopik yapısal değişikliklere neden olur. Deneyisel diyabete bağlı olarak düz kas hücrelerinde gelişen en önemli yapısal değişikliklerden biri de otonomik nöropatidir (108).

2.9. Diyabette erektil disfonksiyon

Ereksiyon, fizyolojik, nöronal, hormonal, vasküler ve kavernozaal düz kas hücre sistemlerinin integratif senkronize olmuş aktivitelerinin bir son yolağıdır. Seksüel uyarı kavernozaal sinir terminallerinden nörotransmitter salınımını tetikler. Bu da düz kas hücre gevşemesiyle sonuçlanır ve şu olaylar oluşur:

1-Artmış kan akımıyla arteriyol ve arterlerin dilatasyonu.

2-Genişleyen sünizoidlere kanın depolanması.

3-Subtunikaal venüler pleksusların sıkıştırılması ile venöz çıkışın azalması.

4-İntrakavernozaal basınçta bir artışı (100 mm Hg kadar) ile tam ereksiyon fazı.

5-Daha fazla basınç artışı (birkaç yüz mm Hg kadar) ile rigid ereksiyon fazı.

Penisin innervasyonu, hem otonomik (sempatik ve parasempatik), hem de somatiktir (sensör ve motor). Omurilik ve periferik gangliyonlardan sempatik ve parasempatik sinirler birleşerek kavernozaal sinirleri oluştururlar. Kavernozaal sinirler korpus kavernozaum ve korpus spongiyozuma girerek ereksiyon ve detümesans boyunca oluşan nörovasküler olayları etkilerler. Noradrenalin genellikle penil flaksite ve detümesanstan sorumlu ana transmitter olarak kabul edilir. Endotelin, TxA_2 , $PGF_{2\alpha}$, lökotrienler gibi damar kastırıcılar detümesans için önerilen diğer adaylar arasındadır (57).

İnsan düz kas hücreleri ve penil arterler çevresinde kolinerjik sinirler ve kolinerjik veziküller içeren terminaller gösterilmiştir. Asetilkolin endotelden NO salınımına neden olarak düz kasları gevşetir. Son gözlemlere göre nitreerjik nöronlardan salıverilen NO, cGMP üretimini artırarak sonuçta kavernozaal düz kas hücre gevşemesine neden olur (62).

Diyabetli hastalarda erektil disfonksiyon, diyabetli olmayan aynı yaştaki kontrollere göre 10-15 yıl daha erken oluşur. Ayrıca bu hastalarda düşük intrakavernozaal nitrik oksid sentaz (NOS) seviyeleri tespit edilmiştir. Diyabetli kişilerde erektil disfonksiyon için ana risk faktörleri otonomik nöropati, vasküler yetersizlik, ve hipertansiyondur.

Penil ve pudental arterlerdeki ateroskleroz korpus kavernoza kan akımını kısıtlar. Kavernoöz trabeküllerdeki elastikiyet (compliance) kaybından dolayı venöz akış kaybolmuştur. Bunun sonucu korpus kavernoza yeterince genişleyemez ve kavernoörden dışarı kan taşıyan damarları sıkıştırır. Diyabetli kişilerde aynı zamanda ereksiyona katkıda bulunabilecek olan asetilkolin-pozitif fibrilerin de azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca norepinefrin-pozitif liflerde de azalma tespit edilmiştir (33).

Diyabetik ratların metal şelatörü trientin ile tedavisinin aort ve korpus kavernoza endote bağımlı gevşemesi için yararlı olduğu bildirilmiştir. Bu etki kısmen oksidatif stresin düz kas cevapları üzerine olan zararlı etkilerinin engellenmesine atfedilebilir (76). Diyabetik erektil disfonksiyonlu hastalardan izole edilen korpus kavernoza hem nörojenik hem de endotelial gevşemeler bozulmuştur. Benzer sonuçlar alloxanla indüklenen diyabette de açık olarak görülmüştür. Diyabetik erektil disfonksiyonlu hastalardan izole edilen korpus kavernoza elektriksel saha stimülasyonuna azalmış gevşeme yanıtları da gösterilmiştir. Bu sonuç düz kasın kasılabilme yeteneğindeki azalmayla değil NO üretiminin yetersizliğiyle ilgiliydi. Yapılan çalışmalar diyabetle bağlantılı erektil disfonksiyon patogeneğinde, ya NO'nin etkisizleştirilmesine (AGE ile) bağlı L-arginin substrat yetersizliğinin ya da süperoksid anyonları ile inaktivasyonun rol oynadığını ortaya koymuştur. Eretil disfonksiyon ile diyabet arasındaki başka bir ilişki de, dolaşımında artmış olan endotelin-1 (ET-1) düzeyleridir. ET-1 vazokonstriktör bir peptiddir ve NO'nin fizyolojik antagonisti olarak kabul edilir. ET-1'in hipertansiyon ve diyabetin gelişiminde rolü olabileceği ve bu hastalıklarında erektil disfonksiyonla ilişkili kardiyovasküler risk faktörleri arasında yer aldığı önerilmiştir. Diyabetik erektil disfonksiyonlu erkeklerde plazma ET-1 düzeyleri diyabetik erektil disfonksiyon bulunmayanlardan daha yüksek bulunmuştur. ET-1 diğer spazmojenlerin düz kas kasılma yanıtlarını da potansiyalize eder (139).

Penil ereksiyonun ana mediyatörü NO'dir. Arginaz II enzimi L-arginin için NOS ile yarışmaya girer ve NO üretimini azaltır. Yakın zamanda Arginaz II enziminin insan korpus kavernoza bulduğu diyabette artış gösterdiği ve bu enzimin inhibisyonun NO'e bağımlı korpus kavernoza düz kas gevşemelerini artırdığı bildirilmiştir (15).

2.10. Diyabetin gastrointestinal sistem üzerine etkileri

Diyabet disfaji, abdominal ağrı, mide bulanması, kusma, malabsorbsiyon, fekal inkontinans ve diyare gibi gastrointestinal komplikasyonlara neden olur (159). Başka bir komplikasyon da midenin atonik dilatasyonudur (60).

Streptozotosin-diyabetik fare gastrik antral düz kaslarının kolinerjik agonistlere azalmış kasılma cevapları gözlenmiştir. Bu değişiklik hem azalmış muskarinik reseptör aktivitesine hem de değişmiş G protein aktivitesine atfedilmiştir (108).

Takashi ve ark. diyabetik gastroparezinin patofizyolojisini çalışmak için insanlardaki insüline bağımlı diyabete benzerlik gösteren BB/W rat modelini kullanmışlardır. Karbakol ve P maddesiyle indüklenen gastrik sirküler kas kasılmaları BB/W ratlarında kontrole göre belirgin olarak bozulmuştur. Direk bir G proteinleri stimülanı olan NaF kasılmaları diyabetik BB/W ratlarında belirgin olarak azalmıştır. KCl kasılmalarında farklılık görülmemiştir (142). Elektriksel saha stimülasyonu ile uyarılan kasılmalar BB/W ratlarında belirgin olarak bozulmuştur. Elektriksel saha stimülasyonu ile oluşan kasılmalar atropinle önemli ölçüde inhibe edilmiştir. Bazal sitozolik PKC aktivitesi, diyabetik BB/W gastrik kas hücrelerinde belirgin olarak azalmıştır. Takahashi ve ark. hem reseptörle çalıştırılan hem de voltaja duyarlı kalsiyum kanalının gastrik düz kas hücrelerinde bulunduğunu belirtmişlerdir, çünkü karbakol ve yüksek K^+ , gastrik kas kasılmasını sağlamıştır. Karbakol stimülasyonu bozulmasına rağmen, yüksek K^+ konsantrasyonu ile indüklenen kasılmalar azalmamıştır bu da voltaj duyarlı L tipi kalsiyum kanallarının diyabetik BB/W ratlarında büyük oranda sağlam olduğunu önermiştir. Bu gözlem aynı zamanda kontraktıl apparatusun (Ca^{2+} /kalmodulin, aktin-myozin yolağı), diyabetik BB/W ratlarında bozulmadığına işaret etmektedir (142).

2.10.1. Diyabetin gastrointestinal düz kaslar üzerine etkisi

2.10.1.1. Diyabetin neden olduğu yapısal değişiklikler

Streptozotosin-diyabetik ratlarında megakolon gözlenmiştir ve proksimal kolonun ağırlığı artmıştır (85). İntestinal düz kasların proliferatif büyümesi ve sonuç olarak intestinal duvarın kalınlaşması uzun süreli streptozotosin diyabetinde gözlenmiştir (99). Streptozotosin-diyabetik ratlarında ileumun total ağırlığı kontrollerle karşılaştırıldığında azalmıştır (85). Streptozotosin-

diyabeti vazoaktif intestinal polipeptid miktarını ve gastrik somatostatin miktarını artırır (14, 42). Metiyonin ve enkefalin miktarı ince barsakta belirgin olarak azalmıştır (50).

2.10.1.2. Diyabetin neden olduğu fonksiyonel değişiklikler

Diyabetin geç dönem komplikasyonlarından biri de diyare, dispepsi, hipoklorhidri ve gastropareziyi içeren gastroenteropatidir (100). Streptozotosin diyabetli farede α_2 -adrenoseptör agonistiyle indüklenen intestinal geçişteki gecikme azalır (119). Barsakta iyonların ve sıvı transportunun α_2 -adrenoseptörlerle düzenlenmesi ve adrenerjik kontrolün kaybolmasının diyareye neden olduğu bildirilmiştir (26).

Benzer şekilde μ selektif opiyat agonisti olan U-5048H'nin antitransit etkisi streptozotosin-diyabetinde zayıflamıştır (118). Bu bulgular streptozotosin-diyabetinin α_2 -adrenoseptör ve μ opiyat reseptörlerinde değişiklik yaptığını önermiştir. Diyabetteki diyare ve konstipasyon arasındaki karışık fizyolojik mekanizmalar çok net değildir. Alloksan ya da streptozotosin-diyabetik ratlardaki ince barsağın duodenum, jejenum, ileum ve mide fundusu gibi değişik bölümlerinde azalmış β -adrenerjik cevaplar gösterilmiştir (108). Streptozotosin-diyabetik ratların gastrik fundusunda β -adrenoseptör sayısında azalma olduğu bildirilmiştir (125).

Streptozotosin-diyabetik ratlarında asetilkoline karşı azalmış kasılma, değişmemiş kasılma ve artmış kasılma yanıtları bildirilmiştir (108). Korolkiewicz ve ark. streptozotosin-diyabetik izole fundal düz kas şeritlerinde, karbakol ve galanine karşı azalmış kasılma cevapları tespit etmişlerdir. Bu çalışmada L-NAME 4 haftalık diyabetteki değişiklikleri geri çevirirken 8 haftalık diyabetteki değişiklikleri geri çevirememiştir. İn vivo olarak insülin verilmesi de düz kas kasılmasında diyabetle indüklenen değişiklikleri önlemiştir. Yazarlar düz kas kasılmasındaki bu azalmayı, en azından kısmen artmış nitrik oksid sentezine bağlamışlardır (81). Diyabetik ratlardaki düz kas hücrelerinde asetilkoline artmış muskarinik reseptör duyarlılığı, norepinefrine karşı ise azalmış adrenoseptör duyarlılığı tespit edilmiştir (158).

Alloksan ve streptozotosin-diyabetik rat izole gastrik fundusunda serotoninle indüklenen kasılmaların azaldığı bildirilmiştir. Bu azalma insülin verilmesiyle düzelmiştir (161). Benzer şekilde norepinefrin ve vazoaktif intestinal polipeptide karşı azalmış gevşeme yanıtları gösterilmiştir (70). Diğer taraftan diyabet gastrointestinal prostaglandin sentezinde değişikliğe yol açmamıştır (67).

2.10.1.3. Diyabetin postreseptör olaylar üzerine etkisi

Streptozotosin-diyabetik rat gastrik fundus düz kaslarında KCl'e artmış kasılma yanıtları gözlenmiştir. Gastrik fundus düz kasında artmış Ca^{2+} içeriye akışı gözlenmiştir (4). Uzun süreli streptozotosin-diyabetik ratlarda duodenal düz kaslarda intrasellüler kalmodülün düzeyleri düşük olarak bulunmuştur (109). Streptozotosin-diyabetik rat intestinal düz kaslarında PKC aktivitesi, kalsiyum ve DAG bağımlı protein kinaz aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (154). PKC'nin maksimal aktivitesi için kalsiyum ve kalmodulinin gerekli olduğu ama bu enzimin fonksiyonu için esansiyel olmadığı bildirilmiştir (143). PKC, iyon kanallarının iç bölgelerini fosforile ederek kalsiyum kanal aktivitesinde önemli rol oynar (129). Streptozotosin-diyabetik rat ve spontan olarak diyabetik db/db farelerini antral düz kas hücrelerinde, eritromisine (bir motilin reseptör agonisti) değil fakat, karbakole olan kasılma cevapları bozulmuştu. İnsülin verilmesi karbakol cevaplarının bozulmasını engellemiş fakat, bozukluk bir kez oluşuktan sonra geri çevirememiştir. GTP γ S uygulaması, diyabetiklerde değil fakat, diyabetik olmayanlarda doz cevap eğrisini sağa kaydırmıştır. Yazarlar diyabetle ilişkili antral düz kas hücre kasılmasının muskarinik kontrolünün, postsinaptik düzeydeki muskarinik reseptörlerle kenetlenmiş GTP bağlayıcı proteinlerdeki değişikliklerle bağlantılı olduğunu önermişlerdir (137).

2.11. Rho kinaz yolağı

Monomerik GTP'azların Ras süperfamilyasının Rho subfamilyası üyesi olan küçük GTP'az Rho, agonist stimülasyonuyla indüklenen Ca^{2+} sensitizasyonundan sorumludur ve myozin fosfataz aktivitesini inhibe ederek fonksiyon gösterir (46). Rho/Rho-kinaz yolağı stres fibrillerinin oluşumu, trombosit agregasyonu, lenfosit ve fibroblast adezyonu, sitokinez ve hücre migrasyonu, düz kas kasılması, aktin hücre iskeleti reorganizasyonu, hücre şekil değişikliği, proliferasyon ve hipertrofi gibi değişik hücre fonksiyonların düzenlenmesinde önemli roller alabilir (96, 46, 95, 144).

İki yeni G protein olan G_{12} ve G_{13} , küçük GTP bağlayıcı protein olan Ras aracılığıyla Jun kinazları aktive eder. İlginç olarak G_{12} ve G_{13} küçük molekül ağırlıklı GTP bağlayıcı Rho proteinini de aktive eder. G_{12}/G_{13} aynı zamanda, hücre iskeleti olaylarını da düzenleyebilen Na^+/H^+ değiş-tokuş proteinini stimüle eder (116, 19, 36).

Lizofosfatidik asid multifonksiyonel mesajcı bir fosfolipiddir ve küçük molekül ağırlıklı GTP-bağlayan bir protein olan Rho'yu aktive etmek ve hücre iskeleti aktininin hızlı "re-modeling" ini tetiklemek üzere G-proteinleri ile kenetli bir reseptörü aktive eder. Bir G proteini olan G_{13} 'ün, Swiss 3T3 kültür fibroblastlarında Rho'yu aktive etmek için lizofosfatidik asid reseptörleriyle kenetlendiği bildirilmiştir. Ayrıca epidermal büyüme faktörü reseptörünün, G_{13} aracılığıyla Rho aktivasyonu ve stress fibrilleri oluşumunun yolağında yer aldığına ilişkin kanıtlar bulunmaktadır (48).

Rho, hücre bölünmesindeki bölünme yarığının oluşmasında yer alan myozin II ve aktin filamentlerinin fonksiyonları için gereklidir. Bunun yanı sıra sitokinez boyunca, hücrenin kortikal aktiviteleri için de Rho sinyal yolağı kullanılır. Rho kinaz, aynı zamanda myozin fosfatazı inhibe ederek de bölünme yarığının oluşmasına katkıda bulunabilir. Buna ek olarak bazı Rho fonksiyonları, "formin" proteinleri aracılığıyla gerçekleştirilir. Hücre iskeletinin plazma mebranına tam olarak nasıl bağlandığı bilinmemektedir. Bununla birlikte Rho kinaz, "radiksin" proteinini fosforilleyerek bu olayı düzenleyebilir. Bazı çalışmalar Rho ve Cdc42'nin direk olarak formin proteinlerinin bazı bölgeleriyle etkileştiğini ve forminlerin yeni aktin polimerizasyonu ile sinyal kaskadı arasında bağlantı kurduğunu önermiştir (123).

Küçük molekül ağırlıklı GTP bağlayıcı proteinler, 20-40 kDA'lık monomerik G proteinleridir. Memeli Rho ailesi en az 10 farklı üyeden oluşur (144).

1. Rho izoformları

RhoA

RhoB

RhoC

RhoD

RhoE

RhoG

2. Rac izoformları

Rac1

Rac2

3. Cdc42 izoformu

4. TC10 izoformu

RhoA, RhoB, RhoC (burada hepsine birden Rho denmiştir) efektör bölgelerinin aynı amino asid dizilişleri vardır ve benzer hücrel fonksiyonları bulunmaktadır (46). RhoA, vücutta en bol bulunan ve eksprese edilen ve en çok çalışılan Rho proteini alt tipidir (91, 17). Rho/Rac/Cdc42 (cell division cycle 42) proteinlerinin diğer fonksiyonları arasında membranal olaylar ("membranal trafficking"), akson rehberliği ve genişlemesi gibi farklı hücrel olayların da yer aldığı bildirilmiştir (144, 17). Son zamanlardaki çalışmalar büyüme faktörüyle indüklenmiş hücre dağılımı ("scattering") gibi dinamik hücre fonksiyonları için Rho/Rac/Cdc42 proteinlerinin aktivasyon ve inaktivasyonu siklusunun gerekli olduğunu göstermiştir (144).

İnsan ürotensin II molekülü, izole rat torasik aortunda damar kastırıcı özellik gösteren bir peptiddir. Ürotensin ile oluşturulan kasılma, protein kinaz C, tirozin kinaz ve Rho kinaz inhibitörleriyle inhibe edilmiştir. Ürotensin aynı zamanda aktin stres fibrillerinin oluşumu ve düz kas proliferasyonunu indüklemiştir. Dokuların daha önceden somatostatin reseptör antagonistleri ile muamelesi ürotensin kasılmalarını engellemiştir (124).

Rho kinaz ile kalponinin fosforile olduğu ve böylece F-aktinle bağlanmasının inhibe edildiği gösterilmiştir. Kalponin, düz kas hücrelerinde F-aktin, kalmodulin ve tropomyozin bağlayıcı protein olarak keşfedilmiştir. Kalponinin bazik izoformunun, myozin fosfataz ile defosforile edildiği ve kasılmayla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Fosforile olmamış kalponin F-aktine bağlanır ve aktinle aktifleşmiş olan myozin ATPaz aktivitesini inhibe eder. Fosforile olduğunda bu özelliklerini kaybeder (73).

2.11.1. Rho aktivitesinin düzenlenmesi

Rho/Rac/Cdc42 proteinlerinin aktivasyon ve inaktivasyonları sırasıyla GEP (guanin nükleotid exchange factors) ve GAP (GTPase activating proteins) proteinleriyle düzenlenir. Bununla birlikte diğer bir tür regülatör olan GDI (GDP dissociation inhibitor)'larla daha fazla düzenlenir. Sitozolda Rho/Rac/Cdc42 proteinleri GDI ile birleşmiş halde bulunurlar ve GDP-bağlayıcı inaktif formda tutulurlar. GDP bağlayıcı form GDI'dan ilk olarak henüz bilinmeyen bir mekanizma ile salıverilir ve GEP'in etkisiyle GTP bağlayıcı forma dönüştürülür. GTP bağlayıcı form GAP'ın etkisiyle GDP bağlayıcı forma dönüştürülür. Sonra GDP bağlayıcı form GDI ile kompleks oluşturarak sitozole döner. Diğer GTP bağlayıcı proteinler gibi Rho hem GDP/GTP bağlayıcı hem de GTPaz aktivitesi gösterir ve moleküler bir düğme gibi çalışarak GDP bağlayıcı

inaktif durumla (GDP-Rho) GTP bağlayıcı aktif durum arasında dolaşır. Rho'nun aktivitesi siklik olarak düzenlenir. Böylece istirahattaki hücrelerde Rho GDP disosiyasyon inhibitörü (Rho GDI), GDP-Rho'ya bağlanır ve onu membrandan sökerek sitozole getirir. Hücreler bazı agonistlerle stimüle edilirse GTP-GDP değişim reaksiyonunu stimüle eden GEF'lerin etkisiyle GDP-Rho GTP-Rho'ya dönüşür. Bundan sonra GTP-Rho C-terminali geranil-geranillenmiş kuyruğuyla hücre membranına hedeflenir ve spesifik hedefleriyle etkileşir. GTPazı aktive eden proteinler (GAP) Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini hızlandırarak ve onu inaktif GDP-Rho'ya dönüştürerek negatif regülatörler gibi çalışırlar (144).

Memeli Rho proteinlerinin çok sayıda alt (downstream) efektörü tanımlanmıştır. Aynı zamanda ROK ve Rho kinaz olarak isimlendirilmiş olan p160 ROCK yakın zamanda tanımlanmış olan serin/treonin protein kinazdır ve Rho proteinlerinin bir alt efektörüdür. Bu protein kinazın aktivitesi GTP-Rho proteinleri ile stimüle edilir. Çok sayıda ROCK/Rho kinaz substratı tanımlanmıştır; bunlar myozin hafif zincir fosfatazın myozin bağlayıcı alt ünitesi, myozin hafif zinciri adducin (adducin), intermediyer filamentler, ERM (ezrin-radiksin-moesin) ve kofilini içerir. Bunlardan MLC, ERM ailesi proteinleri ve adducin hem Rho kinazın hem de myozin fosfatazın substratlarıdır. Bir GTP analogu olan GTP γ S, kalsiyum duyarlılığı oluşturur. Rho proteinleri kalsiyum tetikleme olmaksızın düz kas kasılması oluşturmaz; daha ziyade düz kas kasılmasının kalsiyuma duyarlılığını modifiye ederler. Y-27632, Y-32885, H-7, fasudil ve hidrokisfasudil gibi birkaç kimyasal bileşiğin spesifik olarak Rho kinaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Botulinum toksin C3, Rac ve Cdc42 gibi Rho ailesi üyelerini zayıf olarak ADP-ribozillerken Rho'yu spesifik olarak ADP-riboziller. Bu yüzden C3 toksin Rho'nun spesifik inhibitörü olarak kabul edilir (144, 7, 6, 140).

Rho kinaz aynı zamanda ROK α ve ROCK2 olarak tanımlanmıştır. ROK β (aynı zamanda ROCK1 olarak da bilinir) Rho kinazın bir izoformudur (46, 144). Rho/Rho-kinaz'ın yanı sıra PKC, tirozin kinaz ve fosfatidilinozitol-3 kinazın da vasküler düz kas hücrelerinde Ca²⁺ duyarlılığında yer aldığı bildirilmiştir (92).

Myozin fosfataz (MP) üç alt üniteden oluşur;

1. Myozin bağlayan alt ünite (myosin binding subunit, MBS)
2. 37 kDA tip 1 fosfataz katalitik alt ünite
3. 20 kDA düzenleyici alt ünite.

Myozin fosfataz, myozin bağlayıcı alt ünite üzerinden fosforillenmiş myozin hafif zincirine bağlanır ve onu defosforile eder. In vitro olarak Rho kinaz ile MBS'in fosforillenmesi myozin fosfataz (MP)'ı inhibe eder. Rho kinaz aynı zamanda myozin hafif zinciri (MLC)'ni de fosforile ederek kasılma prosesine katkıda bulunur (7).

Rho kinaz yolu, myozin II'nin myozin hafif zincirinin fosforilasyon düzeyinin düzenlenmesini esas olarak myozin fosfatazı inhibe ederek yapar ve düz kas kasılmasında agonistle indüklenen Ca^{2+} duyarlılığına katkıda bulunur. Bununla birlikte Ca^{2+} indikatörleri kullanılarak intrasellüler kalsiyum ölçüldüğünde Ca^{2+} konsantrasyonu, myozin hafif zincir (MLC, myozin light chain) fosforilasyonu ve düz kas kasılmasıyla her zaman paralel değildi. Sonuç olarak çalışmalar GTP bağlayıcı protein olan Rho'nun agonist aracılı Ca^{2+} duyarlılığında yer aldığını ortaya çıkarmıştır. Daha da önemlisi GTP bağlayıcı proteinlerle artmış MLC fosforilasyonu myozin hafif zincir kinaz (MLCK, myozin light chain kinase) aktivasyonundan çok, myozin fosfatazın inhibisyonuna bağlı olduğu anlaşılmıştır. Sabit bir Ca^{2+} konsantrasyonunda artmış kasılmaların, aktive edilmiş Rho ile MLC fosforilasyon oranındaki artıştan ziyade defosforilasyon oranındaki azalmadan kaynaklandığı düşünülmüştür (46).

Rho'nun hedefleri (efektörleri)

1-Protein kinaz N

2-Rho kinaz

3-Myozin fosfatazın myozin bağlayıcı alt ünitesi

4-Rhofilin

5-Rhotekin

6-Sitron

7-mDia

Rho kinazın N-terminalinde kinaz bölgesi vardır. Orta bölgesinde kuramsal kangal gibi kıvrılmış (coiled-coil) bölge ve C-terminal bölgesinde plekstrin homoloji bölgesi vardır. Aktive olmuş Rho, kangal gibi kıvrılmış bölgenin C-terminal parçasıyla etkileşerek Rho kinazın kinaz bölgesini aktive eder (6). Vasküler düz kas hücrelerinin agonistle indüklenen kasılmasında myozin hafif zincirinin fosforilasyon derecesi kasılma gücü için hayati bir basamaktır. MLC fosforilasyonun miktarı Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı MLCK ve myozin fosfataz arasındaki dengeye bağlıdır (95). Shin ve ark. izole düz kas hücrelerinin $PGF_{2\alpha}$ ile stimüle edilmesinin myozin

fosfatazın lokalizasyonunda, belirgin değişiklik oluşturduğunu göstermiştir. Bu durum myozin fosfatazın Rho kinaz ile inhibisyonunda alternatif bir mekanizma oluşturur (130).

Kaveolin-1'in çatı bölgesi rat uterin düz kaslarında, PKC α 'nin ve RhoA'nın karbakol ile indüklenen mebrana lokalizasyonunu engellemiştir. Kaveolinler, kaveolar plazma membran girintilerinin ana protein yapılarıdır. Uterus, mide ve ileal düz kaslarda her üç kaveolin izoformu da saptanmıştır. Kaveolalardaki yoğun cisimcikler hücre iskeleti için bağlanma bölgeleridir. Son zamanlarda kaveolinlerin eNOS, PKC α ve RhoA'yı da içeren birçok sinyal iletim molekülüyle etkileştiği gösterilmiştir. Kaveolin-1'in kısa bir sitoplazmik

N-terminal bölgesi bu etkileşme için gerekli görölmektedir. Bu bölge çatı (scaffolding) bölgesi olarak isimlendirilmiştir. Fibroblastlarda kaveoladan zengin membran bölgelerinde PKC α ve RhoA'nın birlikte yerleşim gösterdikleri tespit edilmiştir (141).

2.11.2. Vasküler doku ve Rho kinaz ilişkisi

Rho/Rho-kinaz aracılı intrasellüler sinyal yolağı trombin, anjiyotensin II, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, ve serotonin gibi çeşitli vazoaktif ajanlar tarafından aktive edilir. Bu bakımdan Rho kinaz yolağının vasküler lezyonların gelişiminde önemli rol oynadığı önerilmiştir. Fasudil ile uzun süre tedavi sonucunda vasküler düz kas hücresi ve fibroblast

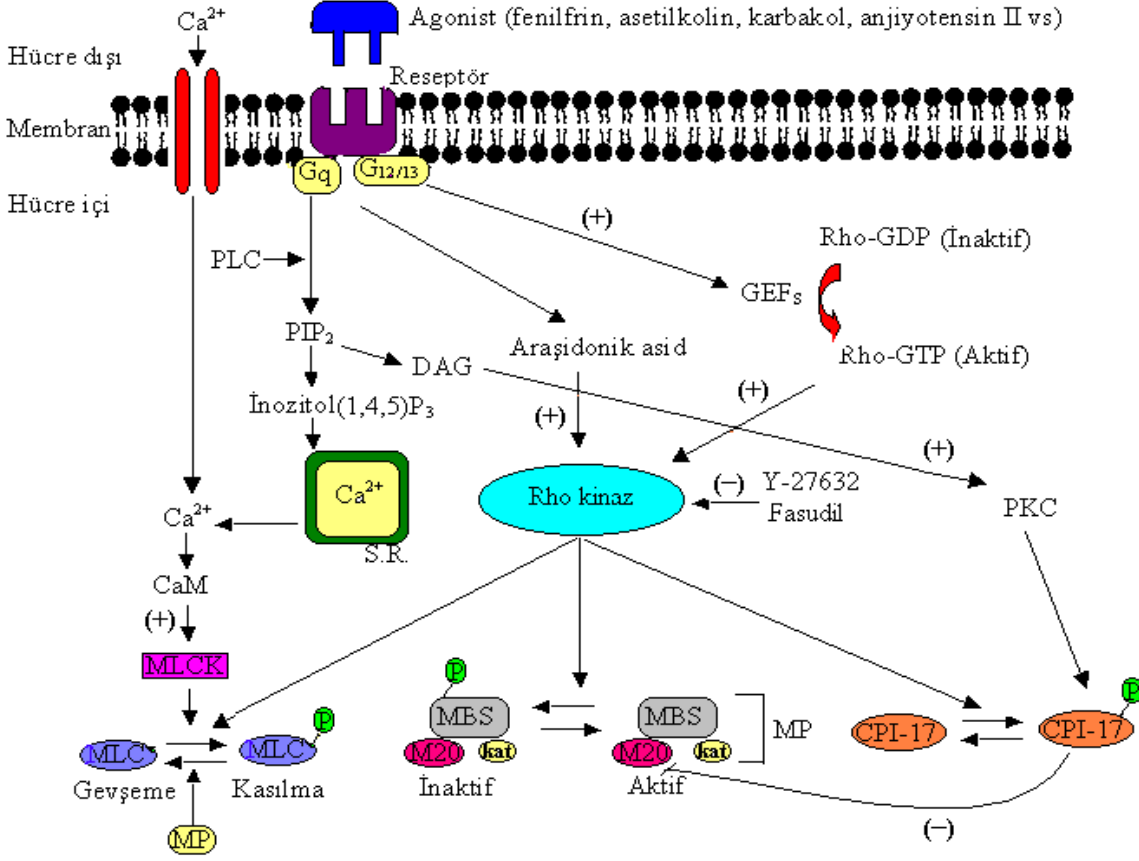
Tablo I: Rho kinaz substratları

Substratlar	Fonksiyonlardaki değişiklik	Biyolojik özellikler
Myozin fosfatazın myozin bağlayıcı alt ünitesi	Myozin fosfatazın inhibisyonu	Düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlaşması
Myozin hafif zinciri	Myozinin F-aktine bağlanmasında artış	Stres fibrilleri oluşumu, fokal adezyon oluşumu, nörit retraksiyonu, hücre kasılması, hücre motilitesi
CPI-17 proteini	Myozin fosfatazın inaktive edici aktivitesinin aktivasyonu	Düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlaşması
Kalponin	F-aktine bağlanmada azalma	Düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlaşması
Ezrin Radiksin Moesin (ERM)	Ezrin Radiksin Moesin aktivasyonu	Mikrovillus oluşumu
Addusin	F-aktine bağlanmada artış	Membranal olaylar (ruffling), hücre motilitesi
İntermediyer filamentler (GFAB, vimentin)	Flamentlerin dağılımı	Flamentlerin sitokinez için ayrılması
Na^+/H^+ değiştirici	Değiştirici aktivitenin aktivasyonu	Stres fibrilleri oluşumu
LIM kinaz	Kinaz aktivitesinde artış	Kofilinin fosforilasyonu
CRMP-2	---	Büyüme konisi kollapsı

proliferasyon ve migrasyonu hem de inflamatuvar hücrelerin vasküler duvara göçü gibi kritik basamakları inhibe edebileceği büyük bir olasılıktır. Rho kinaz ile aracılık edilen sinyal yolağı sadece hipertansif vaskülopatide yer almaz aynı zamanda vasküler hastalıkların diğer formlarında da yer alır (95).

NO, cGMP bağımlı protein kinaz aracılığıyla damar gevşemesi oluşturur. Bir çalışmada rekombinat cGMP ile, cGMP-bağımlı protein kinazın RhoA'yı fosforilleyebileceği ve böylece RhoA'yı inhibe edebileceği gösterilmiştir. Endoteli sağlam rat aortunda Y-27632 fenilefrine karşı oluşan maksimal kasılmalar azaltmıştır. Oysa endoteli soyulmuş ringlerde Y-27632 fenilefrine karşı oluşan kasılmaları inhibe etmekte yetersiz kalmıştır. Bunun yanında sodyum nitroprusiyatın fenilefrinle indüklenen RhoA translokasyonunu geri çevirdiği bulunmuştur. Endoteli sağlam ringlerde nitrik oksid sentaz inhibitörleri ve guanilat siklaz inhibitörleri varlığında Y-27632, fenilefrile indüklenen kasılmaları inhibe etmekte belirgin olarak daha az etkili olmuştur. Bütün bu

bulgular, intakt rat aortunda nitrik oksidin Rho kinazın kasıtrıcı aktivitesini inhibe ederek gevşeme oluşturduğunu göstermektedir (31).



Şekil 1: Düz kas kasılmasının düzenlenmesinde Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağının rolü. Çeşitli agonistlerle uyarılan reseptörler, G_q tipi heterotrimerik G proteinleri aracılığıyla hücre içi Ca^{2+} seviyelerini artırarak myozin hafif zincir kinazını (MLCK) aktive ederken, aynı zamanda $G_{12/13}$ alt üniteleri aracılığıyla da guanin nükleotid değıştirici faktör (GEF)'leri aktive ederler. GEF'ler inaktif Rho'yu (Rho-GDP) aktive (Rho-GTP) ederek onun membrana taranslokasyonunu sağlar. Aktif Rho da alt efektörlerden (downstream) biri olan Rho kinazı aktive eder. Rho kinaz myozin fosfatazın (MP) myozin bağlayıcı alt ünitesini (MBS) fosforilleyerek myozin fosfatazı inhibe eder. Rho kinaz aynı zamanda direk olarak myozin hafif zincirini (MLC) de fosforiller. Ayrıca Rho kinaz araşidonik asid ile de stimüle edilir. Bunlara ek olarak Rho kinaz, myozin fosfatazın fosforilasyona bağımlı inhibitörü olan CPI-17'yi de, PKC gibi, fosforilleyerek aktive eder. Böylece Rho kinaz esasen myozin fosfatazı inhibe ederek ayrıca myozin hafif zincirini direk olarak fosforilleyerek hücre içi kalsiyumun düzeyinden bağımsız bir şekilde düz kasın kasılma derecesini artırır. Fasudil ve Y-27632 spesifik Rho kinaz

inhibitörleridir. PLC: fosfolipaz C, PIP₂: fosfoinozitol (4,5) bifosfat, DAG: diaçil gliserol, S.R: sarkoplazmik retikulum, CaM: kalmodulin, M20: myozin fosfatazın 20 kDA düzenleyici alt ünitesi, kat: myozin fosfatazın katalitik alt ünitesi, PKC: protein kinaz C.

Sıcaklık düşürülerek oluşturulan mikrotübül depolimerizasyonunun, Rho kinaz aktivasyonu aracılığıyla rat aortunda kasılmaları artırdığı bildirilmiştir. Hücrel mikrotübül ağının veziküler transport, sinyal iletimi ve hücre bölünmesi gibi çeşitli hücrel olaylarda görev aldığı bilinmektedir (30).

RhoA ve mitojenle-aktive olan kinaz gibi birkaç intrasellüler sinyal yolağının, sfingozin 1-fosfat (SIP) ile aktive edildiği bulunmuştur. SIP, aktive olmuş trombositlerden salıverilen bir lipiddir. Vasküler düz kas hücre kültürlerinde SIP sinyalinin, proliferatif cevapları uyardığı gösterilmiştir (34). Diğer taraftan Rho kinaz ile aracılık edilen Ca²⁺ duyarlaşmasında sfingozil fosforilkolinin yeni bir ikincil ulak olduğu bulunmuştur (131).

Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632 tavşan baziller arterinde endotelin-1 ile indüklenen kasılmaları inhibe etmiştir (92). Ek olarak Rho/Rho-kinaz yolağı sığır serebral arterindeki Ca²⁺ duyarlılığından da sorumludur (131). Rho kinaz ve bu arada kısmen protein kinazı da inhibe eden fasudil in vivo olarak hayvanlara verildiğinde vazodilatör etki oluşturduğu gösterilmiş ve güncel olarak serebral vazospazmın tedavisinde denenmektedir. Bu bileşik aynı zamanda agonistle olan kasılmaları izole vasküler düz kaslarda inhibe eder. Naguma ve ark. in vivo olarak uygulanan fasudilin Rho kinazı inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aynı ekip yaptıkları çalışmada fasudilin saflaştırılmış Rho kinaz için güçlü bir in vitro inhibitör olduğunu göstermiştir (96).

Aortokoroner ya da infrainguinal bypass yapılacak olan hastalardan alınan safen veni in vitro ortamda arteryel basınç koşullarında perfüze edildiğinde fenilefrin ve serotonine duyarlılığının arttığı görülmüştür. Bu duyarlık Y-27632 ile önlenbilmiştir (89).

Trombinin insan umbilikal veninde hızlı ve geçici bir RhoA aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Buna artmış myozin hafif zincir fosforilasyonu, F-aktin stres fibrilleri oluşumu ve uzamış olan artmış permeabilite eşlik etmiştir. Y-27632 ile Rho kinazın inhibisyonu, bütün bu etkileri belirgin olarak azaltmıştır (10).

Koroner bypass ameliyatı yapılan 15 hastadan izole edilen deendotelize internal torasik arterlerde serotonin ve histamin, hidroksifasudil ile belirgin olarak inhibe edilen kasılmalar oluşturmuştur. Serotoninle indüklenen kasılmalar süresince MBS (myozin fosfatazın myozin bağlayıcı alt ünitesi) ve CPI-17 (C-kinaz ile aktive olan fosfataz inhibitörü) fosforilasyonu

belirgin olarak artmıştır. Hidroksifasudil MBS fosforilasyonunu inhibe ederken CPI-17 fosforilasyonunu inhibe etmemiştir (72).

Vasküler düz kas hücrelerinin medyadan subendotelyal bölgeye göçü (migrasyonu), balon anjiyoplasti ve ateroskleroz sonucu gelişen intimal kalınlaşmada önemli rol oynar. Aktive olmuş trombosit ve hücrelerin bir ürünü olan lizofosfatidik asid (LPA), düz kas hücre büyümesine ve çeşitli hücrelerin göçüne neden olur. LPA ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü aracılığıyla oluşan düz kas göçü Rho/Rho-kinaz aracılığıyla olmaktadır. Bununla birlikte söz konusu göçte Rho/Rho-kinazın farklı alt inisiyasyon yolları yer almaktadır. LPA aracılı düz kas göçü MLC fosforilasyonu ile bağlantılı iken trombosit kaynaklı düz kas göçü MLC fosforilasyonundan bağımsız olarak bulunmuştur (3).

Rho kinaz aktivitesini spesifik olarak inhibe eden propların kullanılmasıyla hayvan modellerinde Rho/Rho-kinaz yolağı bozukluklarının sıklıkla ölüme neden olan hipertansiyon, vasküler spazm ve arteriyosklerozun ana nedeni olduğu gösterilmiştir. Bu alandaki ilerleme bu hastalıkların tedavisinde kayda değer ilerleme ve etkileyici bir gelecek önermiştir. İlk olarak Ca^{2+} -bağımlı kastırıcı mekanizmaları hedef alan Ca^{2+} kanal blokerlerine ek olarak spesifik Rho-kinaz inhibitörlerini kullanarak Rho/Rho-kinaz yolağının modüle edilmesi düz kası gevşetmek için gelişmiş bir metod olabilir. İkincisi birçok iskemik hastalık patogenezi ve vasküler bozuklukla bağlantılı olan arteriyoskleroz geri dönüşümlüdür ve Rho-kinaz inhibisyonu ile tedavi tedavi edilebilir (46).

2.11.2.1. Diyabetik vasküler doku ve Rho kinaz ilişkisi

Rho aracılı yolağı hipertansiyon, vasküler vazospazm, diyabete cevap olarak gelişen artmış damar kasılması için önemli rol oynar (91). Bir yıllık diyabetik ratların aortik düz kas kasılmasının genel artış gösterdiği ve bu artışın artmış Ca^{2+} mobilizasyonu ve artmış Ca^{2+} sensivitesine bağlı olduğu öne sürülmüştür (1).

Diyabetik durum vasküler fonksiyonlar için çok çeşitli sinyal transdüksiyon yollarını değiştirebilir. MAP kinaz ve Rho gibi yolların değişmesi kasılabilirliği, hücresel proliferasyonu, geçirgenliği, ekstrasellüler matriks ve sitokin üretimini artırabilir. Miao ve ark. streptozotosin ile indüklenen tip I diyabetik ratları kullanarak baziller arterde yaptıkları çalışmada RhoA'nın transkripsiyonel düzeyde arttığını göstermişlerdir. Baziller arter çevresindeki

morfolojik değişiklikler, 8 hafta boyunca oluşmadı ama RhoA ekspresyonu diyabetin erken basamaklarında (2 hafta) başladı. Sonuçlar farklı olsa da diyabet boyunca vasküler düz kas hücrelerinin fonksiyonu değişebilmektedir. Vasküler düz kas hücrelerinde damar kastırıcılarına karşı artmış reaktivite gözlenmiştir; bununla birlikte bu artış intrasellüler Ca^{2+} artışı ile ilişkili olmayabilir fakat, artmış Ca^{2+} duyarlılığına bağlı olabilir. 4 haftalık diyabetik rat baziller arteri serotoninle belirgin artmış duyarlık gösterdi ve serotoninle indüklenen kasılma RhoA aktivasyonu aracılığı ile gerçekleşir. RhoA protein düzeyleri streptozotosin enjeksiyonundan sonra 2. haftada arttı ve 4 haftada tepe noktasına ulaştı ve 8 haftada plato yaptı. Bununla birlikte RhoA'nın mRNA düzeyleri streptozotosin enjeksiyonundan 4 hafta sonra arttı ve 8 haftada tepe noktasına ulaştı. İnsülin Rho kinaz aktivitesini inhibe ettiği için Rho kinaz aktivasyonu tip II diyabet aortunda artmıştı. Bu çalışmadaki diyabet modelinde, insülin belirgin olarak azalmıştı; bunun nedeninin tip I diyabette azalmış insülin düzeylerinin neden olduğu RhoA aktivasyonuna bağlı olduğu iddia edilmiştir (91, 12).

Diyabetik ratların aortlarının düz kas hücrelerinde artmış PKC'nin Rho'yu aktive edip myozin fosfatazı inhibe ettiği gerçeğinden hareketle, diyabette gözlenen abartılmış Rho kinaz sinyallemesi ve bozulmuş insülin myozin fosfatazı aktivasyonunun, PKC aktivitesine bağlı olduğu speküle edilmiştir. Söz konusu PKC aktivasyonu, fosfolipaz A₂ enziminin araşidonik asidin düzeyini artırmasıyla oluşur. MP aktivitesinin inhibisyonunun trombin, araşidonik asid, PKC, ve GTP γ S ile de olabildiği bildirilmiştir (126).

Son zamanlarda kalponinin Rho kinazın kuramsal bir substratı olduğu önerilmektedir. Kalponin düz kas hücrelerinde aktin filamentle bağlantılı protein olarak bulunmuştur. Bu protein aktin filamentlere bağlanmasının aktinle aktive edilmiş myozin ATP'az aktivitesi üzerine inhibitör etkisi vardır bu da PKC ve CaM bağımlı protein kinaz II gibi kinazlarla geri çevrilmiştir. Bunun yanında Rho kinaz kalponinin aktin filamentlere bağlanma aktivitesini azaltmak için kalponini fosforiller. Bu da Rho/Rho-kinaz yolağının MLC'ye paralel olarak kalponinin fosforilasyonu yoluyla düz kas kasılmasının düzenlenmesine katkıda bulunduğunu speküle edilmesine neden olmuştur (46).

Kas hücrelerinin ve kas dışı hücre motilitesinin kalsiyum duyarlılığının majör mekanizması, bu yapılarda MLC defosforilasyonu yapan düz kas myozin fosfatazın inhibisyonu yoluyla olmaktadır. Forbol esterleri ve diaçilgliserol (DAG) ile aktive olan PKC (ler), fosforilasyon yaparak ve katalitik alt ünitesinin inhibitörü olan CPI-17 (C-kinaz ile aktive olan fosfataz

inhibitörü)'yi aktive ederek myozin fosfatasını inhibe edebilir; Bu mekanizma Rho/Rho-kinaz yolağından bağımsızdır ve G-proteinle eşleşmiş Ca^{2+} duyarlılığı mekanizmasında sadece minör ve geçici bir rol oynar. Forbol esterleriyle indüklenen Ca^{2+} duyarlılığı, Y-27632 ile inhibe edilmedi (45). Son kanıtlar, CPI-17'nin aynı zamanda Rho kinaz ile de aktive edilip fosforillendiğini ve bu fosforilasyonun myozin fosfataz aktivitesinde bir inhibisyonla sonuçlandığını göstermiştir (134, 46).

Non-obez insüline dirençli spontan olarak tip II diyabet geliştiren *Goto-Kakizaki* (GK) ratları WKY (*Wistar Kyoto*) ratlarının yüksek dereceden yakın ırkındandır. Bu genetik rat modeli tip II diyabeti anlamak için önemlidir, çünkü glikozla stimüle edilen insülin sekresyonu, periferik insülin rezistansı, hiperinsülinemi ve hiperglisemideki defekt doğumdan 4 hafta sonra erken olarak ortaya çıkar. Son kanıtlar, düz kas hücrelerindeki eksitatör agonistle reseptör aktivasyonunun Rho bağımlı sinyal yolağının aktivasyonu ile eşleştiği ve bu eşleşmenin de myozin fosfataz inhibisyonuna neden olarak 20 kDA myozin hafif zincirinin (MLC_{20}) fosforilasyonu ve kasılmaya sonuçlandığı ortaya çıkmıştır. Normal kontrol WKY ratlarından izole edilen vasküler düz kas hücrelerinde insülin Rho kinazı inaktive eder ve MBS fosforilasyonunu azaltarak MP aktivasyonuna neden olur. Bu yolağı ek olarak insülin aynı zamanda fosfoinozitol (PI) 3-kinaz/NO/cGMP sinyal yolağını stimüle ederek myozin fosfatayı aktive eder. Diyabetik GK ratlarının vasküler düz kas hücrelerinde ise diyabetle bağlantılı hiperglisemi insülinle oluşturulan myozin fosfataz aktivasyonunda belirgin bozuklukla eşlik edilmiştir. Bunun yanında myozin fosfatanın insülin rezistansı, MBS fosforilasyonu, Rho kinaz aktivasyonu, ve NO/cGMP sinyalinde ve myozin fosfataz aktivitesinde bozukluğa neden olan insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) bağlantılı PI-3 kinaz aktivitesinde belirgin azalmayla eşlik edilmiştir. GK ratlarının kültür vasküler düz kas hücrelerinin normal glikoz düzeyi içeren ortamlara alınması myozin fosfataz aktivasyonunu, sonuç olarak insüline cevapları düzeltmemiştir. Oysa WKY ratlarının kültür vasküler düz kas hücrelerinin yüksek glikoz içeren ortama alınması insülinin myozin fosfataz aktivasyonu üzerine olan etkilerinin inhibisyonu ile sonuçlandı. Bu farklılık metabolik farklılıklardan çok genetik farklılıklara bağlanmıştır. GK diyabeti, artmış trombinle uyarılmış vasküler düz kas hücre kasılması ve artmış MLC_{20} fosforilasyonu ile eşlik edilir. GK ratlarda anjiyotensin II aracılı MLC_{20} fosforilasyonunda belirgin artış tespit edilmiştir (126, 13).

İnsülin, trombin/fenilefrin aracılı RhoA translokasyonunu inhibe eder. NOS ve cGMP inhibitörleri insülin aracılı RhoA inaktivasyonunu bozmuştur. NO/cGMP yolağı, insülin ile indüklenen MBS'in Thr 695 fosforilasyonundaki azalmaya aracılık eder. Hem cAMP bağımlı protein kinaz (protein kinaz A) hem de cGMP bağımlı protein kinaz ile fosforilasyon, Rho'nun membrana bağlanmasını bozarak Rho sinyalini inhibe eder. Rho sinyal yolağı, hem hipertansiyon hem de diyabet patogeneziyle ilişkilendirilmiştir (13).

2.11.3. Rho/Rho-kinaz yolağının kavernoza dokudaki fonksiyonu

Korpus kavernoza düz kasının kasılmasında Rho aracılı Ca^{2+} duyarlaşması önerilmiştir. Wang ve ark. direk olarak permeabilize edilmiş tavşan ve insan korpus kavernoza Ca^{2+} duyarlığı göstermişlerdir ve bu yolağın fazlaca eksprese edilen moleküler komponenti olarak belirlemişlerdir. Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632, fenilefrinle kastrılmış kavernoza şeritleri doza bağımlı olarak gevşetmiştir. Son çalışmalarındaki veriler, kastrasyonu takiben Rho/Rho-kinaz yolağının korpus kavernoza aktif olduğu ve testosteron kaybı sonucu erektil disfonksiyona katkıda bulunduğunu önermiştir. Hem ROK α (ROCK II) hem de ROK β izoformlarının korpus kavernoza varlığı gösterilmiştir (155). İn vivo bir rat modelinde bir Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632 korpus kavernoza basıncını artırmıştır, yani ereksiyona neden olmuştur (32).

Chitale ve ark. yaptıkları çalışmalar sonucunda diğer vasküler yataklardan alınan verilerle uyumlu olarak, rat korpus kavernoza da Rho kinazın α -adrenerjik ve endotelin-1 ile indüklenen kasılmalara aracılık ettiğini önermişlerdir (29).

Mills ve ark. rat korpus kavernoza yaptıkları çalışmada artmış NO ve azalmış Rho kinaz aktivitesinin sinerjik olarak çalıştığını önermişlerdir. Buna göre NO, erektil fonksiyonu kısmen Rho/Rho-kinaz aracılı Ca^{2+} duyarlığını inhibe ederek sağlar. Y-27632 ile tedavi edilen deney hayvanlarından elde edilen korpus kavernoza preparatları düşük voltajdaki elektriksel saha stimülasyonu ile potansiyalize edilmiş cevaplar oluşturmuştur, bu da Rho/Rho-kinaz inhibisyonunun NO aktivitesini artırdığını gösterir (93).

2.11.4. Rho kinaz yolağını gastrointestinal sistemdeki rolü

Ca²⁺ sensitizasyonunun fizyolojik gastrointestinal düz kas kasılmasında yer alıp almadığı bilinmemektedir. Tomomosa ve ark., *in situ* koşullarda Rho kinaz inhibitörü Y-27632'nin gastrik kasılmaların amplitüdünü ve motilite indeksini azalttığını bulmuşlardır. Araştırmacılar ilk defa Ca²⁺ duyarlılığının fizyolojik koşullar altında düz kas kasılmasını artırdığını göstermişlerdir (148).

Diğer taraftan bombezinin, Isrecol kolon karsinom hücrelerinin, invazyon ve migrasyonunun Rho'ya bağımlı bir şekilde uyarıldığı bildirilmiştir (128). Bir statin olan simvastatinin Rho/Rho-kinaz inhibisyonu ve protein kinaz B aktivasyonu yoluyla endotelial doku faktörünün indüksiyonunu engellediği gösterilmiştir (41). ROK α 'nın myozin fosfataz aktivitesini değiştirerek intestinal düz kas kasılmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Bunun da nonvasküler kobay ileumunda Ca²⁺ duyarlılığına neden olan ana mekanizma olduğu sanılmaktadır (140). Rho ve p38 kinazın akut fonksiyonel etkileri gastrik asid sentezinin inhibisyonu olarak ortaya çıkmaktadır. Karbakol en azından kısmen Rho aktivasyonu yoluyla p38 kinazı indükler. Rho'nun p38 kinazı aktive ettiği bilinmektedir. Rho'yu spesifik olarak inhibe eden *Clostridium botulinum* ekzoenzim C3 (C3), karbakolün p38 üzerine oluşturduğu stimülatör etkiyi belirgin olarak engellemiştir (112).

2.11.4.1. Diyabetik gastrointestinal sistem ve Rho kinaz yolağı

Araştırmalarımız sonucu bu konuyla ilgili yapılmış bir çalışma olmadığı görülmüştür.

2.11.5. Rho kinaz yolağının diğer bazı sistem ve olaylarla olan ilişkisi

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda Rho GTPaz genlerinde az sayıda mutasyon saptanmasına rağmen, bazı tip kanserlerde Rho proteinlerinin transkripsiyonel düzeyde arttığını bildiren çok sayıda çalışma vardır. Bunlar arasında genetik olarak farklı olan kolon, akciğer ve meme kanseri bulunur. Yakın zamanlardaki çalışmalar, RhoC genini faredeki metastatik melanom hücrelerindeki metastatik davranışın başlatıcısı olarak belirlemiştir. Ayrıca lösemiyle ilişkili Rho guanin dönüştürücü faktör, Rho aktivatörü olarak belirlenmiştir (17).

Onkojenik Dbl-proteinleri ile indüklenen transformasyon prosesinde ezrin-radiksin-moezin (ERM) üyesi olan ezrinin gerekli olduğu bulunmuştur. Dbl proteinlerinin

ekspresyonunun, hücrenin hücreye temas etmesi sonucu meydana gelen proliferatif etkinin inhibe olması ile etkileşerek onkojenik potansiyele katkıda bulunabileceği belirtilmiştir. Hücresel yaşam makinesinin (machinery) Rho GTPaz'larla direk olarak etkilendiği gösterilmiştir. Bir onkojen olan Ras gibi Rac, Cdc42 ve Rho'nun da transkripsiyonu NF- κ B'ya bağımlı başlatıcılarla pozitif olarak düzenlerler (17).

Son zamanlarda elde edilen veriler, RhoB'nin proapoptotik fonksiyonunu tartışmaktadır. RhoB, normal hücre döngüsünden çıkma potansiyeli olan ve böylece kansere neden olabilecek hasar görmüş hücreleri apoptozise doğru yönlendirebilir. Tümörün hücre döngüsünde yer alan yapışkanlık, göç, yayılma ve apoptotik süreçten kaçış gibi özelliklerin Rho GTPaz aktivitesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (17).

Rho GTPaz'lar, nöronal göç, kutuplaşma (polarizasyon), akson rehberliği (axon guidance), dendrit oluşumu, sinaptik organizasyon, ve plastisite gibi nöronal olaylarla bağlantılı olabilir. Amyotrofik lateral skleroz, mental retardasyon ve "Down sendromu" gibi nörolojik hastalıklar Rho ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca "Wiscott-Aldrich sendromu" ve "Tangier" hastalığında da Rho GTPaz'ın rol oynayabileceği belirtilmiştir (17).

Clostridium botulinum ve *Staphylococcus aureus*'tan salınan C3 transferaz bir ekzotoksin olup ADP-ribozil transferaz aktivitesi göstererek RhoA, B, C'yi inhibe eder. Büyük Klostridyal toksinler (large clostridial toxin) ise *Clostridium spp.* tarafından salınıp glikotransferaz aktivitesi göstererek Rho, Rac ve Cdc42'yi inhibe eder. *Escherichia coli*'den salınan nekrotize edici faktör ve *Bordetella spp.* tarafından salınan dermonekrotik toksin, GTP hidrolizini engelleyerek Rho'yu aktif durumda tutarlar. *Yersinia* ve *Salmonella* bakterilerinden salınan bazı toksinler ise belli bir dereceye kadar GEF_S ve GAP_S'ları taklit ederek hücreye invazyonlarını ve hücreye girişlerini sağlarlar (17).

Y-27632, hem normal farelerde hem de sadece allerjenle duyarlaşmış farelerde ve bu arada allerjenle duyarlaşmış viral enfeksiyonlu farelerde bronkospastik agonistlerle indüklenmiş havayolları cevaplarını azaltmıştır. Y-27632 aynı zamanda kobay ve sığır trakeasında düz kas kasılmalarını in vitro olarak inhibe etmiştir (55).

CCL39 (hamster akciğer fibroblastları) fibroblastlarında somatostatin-1 reseptörlerinin aktivasyonunun trombin ve integrinle uyarılan Rho-GTP kompleks oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (18).

Rat koroner arterinde, kobay vaz deferensinde ve köpek trakeasında agonistle stimülasyonun β -eskin (β -escin) ile permeabilize edilmiş düz kas myoflamentlerinin kalsiyuma duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir. RhoA/ROCK aracılı kalsiyum duyarlaşması havayolları düz kaslarında gösterilmiştir. Hem permeabilize edilmiş hem de intakt tavşan trakea düz kaslarında, karbakolle indüklenen kasılmalar Y-27632 ile tamamen geri çevrilmiştir. Rat bronşunda β -eskin ile permeabilize edilmiş düz kaslarda asetilkolinle indüklenen kalsiyum duyarlaşması gösterilmiştir. Bu duyarlaşmanın C3 eksoenzimle tamamen ortadan kaldırılması, RhoA'nın duyarlaşmada rol oynadığını önermiştir (28).

2.12. Diyabetin tedavisi

Diyabet tedavisinin ana öğeleri diyetin düzenlenmesi ve bu arada şişman tip II diyabetlilerin ideal ağırlığa döndürülmesi, eksersiz, insülin uygulanması ve sadece tip II diyabetlilerde gerektiğinde oral antidiyabetik ilaç verilmesidir. İnsülin tip I diyabette hipoglisemik ilaç olarak kullanılabilir tek ilaçtır. Tip II diyabette ise insülin ve oral antidiyabetik ilaçlar arasında duruma göre tercih yapmak gerekir. Oral antidiyabetik ilaçlar sülfonilüreler ve biguanidler (metformin) olmak üzere iki gruptur. Sülfonilüreler birinci kuşak (tolbutamid, klorpropamid) ve ikinci kuşak (gliburid, glipizid, glibornurid, gliklazid, glikuidon) olmak üzere iki gruptur Diğer antidiyabetik ilaçlar arasında insüline duyarlılığı artırıcılar (tiazolidindion türevleri: Troglitazon, siglitazon, pioglitazon ve eglitazon), glikozidaz inhibitörleri (akarboz, miglitol), guar sakızı ve aldoz redüktaz inhibitörleri (tolrestat, sorbinil, alrestatin) yer alır. Son zamanlarda pankreas beta-hücrelerinin ATP'ye duyarlı potasyum kanallarını, sülfonilüre türevlerinden farklı bir mekanizma ile kapatan sülfonilüre benzerleri (repaglinid, nateglinid) adı verilen glinidler geliştirilmeye başlanmıştır (75).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneylerde Hıfzısıhha Enstitüsünden (Ankara, Türkiye) temin edilen 25-35 gr arası ağırlıkta *Balb c* cinsi fareler kullanıldı. Farelerde diyabet oluşturmak amacıyla intraperitoneal olarak 100 mg/kg sitrat tamponu (pH=4,5) içinde çözündürülmüş streptozotosin, 24 saat arayla iki kez verildi. Kontrol hayvanlarına ise sadece sitrat tamponu (0.3 ml/40 gr) enjekte edildi (51). Streptozotosin enjeksiyonu her gün bir fare çalışılacak şekilde birer gün arayla yapıldı ve fareleri karıştırmamak amacıyla kuyrukları (marker ile) işaretlendi. Farelere yem ve su yeterince (*ad libitum*) verildi. Fareler 22 ± 1 °C, % 45-65 nem oranı ve 12 saat gündüz, 12 saat gece koşulları sağlanan Mersin Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarında barındırıldı. Kan glikoz düzeylerini mg/dl olarak ölçmek için farenin kuyruğundan kan alınarak glikoz striplerine (Boehringer-Manheim, Germany) uygun şekilde damlatıldı. 4 haftalık süre boyunca zaman zaman kan glikozu ve ağırlıkları takip edildi. Streptozotosin enjeksiyonundan 4 hafta sonra farelerin ağırlık ve glikoz düzeyleri tespit edildikten sonra servikal dislokasyonla öldürüldü.

Aort, penis ve gastrik fundus hızlı bir şekilde izole edildi. Oda sıcaklığında içinde Krebs solüsyonu bulunan bir petri kabına alındı ve çevre dokulardan temizlendi. Farklı olarak içinde aort bulunan petri kabı, buz bulunan bir kabın üzerine yerleştirildi. Bir farenin torasik aortundan yaklaşık 3 mm kalınlığında halkalar hazırlandı. Bir aorttan ortalama 4 preparat elde edildi. Her bir farenin penisinden iki adet korpus kavernozum preparatı daha önce belirtildiği gibi hazırlandı (21).

Fundal şeritler de daha önceden tanımlandığı şekilde hazırlandı (22). Bir gastrik fundustan 2 ya da 3 longitudinal (2-3 mm x 15-20 mm) strip alındı.

Bütün deneylerde banyo sıcaklığı 37 °C'de tutuldu ve Krebs solüsyonunun (mM olarak NaCl 118, KCl 4.8, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 24, glikoz 11, MgSO₄ 1.2, Na₂EDTA 0.01) PH'sı 7.4'de sabit tutuldu ve %95 O₂, % 5 CO₂ karışımıyla sürekli olarak gazlandırıldı. Bütün preparatlara 0.5 gr ön gerim uygulandı ve bir saatlik dengelenme süresi boyunca 20 dakikada bir Krebs solüsyonuyla yıkandı. Dokuların tonusundaki değişiklikler "force displacement transducer" (COMMAT, Ankara, Türkiye) aracılığı ile izometrik olarak ölçüldü ve Biopac kayıt sistemi (Biopac systems Inc., CA, USA) ile veriler bilgisayar ortamında elde edildi.

3.1. Kullanılan kimyasal ajanlar

L-fenilefrin hidroklorid, karbamilkolin klorür (karbakol), papaverin hidroklorür, asetilkolin klorür, sodyum nitroprusiyad, ve streptozotosin Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edildi. HA-1077 (fasudil), ve Y-27632 Tocris Cookson Ltd. (Bristol, UK) firmasından temin edildi.

3.2. Aort deneyleri

Aort ringleri 10^{-6} M fenilefrinle kastırılarak asetilkolin (10^{-9} - 10^{-4} M), sodyum nitroprusiyad (10^{-9} - 3×10^{-6} M), papaverin (10^{-8} - 10^{-4} M), fasudil (10^{-8} - 10^{-4} M) ve Y-27632 (10^{-8} - 10^{-5} M) ile gevşeme yanıtları alındı.

3.3. Korpus kavernozum deneyleri

Kavernöz doku 5×10^{-5} M fenilefrinle kastırıldı. Kararlı kasılmayı takiben elektriksel saha stimülasyonu (40 V, 0.5 ms) artan frekanslarda (1, 2, 4, 8, 16 Hz) 2 dakika aralıklarla 15 sn süreyle uygulanarak gevşeme yanıtları kaydedildi. Daha sonra asetilkolin (10^{-9} - 3×10^{-5} M), fasudil (10^{-9} - 3×10^{-5} M) veya Y-27632 (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ile gevşeme yanıtları alındı.

3.4. Gastrik fundus deneyleri

Gastrik fundal şartlarında kümülatif (10^{-9} - 10^{-5} M) karbakol uygulaması ile önce kasılma cevapları elde edildi. Daha sonra tek doz karbakol ile doku kastırıldı (genellikle 3×10^{-7} M) ve Y-27632 (10^{-8} - 10^{-5} M) veya fasudil (10^{-8} - 3×10^{-5} M) gevşeme yanıtları kaydedildi. Diğer bir seride ise dokular 45 dakika 10^{-4} M Y-27632 veya fasudil ile inkübe edildikten sonra karbakole (10^{-9} - 3×10^{-5} M) olan kasılma yanıtları elde edildi.

3.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Dokuların gevşeme yanıtları, kasılmaların yüzdesi olarak, kasılmalar ise mN (mili Newton) cinsinden ya da mN/g doku ağırlığı cinsinden ifade edildi ve standart hataları ile birlikte (\pm SEM) gösterildi. Grafiklerin çizimi ve istatistiksel analiz için bilgisayar ortamında Graph-Pad Prism (CA, USA) programı kullanıldı. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* testi olarak Bonferoni kullanıldı. Ayrıca gerektiğinde iki ortalama arasındaki farkı karşılaştırmak için student *t* testinden faydalanıldı. 0.05'den küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kontrol ve diyabetik farelerin kan glikoz seviyeleri ve vücut ağırlığı değişimleri

Farelere günde bir kez (2 gün boyunca) 100 mg/kg streptozotosin verilmesi, dramatik bir diyabet tablosu oluşturmuştur; deneklerin 30. gündeki kan glikoz düzeyleri 428 ± 26.2 (n=11) mg/dl bulunurken, ilk streptozotosin uygulanmadan önceki glikoz düzeyleri 94.8 ± 4.11 (n=12) mg/dl olarak bulunmuştur ($P < 0.001$). Farelerin ağırlık ve kan şeker düzeyleri ile ilgili veriler tablo II' de gösterilmiştir.

Tablo II: Kontrol ve diyabet oluşturulan farelerin 0. ve 30. günlerdeki ağırlık ve kan glikoz düzeyleri.

	Ağırlık (gr)		Kan şeker düzeyi (mg/dl)	
	0. gün	30. gün	0. gün	30. gün
Diyabetik olmayan grup	30.5 ± 1.1	35.9 ± 1.4 **	85.4 ± 4.1	$96,4 \pm 5.9$
Diyabetik grup	35.3 ± 1.0	28.2 ± 1.5 ***	$94,8 \pm 4.1$	428 ± 26.2 ***

Değerler ortalama \pm ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4.1. Aort bulguları

İzole fare aort halkalarını ön kastırmak amacıyla bir α -1 agonisti olan fenilefrin kullanılmıştır. Fenilefrinle (10^{-6} M) indüklenen kasılmalar kontrol aortlarında 3.43 ± 0.20 milinewton (mN) olarak bulunurken, diyabetik aortlarda 4.22 ± 0.29 mN olarak bulunmuştur ($P < 0.05$). Fasudil (10^{-8} - 10^{-4} M Şekil 2) ve Y-27632 (10^{-8} - 10^{-5} M Şekil 2) asetilkolin (10^{-9} - 10^{-4} M, Şekil 3), sodyum nitroprusiyat (10^{-9} - 3×10^{-6} M, Şekil 3), papaverin (10^{-8} - 10^{-4} M Şekil 3) hem diyabetik hem de diyabetik olmayan fare aort halkalarında konsantrasyona bağımlı gevşeme oluşturdu. Ancak, asetilkoline verilen gevşeme yanıtları diyabette büyük ölçüde baskılanırken diğer ajanların oluşturduğu gevşetici cevaplar değişmedi.

Gevşetici ajanlara ait pEC_{50} değerleri bir tablo halinde sunulmuştur (Tablo III).

Tablo III: Aortta çeşitli gevşetici ajanlara ait pEC_{50} değerleri.

	pEC_{50} değerleri (M)		
	Kontrol	Diyabetik	
Sodyum nitropurissiyat	7.99 ± 0.10 (n=16)	7.90 ± 0.08 (n=16) $P > 0.05$	*, $p < 0.05$, 5, diyabe tik olmay an
Papaverin	5.29 ± 0.10 (n=12)	5.26 ± 0.09 (n=15) $P > 0.05$	
Fasudil	5.56 ± 0.07 (n=16)	5.46 ± 0.07 (n=14) $P > 0.05$	
Y-27632	6.24 ± 0.09 (n=12)*	6.22 ± 0.07 (n=15) [†] $P > 0.05$	

dokularda fasudil ile Y-27632 karşılaştırıldığında; †, $p < 0.05$, diyabetik dokularda fasudil ile Y-27632 karşılaştırıldığı zaman.

Diyabetik olmayan farelerden elde edilen cevaplar dikkate alındığında, Y-27632'nin fasudile göre daha potent olduğu buna karşılık efikasitelerinde çok belirgin bir farkın olmadığı tespit edildi (Tablo III). E_{maks} (efikasite) değerleri gösterilmemiştir. Benzer bir durum diyabetik gruptaki fasudil ve Y-27632 cevaplarında da gözlemlendi. (Tablo III).

4.2. Korpus kavernozum bulguları

Kavernozal preparatları ön kastırmak için, yine α -1 agonisti fenilefrin (5×10^{-5} M) kullanıldı. Önkastırılan kontrol ve diyabetik korpus kavernozumları elektriksel saha stimülasyonu ile frekansa bağımlı (Genlik:40 V, durasyon:0.5 ms, süre:15 sn, aralık: 2dk da bir, frekanslar: 1, 2, 4, 8, 16 Hz) olarak gevşeme cevapları oluşturdu.

Asetilkolin (10^{-9} - 3×10^{-5} M), fasudil (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ve Y-27632 (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ile hem kontrol hem de diyabetik kavernöz dokularda doza bağımlı gevşemeler elde edildi. Kavernöz dokuda elektriksel saha stimülasyonu ve asetilkolinle oluşturulan gevşemeler diyabette belirgin olarak baskılanırken (Şekil 4), fasudil ve Y-27632 gevşemeleri değişmedi (Şekil 5).

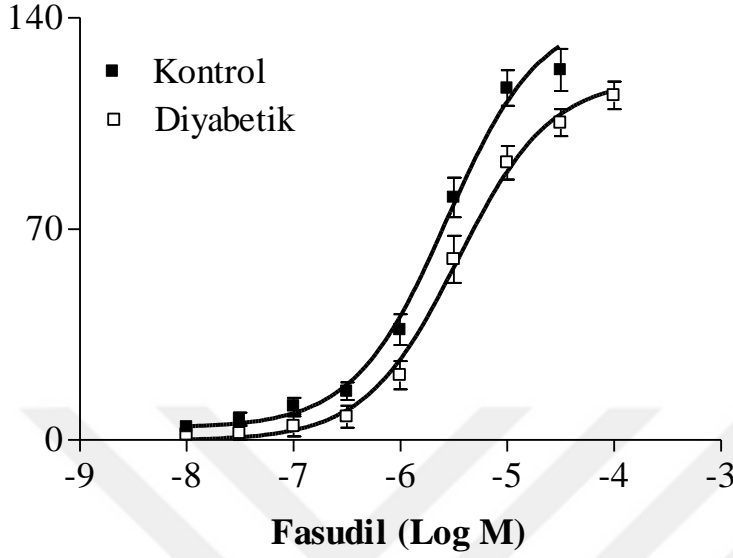
4.3. Gastrik fundus bulguları

Diyabetik fare gastrik fundusunda kümülatif olarak karbakol (10^{-9} - 10^{-5} M) uygulaması ile elde edilen kasılmalar mN olarak ifade edilip, kontrolleri ile karşılaştırıldığında belirgin bir azalma tespit edildi. Ancak kasılmalar mN/g doku ağırlığı olarak ifade edildiğinde önemli bir fark bulunamadı (Şekil 6).

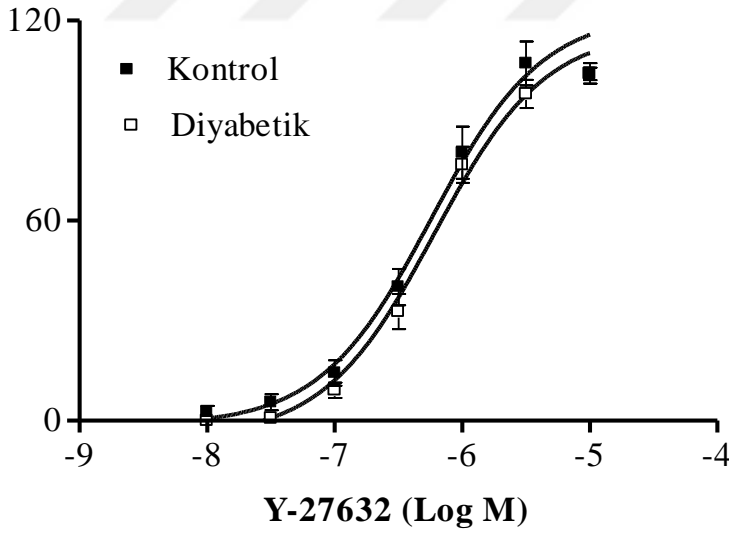
Diğer bir deney serisinde submaksimal karbakol dozu ile ön kastırılan striplerde Y-27632 (10^{-8} - 10^{-5} M) ve fasudil (10^{-8} - 3×10^{-5} M) konsantrasyona bağımlı gevşemeler oluşturdu. Bu gevşemeler diyabetik dokularda aynı maddelerle elde edilen gevşemelerle karşılaştırıldığında birbirinden istatistiksel olarak farklı olmadığı bulundu (Şekil 7).

Bir başka deney grubunda gastrik fundal şeritler Y-27632 veya fasudil (10^{-4} M) ile 45 dakika inkübe edildi ve daha sonra karbakol (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ile kastırıldı. Karbakol kasılmalar mN veya mN/g doku ağırlığı olarak ifade edildiğinde, fasudil inkübasyonu diyabetik ve diyabetik olmayan dokularda karbakol cevaplarını süprese etme bakımından bir fark oluşturmadı (Şekil 8). Buna karşılık Y-27632, karbakol (10^{-6} - 3×10^{-5} M) kasılmalarını diyabetik grupta daha fazla süprese etmiştir. Ancak kasılmalar mN/g doku ağırlığı olarak ifade edildiğinde ise, kontrol ile diyabet arasında belirgin fark bulunamadı (Şekil 9).

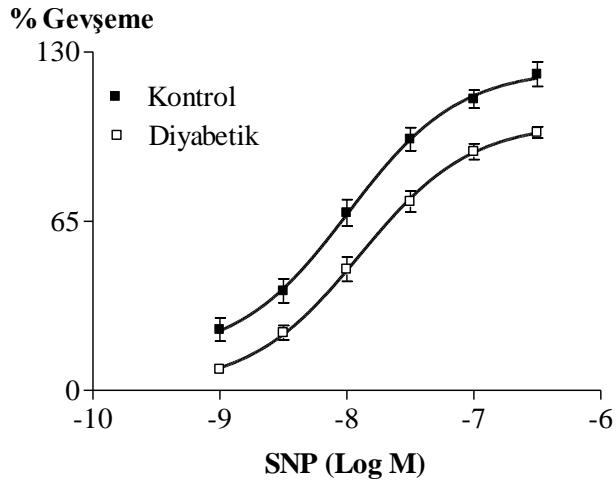
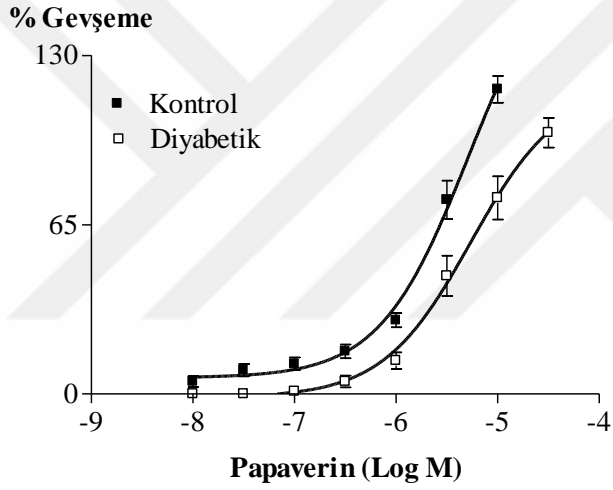
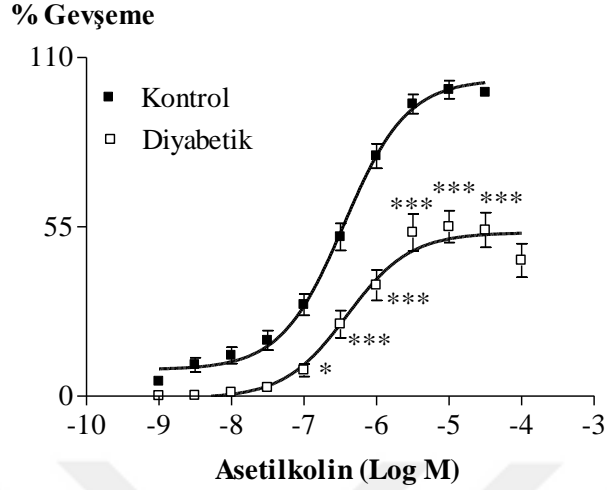
% Gevşeme



% Gevşeme

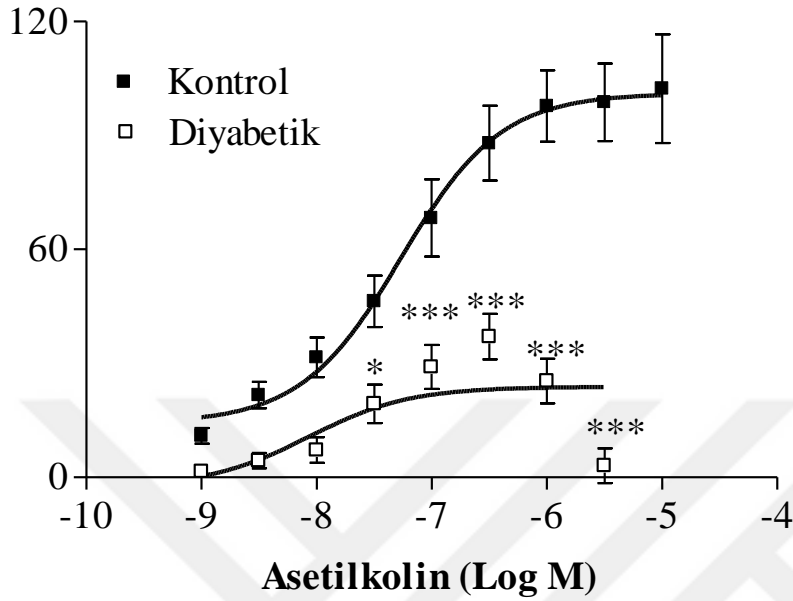


Şekil 2: Diyabetik olmayan (streptozotosin çözücüsü olan sitrat tamponu, 0.3 ml/40 g) farelerde ve streptozotosin (100 mg/kg i.p, 2 gün boyunca, 1x1) ile diyabet (30 gün) oluşturulmuş farelerden elde edilen aort halkalarında Rho-kinaz inhibitörleri fasudil (10^{-8} - 10^{-4} M, n=16-14) ve Y-27632 (10^{-8} - 10^{-5} M, n=12-15) gevşeme cevaplarının karşılaştırılması. Her iki Rho-kinaz inhibitörüne karşı oluşan gevşemeler diyabetik şartlarda değişmemiştir. Gevşemeler kasılmaların yüzdesi olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Bonferroni *post hoc* testi kullanılmıştır.

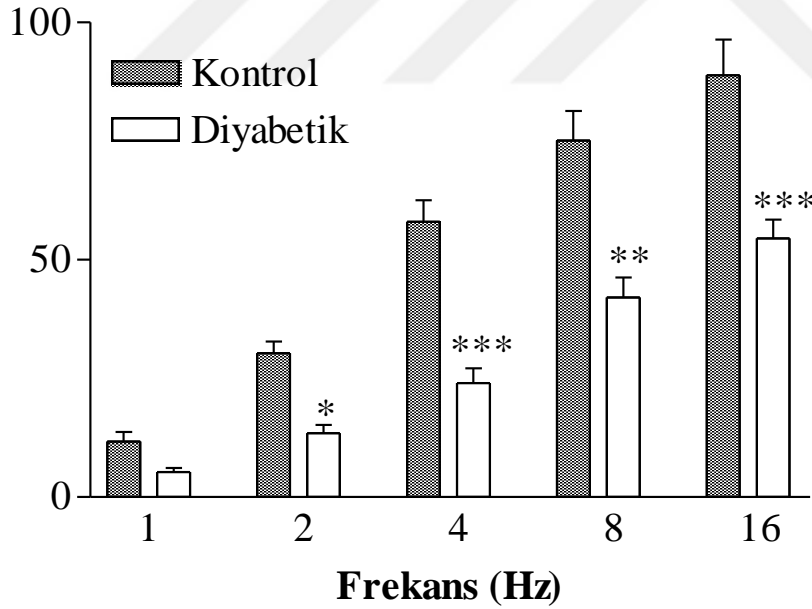


Şekil 3: Kontrol ve diyabetik (100 mg/kg i.p, 2 gün boyunca, 1x1) fare aort ringlerinde asetilkolin (n=14-16), papaverin (n=12-15) ve sodyum nitroprussiyata (SNP, n=16-16) ait gevşeme eğrileri. Diyabetik aortlarda asetilkolin gevşemeleri belirgin olarak baskılanırken, papaverin ve sodyum nitroprussiyat gevşemeleri kontrolden farklı bulunmadı. Gevşemeler kasılmaların yüzdesi olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Bonferroni *post hoc* testi kullanılmıştır. *: P < 0.05 , ***: P < 0.001.

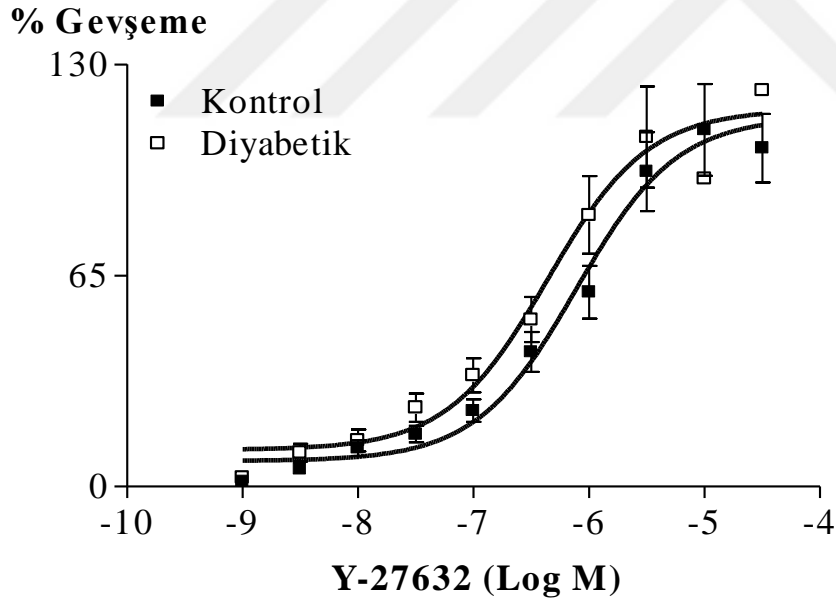
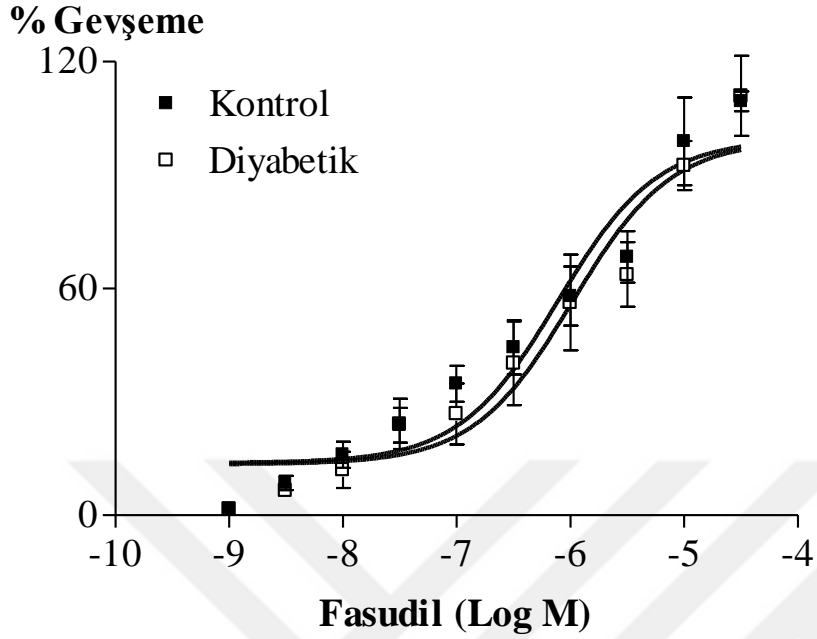
% Gevşeme



% Gevşeme

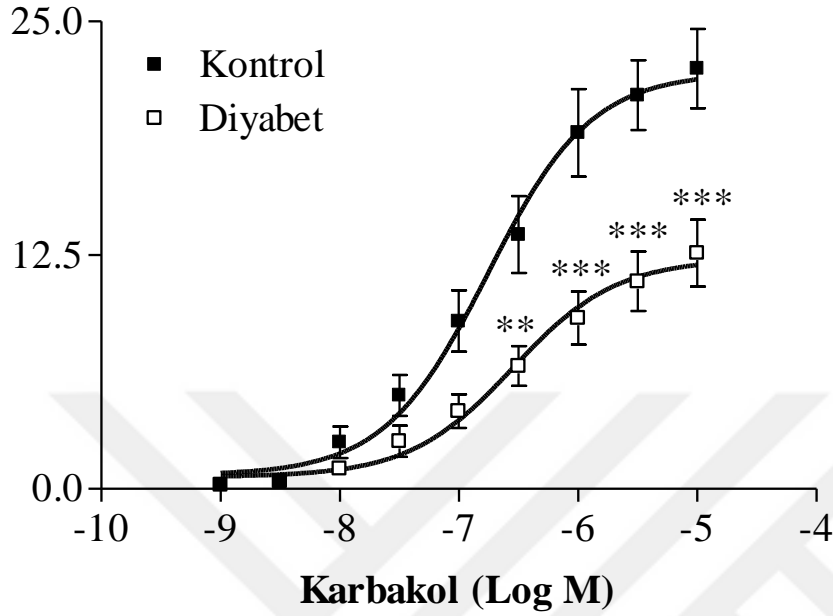


Şekil 4: Kontrol ve diyabetik kavernoza dokular 5×10^{-5} M fenilefrinle oluşturulan düzenli bir kasılmadan sonra asetilkolin (10^{-9} - 10^{-5} M, n=11-12) ve 1, 2, 4, 8 ve 16 Hz frekansında (0.5 ms, 40 V) elektriksel saha stimülasyonu (ESS, 2 dakika aralıklarla 15 sn boyunca, n=12-12) ile elde edilen gevşeme yanıtlarının karşılaştırılması. Asetilkolin ve ESS gevşeme yanıtları diyabet ile belirgin olarak baskılanmıştır. Gevşemeler kasılmaların yüzdesi olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Bonferroni *post hoc* testi kullanılmıştır. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

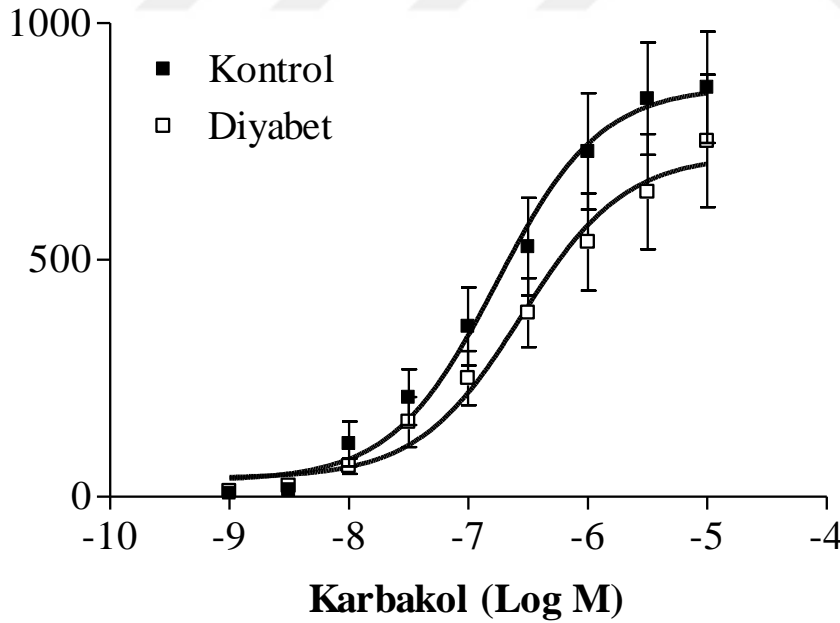


Şekil 5: Diyabetik (Stz 100 mg/kg i.p, 2 gün boyunca, 1x1) ve Kontrol (streptozotosin çözücüsü olan sitrat tamponu, 0.3 ml/40 g) fare kavernoza dokularında fasudil ve Y-27632'ye ait gevşeme eğrileri. Fasudil (10^{-9} - 3×10^{-5} M, n=7-10) ve Y-27632 (10^{-9} - 3×10^{-5} M, n=9-10) gevşeme yanıtları kontrolden farklı bulunmamıştır. Gevşemeler kasılmaların yüzdesi olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Bonferroni *post hoc* testi kullanılmıştır.

Kasılma (mN)

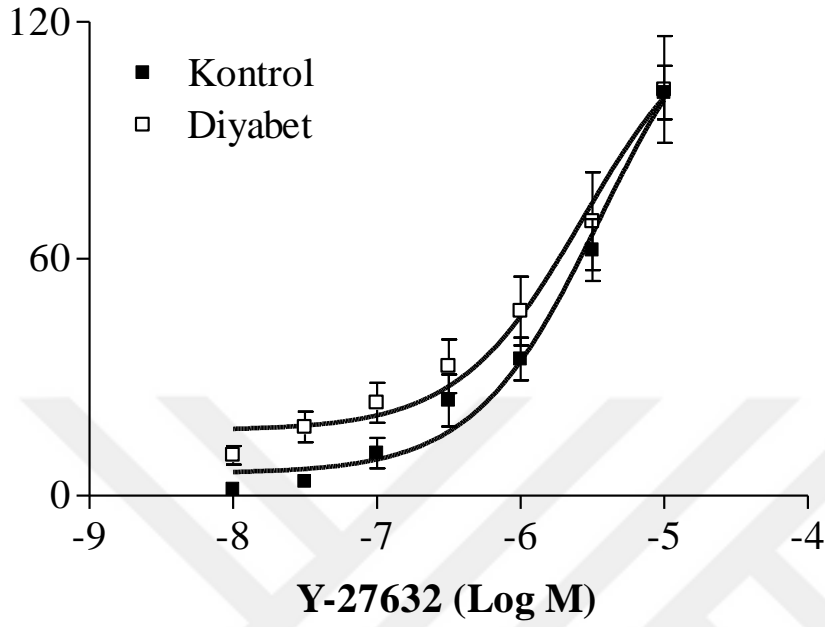


Kasılma (mN/g)

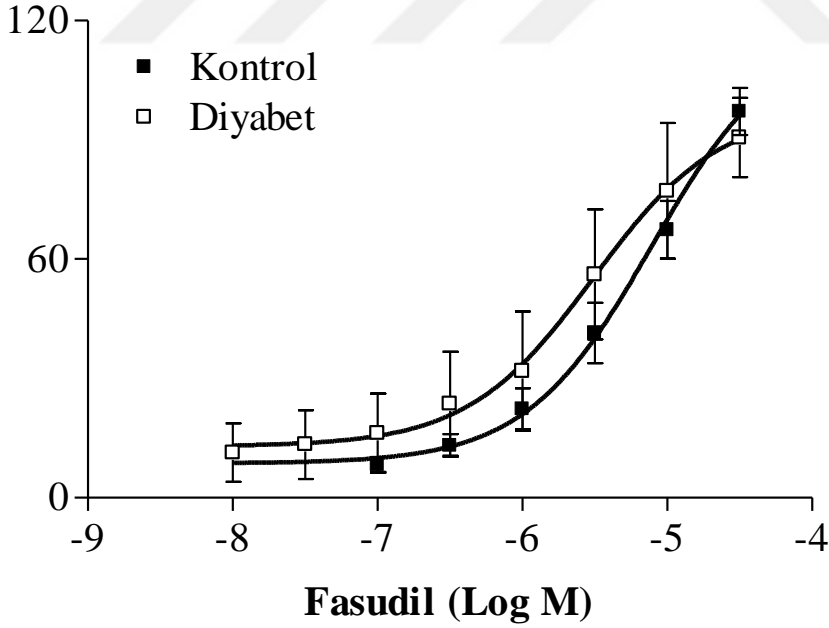


Şekil 6: Kontrol ve diyabetik (100 mg/kg i.p, 2 gün boyunca, 1x1) fare gastrik fundus striplerinde karbakol (10^{-9} - 10^{-5} M, n=13-15) kasılmalarına ait konsantrasyon-yanıt eğrileri. Kasılmalar milinewton (mN) olarak ifade edildiğinde diyabetik karbakol kasılmaları belirgin olarak baskılanırken (üstteki grafik), kasılmalar yaş doku ağırlıklarına bölünerek ifade edildiğinde (mN/g) bu baskılanma istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (alttaki grafik). İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Bonferroni *post hoc* testi kullanılmıştır. **: P< 0.01, ***: P < 0.001.

% Gevşeme

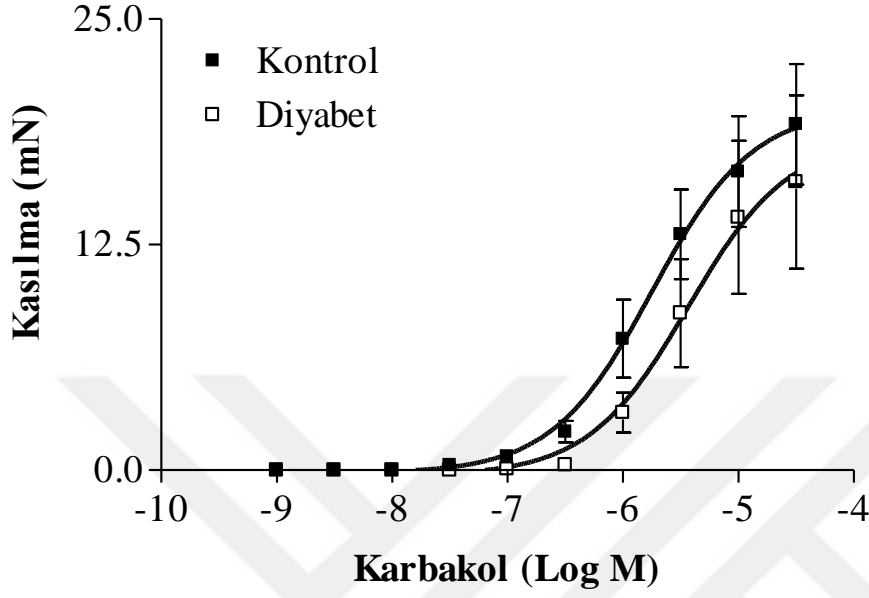


% Gevşeme

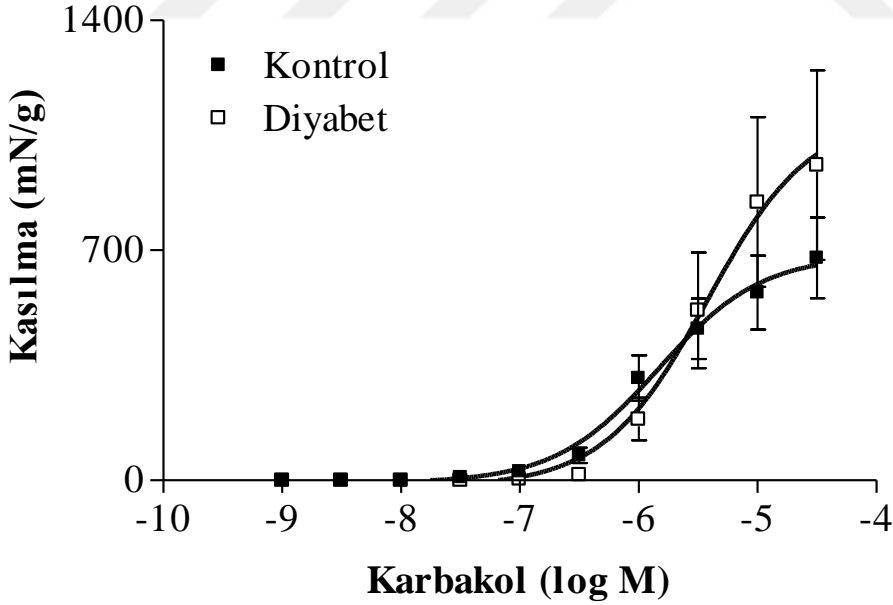


Şekil 7: Submaksimal karbakol dozu (genellikle 10^{-7} veya 3×10^{-7} M) ile kastırılan kontrol ve diyabetik (100 mg/kg i.p, 2 gün boyunca, 1x1) fare gastrik fundus striplerinde Y-27632 ve fasudil gevşeme yanıtları. Diyabetik striplerdeki Y-27632 (10^{-8} - 10^{-5} M, n=10-11) ve fasudile (10^{-8} - 3×10^{-5} M, n=6-8) gevşeme yanıtları kontrolden farklı bulunmamıştır. Gevşemeler kasılmanın yüzdesi olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Bonferroni *post hoc* testi kullanılmıştır.

Fasudil ile inkübasyon

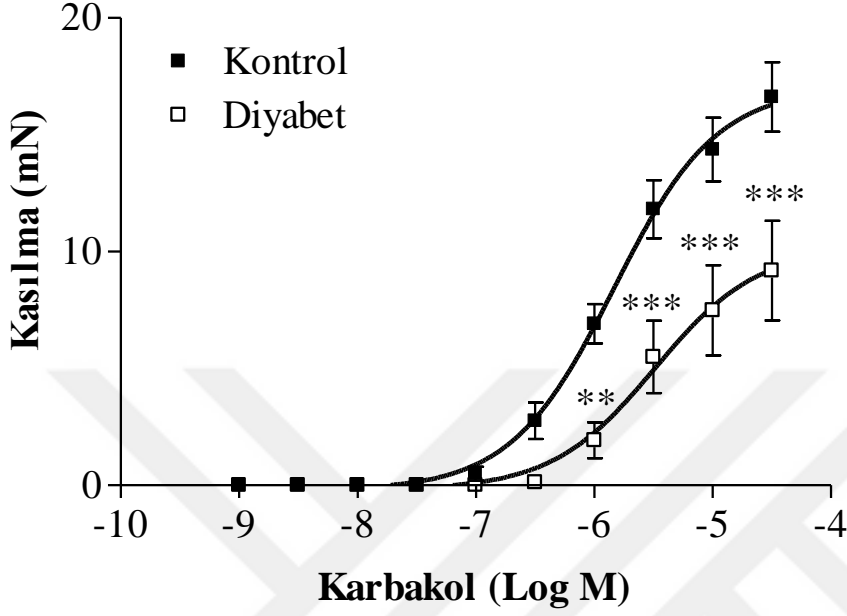


Fasudil ile inkübasyon

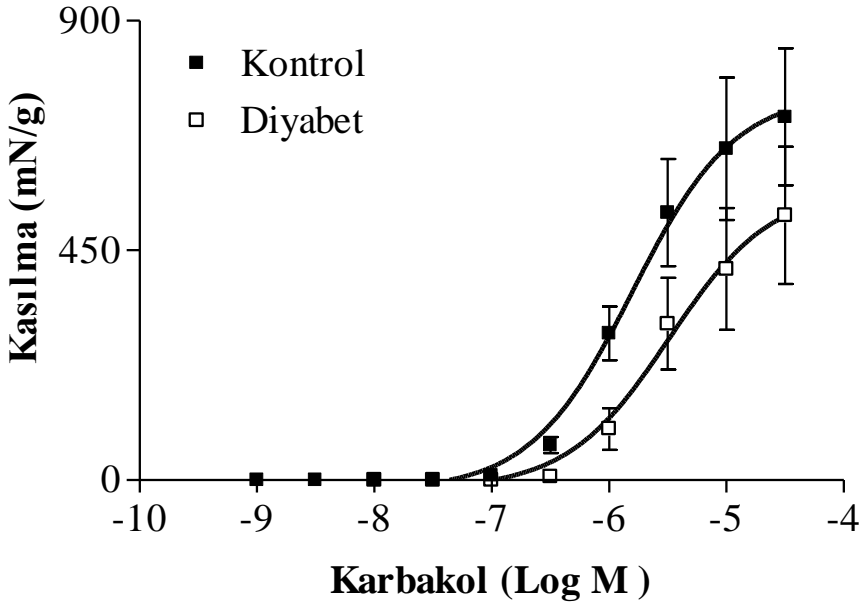


Şekil 8: Kontrol ve diyabetik (100 mg/kg i.p, 2 gün boyunca, 1x1) fare gastrik fundus stripleri 45 dakika 10^{-4} M fasudil ile inkübe edildikten sonra karbakole (10^{-9} - 3×10^{-5} M, n=6) ait kasılma eğrileri. Kasılmalar hem milinewton (mN) hem de mN/g doku ağırlığı olarak ifade edildiğinde, fasudil inkübasyonundan sonra kontrol grubundaki karbakol konsantrasyon-cevap eğrisinde oluşan süpresyon, diyabetik gruptakinden farksızdı. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Bonferroni *post hoc* testi kullanılmıştır.

Y-27632 ile inkübasyon



Y-27632 ile inkübasyon



Şekil 9: Kontrol ve diyabetik (Stz 100mg/kg i.p., 2 gün boyunca 1x1) fare gastrik fundusları 45 dakika 10^{-4} M Y-27632 ile inkübe edildikten sonra karbakole karşı oluşan kasılma yanıtları. Kasılmalar milinewton (mN) olarak ifade edildiğinde, Y-27632 ile inkübe edilen diyabetik gastrik funduslarda karbakol (10^{-9} - 3×10^{-5} M, n=8-9) kasılmaları dramatik bir şekilde süprese edildi. Ancak kasılmalar mN/g doku ağırlığı olarak ifade edildiğinde ise, kontrol ile diyabet arasında belirgin fark bulunamadı. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Bonferroni *post hoc* testi kullanılmıştır. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Rho kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudilin, çeşitli dokulardaki (aort, korpus kavernozum, gastrik fundus) olası gevşetici etkileri incelendi ve bu gevşeme yanıtlarının diyabetle değişip değişmediği araştırıldı.

Çizgili kastakinin aksine, düz kastaki kasılma fenomeni, membran potansiyelinden bağımsız olarak esasen serbest sitoplazmik kalsiyum ($[Ca^{2+}]_i$) ile tetiklenir (135). Reseptörlerin kastırıcı agonistlerle stimülasyonu, sitoplazmik serbest kalsiyum düzeylerini artırır; kalsiyum, sitoplazmada kalmodüline bağlanır, bu şekilde aktive olmuş kalmodülin, myozin hafif zincir kinazını stimüle eder. Myozin hafif zincir kinaz enzimi, myozin hafif zincirini fosforilleyerek düz kas kasılmasını başlatır (71). Kas hücrelerinin ana moleküler motoru olan myozin II, myozin hafif zincirinin fosforilasyonu ve defosforilasyonu ile düzenlenir. Fosforilasyon, myozin hafif zincir kinazı ile olurken, defosforilasyon ise myozin fosfataz ile gerçekleştirilir (134). Diğer taraftan hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun her zaman myozin hafif zincir fosforilasyonu ve sonuç olarak kas kasılmasıyla paralel olmadığı bildirilmiştir. Agonist stimülasyonu ile uyarılan myozin hafif zincir fosforilasyonu ya da kasılmanın gücü, depolarizasyonla indüklenen kalsiyum konsantrasyonundaki artışla oluşan kasılmadan daha büyüktür. Başka bir deyişle myozin hafif zincir fosforilasyonu ve kasılmanın gücü, $[Ca^{2+}]_i$ 'daki değişikliklerden bağımsızdır. Bu durum Ca^{2+} duyarlılığı olarak isimlendirilir (135). Bu bulgu, sabit $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerinde kasılmayı düzenleyebilecek diğer başka yolların olabileceğini akla getirmiştir (46). Nitekim son zamanlarda küçük bir GTPaz ve onun alt inisi efektörü olan Rho kinaz enziminin (p160Rho, ROCK2, ROK α)'nın Ca^{2+} duyarlılığında rol oynadığı bulunmuştur (133).

Diğer taraftan, Rho-bağımlı sinyal yolağının, vasküler ve vasküler olmayan düz kas kasılması dışında, sitokinez, hücre morfolojisi ve hücre göçünü de içeren farklı hücre fonksiyonları düzenlediği bildirilmiştir (46). Ayrıca, hayvanlarda oluşturulan hastalık modellerinde Rho/Rho-kinaz sinyalinin en azından kısmen hipertansiyon, ateroskleroz, astım ve malign hücre göçünden sorumlu olduğu savunulmuştur (46, 27). Streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratların aortlarında kastırıcı ajanlara karşı, çelişkili sonuçlar rapor edilmesine rağmen, daha ziyade artmış kasılma yanıtları bildirilmiştir (2).

5.1. Aort

Diyabetik durumlarda Rho protein düzeyi ve Rho-kinaz aktivasyonunun artmış olduğu bildirilmesine (91) rağmen fasudil ve Y-27632 gibi Rho-kinaz inhibitörlerinin kullanıldığı fonksiyonel çalışma henüz yoktur. Dolayısıyla bu çalışmada söz konusu Rho-kinaz inhibitörlerine olan gevşetici cevapların diyabette nasıl değiştiğini araştırdık.

Diyabetik hayvan modellerinde vasküler dokuların vazokonstriktör ajanlara olan artmış, değişmemiş ve azalmış cevaplar bildirilmiştir. Benzeri çelişkili sonuçlar gevşetici ajanlara karşı da söz konusudur (108). Bu çalışmada diyabetik aortta asetilkoline karşı esaslı bir yanıt azalması mevcuttur. Asetilkoline karşı oluşan gevşemelerin önemli ölçüde azalması olasılıkla endotelial disfonksiyona bağlıdır. Diğer taraftan papaverin ve sodyum nitroprussiyada karşı oluşan vazodilatör cevaplar ise diyabetik grupta azalmamıştır, bu da düz kas fonksiyonlarının, hiç olmazsa bu diyabetik protokolda, bozulmadığını önermektedir. Diğer taraftan çalışmamızda fenilefrine karşı artmış bir cevap gözlemledik. Bu cevap artışı süperoksid anyonlarının aşırı üretimine (59), protein kinaz C aktivasyonuna (61) ve/veya Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağının aktivasyonuna (91, 126) atfedilebilir.

Rho sinyalizasyonunun düz kas kasılması sitokinez, hücre morfolojisi, hücre göçü (46) ve nörotransmitter salınması (23) gibi çok çeşitli hücresele olaylara aracılık ettiği bildirilmiştir. Ayrıca çeşitli hayvan hastalık modellerinde de, örneğin hipertansiyon, vasküler spazm ve ateroskleroz (46), astım (27) ve malign hücre göçü (63) gibi patolojilerde Rho/Rho-kinaz yolağı kısmen sorumlu tutulmaktadır.

Streptozotosinle indüklenen diyabetik ratların baziller arterlerinde RhoA'nın upregüle olduğunun bildirilmiştir ve bu küçük G proteininin diyabetteki vasküler patolojide yer alabileceği önerilmektedir (91). Benzer şekilde, bir tip II diyabet modelinde Rho kinaz aktivitesi artarken myozin fosfataz aktivitesi azalmıştır (126). Bunun sonucunda vazokonstriktörlere verilen cevaplarda artış görülebilir. Rho kinaz aktivitesini etkili bir şekilde inhibe edebilen insülinin salınımındaki yetersizlik, diyabetteki bu değişiklikten sorumlu tutulmuştur (126). Benzer şekilde, bu çalışmada streptozotosin ile indüklenen diyabet modelinde de insülin sekresyonundaki azalma sonucunda artmış Rho/Rho-kinaz aktivitesine bağlı olarak fenilefrine artmış kasılma yanıtları oluşabilir. Buradan hareketle ön kastırılmış diyabetik aortlarda, Rho kinazın inhibe edilmesinin

diyabetiklerde, diyabetik olmayan aortlardan daha fazla gevşemeye neden olabileceği düşünülebilir. Ancak beklenenin aksine, Rho kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudil, diyabetik aortta kontrole göre farklı olmayan gevşemeler oluşturmuştur. Bu çalışmada Rho kinaz aktivitesini ve ekspresyonunu değerlendiremedik. Buna rağmen, Rho kinaz inhibitörlerine gevşeme yanıtlarının değişmemesi bulgusunu üç şekilde açıklayabiliriz: 1) Daha önce yapılan çalışmaların aksine streptozosinle indüklenen diyabetik farelerden alınan aortlarda Rho kinazın ne aktivitesi ne de ekspresyonu artmaktadır; 2) Rho sinyal yolağı diyabette artmış olabilir ama fenilefrinle indüklenen kasılmalara farklı şekilde katkıda bulunmayabilir; 3) Endoteli uzaklaştırılmış veya nitrik oksid sentaz ya da guanilil siklaz inhibitörleri varlığında endoteli sağlam rat aortunda, Y-27632'nin gevşetici etkisi azaldığı için (30), bizim diyabet modelinde Rho kinaz inhibitörlerine verilen artması olası gevşemeler, endotel disfonksiyonundan dolayı görülmemiş olabilir. Nitekim bu çalışmada asetilkoline karşı gelişen endotel aracılı gevşetici cevaplar önemli ölçüde baskılanmıştır. Sonuç olarak endotel harabiyeti Rho kinaz inhibitörlerine olan cevabı etkilemiş olabilir. Bu açıklama bize en makul gelenidir.

Sonuç olarak diyabette Rho/Rho-kinaz yolağının aktive olduğu bildirilmesine rağmen (91) bizim çalışmamızda Y-27632 ve fasudile olan gevşemeler diyabetik durumla değişiklik göstermemiştir.

5.2. Korpus kavernozum

Bu çalışmada streptozotosin ile indüklenen diyabetik ve kontrol farelerinin izole korpus kavernozumlarında da, Rho kinaz inhibitörlerine olan gevşeme yanıtları karşılaştırıldı.

Çeşitli türlerden izole edilen korpus kavernozumlarında, diyabetin hem endotelial hem de nitrejik gevşemeyi olumsuz etkilediğine dair çok sayıda kanıt vardır (52, 138, 145). Biz bu çalışmada, literatürdeki bulguları doğrular şekilde asetilkolin ve nitrejik stimülasyona azalmış gevşeme yanıtları elde ettik. Diyabet aracılı erektil disfonksiyonda sorumlu olabilecek mekanizmalar arasında, nitrik oksid sentezinde bir defekt veya nitrik oksidin süperoksit anyonlarıyla ya da bir takım glikozile son ürünler tarafından yakalanması bulunmaktadır (153, 25). Ayrıca, L-arginin hidrolizini katalizleyen arginaz II enziminin diyabette up regüle olduğu ve sonuç olarak L-argininden nitrik oksid üretiminin azaldığı da bildirilmiştir. Buna ek olarak vazodilatör prostasiklin sentezi, diyabette sekteye uğramıştır (15, 67). Yukarıdaki bazı

mekanizmalarla uyumlu olarak, antioksidanlarla ve metal şelatörleriyle tedavi, hayvanlardaki erektil disfonksiyonu kısmen düzeltmiştir (52, 76).

Kavernozal düz kas kasılması daha ziyade noradrenerjik sinirlerden salıverilen noradrenalinin, α -adrenerjik reseptörleri aktive etmesi ile sağlanır. Bu reseptörler, agonist stimülasyonu ile Rho ve sonuç olarak Rho kinaz aktivasyonu ile sonuçlanan, heterotrimerik G proteinleriyle kenetlenmiştir (135). Rho sinyalizasyon yolağı, kalsiyum duyarlılığı olarak adlandırılan ve myozin hafif zinciri fosforilasyonu ile kasılma gücünün $[Ca^{2+}]_i$ 'den bağımsız olması şeklinde tanımlanabilen bir fenomene aracılık eder (134). Diğer taraftan Rho kinaz antagonizmasının erektil disfonksiyonun tedavisi için bir potansiyel oluşturduğu bildirilmiştir (122). Rho, proteinlerinin düzeylerinin diyabetik vasküler düz kaslarda arttığı bildirilmesine rağmen, diyabetik korpus kavernozumda bu proteinlerin düzeyleri henüz araştırılmamıştır (92, 126). Buna rağmen biz bu çalışmada diyabetik fare korpus kavernozumunda Y-27632 ve fasudil'e verilen gevşeme yanıtlarının, diyabetik olmayan farelerinki ile karşılaştırıldığında, değişmediğini bulduk.

Sonuç olarak diyabetik fare korpus kavernozumları kontrollerle karşılaştırıldığında, Rho kinaz inhibitörlerine farklı gevşeme yanıtları vermemiştir. Bu yüzden bu ajanların kullanılması diyabetik erektil disfonksiyonun tedavisinde terapötik bir yarar sağlayabilir.

5.3. Gastrik fundus

Diyabet komplikasyonları arasında konstipasyon, disfaji, abdominal ağrı, bulantı ve kusma, malabsorbsiyon, fekal inkontinans ve diyare bulunmaktadır (100, 159). Diyabetik gastrik fundus düz kaslarında nitrik oksid sentaz ekspresyonu ve mideye nitreerjik motor iletimin ve ayrıca eksitatör nörotransmitterlere karşı oluşan sinyal cevaplarının azaldığı gösterilmiştir (142). Diyabette gerek β -adrenerjik reseptör agonistlerine gevşeme ve gerekse serotonine karşı kastırıcı cevaplarda azalma bildirilmiştir (161). Bu çalışmada ise karbakole olan kontraktıl cevaplar, dokunun gramı başına olan kuvvet değeri olarak ifade edildiğinde değışmemiştir, ancak karbakole olan kasılmalar (kuvvet değeri olarak ifade edildiğinde) karşılaştırıldığında belirgin olarak baskılanmıştır. Diğer taraftan Öztürk ve ark. streptozotosin ile oluşturulan diyabette sıçanların duodenumunda kalmodulin düzeylerinin düştüğünü tespit etmişlerdir (110).

Hücrede Ca^{2+} duyarlılığı ile ilgili olarak son zamanlarda Rho/Rho-kinaz yolağının önemli rol oynadığı bulunmuştur (133). Rho sinyalizasyon yolağı damar düz kası dışında gastrointestinal düz kaslarda da Ca^{2+} duyarlılığına aracılık etmektedir (140, 23). Dolayısıyla diyabette bu yolda olası değışiklikler söz konusu olabilir. Bu amaçla iki Rho kinaz inhibitörü Y-27632 ve fasudile olan cevap değışiklikleri diyabetik ve diyabetik olmayan farelerin gastrik funduslarında araştırılmıştır. Y-27632 ve fasudile gevşeme yanıtları kontrol ve diyabette birbirlerinden farklı bulunmamıştır. Ayrıca fasudil inkübasyonunda karbakol kasılmaları diyabetten farklı değildi. Buna karşılık Y-27632 inkübasyonunda karbakol kasılmaları mN olarak ifade edildiğinde diyabette kontrole göre önemli ölçüde baskılanmıştı. Ancak dokunun gramı başına mN olarak ifade edildiğinde karbakole ait kasılma cevapları azalmakla beraber diyabetik olmayan gruptaki cevaplardan farklı değildi. Sonuç olarak bu verilerden, Rho kinaz enzim etkinliği veya düzeyi ile ilgili bir sonuca varmak güç görünmektedir. Ancak görünüşe göre bu enzim düzeyi ve aktivitesi diyabetik gastrik fundusta pek fazla değışmemektedir. Bunu doğrulamak için hem diyabetik hem de diyabetik olmayan farelerin gastrik fundusunda Rho kinaz enzim düzeylerinin Western blot analiziyle gösterilmesi gerekmektedir. Şayet bu enzim düzeyleri diyabetik gastrik funduslarda değışmiş olsa bile bunun, dokunun fonksiyonel cevabına fazla katkı sağlamadığını düşünmekteyiz. Çünkü Rho kinaz enzim inhibitörleri hem diyabetik hem de normal dokularda farklı gevşeme paterni oluşturmamıştır. Ayrıca, inkübasyon deneylerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Diğer taraftan Rho kinaz inhibitörlerine olan gevşeme yanıtlarına bakıldığında ve bu inhibitörlerin varlığında karbakole olan kasılmaların deprese edildiği gerçeğinden hareketle Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağının gastrik fundusun kasılmalarını kontrolünde rol

oynayabileceği söylenebilir. Ayrıca bu yolağın aynı dokuda kolinerjik sinir stimülasyonu ile asetilkolin salıverilmesinde de rol oynadığı şimdilerde gösterilmiştir (23).

Diyabetik sıçan duodenumunda KCl cevaplarının azalmasına bakılarak düz kasın Ca^{2+} 'a duyarlığında bir azalmanın olabileceği ileri sürülmüştür (110). Olası mekanizmalar kalmodulin üzerinde yoğunlaşmıştır. Oysa Ca^{2+} duyarlığına neden olabilecek diğer yollar (Rho kinaz, protein kinaz ve araziidonik asid) araştırılmamıştır. Kalsiyuma bağlı mekanizmalar aracılığı ile gelişen kasılmalar yukarıda sayılan sinyalizasyon yollarını da içerebilir. Bu durumda hipotetik olarak Rho/Rho-kinaz yolağının gastrik fundusta zayıflaması beklenebilir. Ancak Rho kinaz inhibitörleriyle elde ettiğimiz gevşeme değerlerinin farklı olmaması ve bu arada bu maddeler varlığında kasılma cevaplarında önemli değişikliklerin olmaması yukarıdaki hipoteze uygun düşmemektedir.

Sonuç olarak diyabette çeşitli ajanlara olan hem kasılma hem de gevşeme cevapları küntleşmiştir. Bu cevap değişikliklerinin reseptör dansitesinde ya da reseptör sonrası olay verimindeki değişikliklerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (110). Ayrıca sıçan gastrik fundusunda Ca^{2+} 'a duyarlık artışı bildirilmekle beraber diğer bazı çalışmalarda tam tersine Ca^{2+} 'a duyarlıkta bir azalma rapor edilmiştir (4, 107). Bu çalışmada diğer sinyalizasyon yollarının tersine gastrik fundusta Rho sinyalizasyon yolağı etkilenmemiş olabilir. Bu görüşü doğrulamak için Rho ve Rho kinaz düzeylerinin gösterilebileceği Western blot analizlerine ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Abe A, Kawazoe C, Kondo Y et al. Vascular responsiveness in alloxan-induced diabetes-susceptible (ALS) and resistant (ALP) mice. **J Vet Med Sci** 1998; 60:10, 1119-1125.
2. Abebe, W, Harris KH, MacLeod KM. Enhanced contractile responses of arteries from diabetic rats to alpha 1-adrenoceptor stimulation in the absence and presence of extracellular calcium. **J Cardiovasc Pharmacol** 1990; 16, 239-248.
3. Ai S, Kuzuya M, Koike T et al. Rho-Rho kinase is involved in smooth muscle cell migration through myosin light chain phosphorylation-dependent and independent pathways. **Atherosclerosis** 2001; 155, 321-327.
4. Aihara K and Sakai Y. Hyperreactivity of contractile response in the gastric fundus smooth muscle from rats with diabetes induced by streptozotocin. **Arch Int**

- pharmacodyn Ther** 1989; 302, 220-231.
5. Altuntaş Y: Diyabetes mellitusun tanımı. Her Yönüyle Diyabetes Mellitus. Yenigün M 2.baskı, Tayf Ofset, 2001 İstanbul sayfa 51.
 6. Amano M, Fukata Y and Kaibuchi K. Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by the small GTPase Rho and its targets. **Trends Cardiovasc Med** 1998; 8, 162-168.
 7. Amano M, Fukato Y, Kaibuchi K. Regulation and function of Rho-associated kinase. **Exp Cell Res** 2000; 261, 44-51.
 8. Amano M, Ito M, Kimura K et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). **J Biol Chem** 1996; 271, 20246-49.
 9. American Diabetes Association. Hyperglycemic crises in patient with diabetes mellitus. **Clin Diabetes** 2001; 19: 2, 82-90.
 10. Amerongen GPN, Delft A, Vermeer MA et al. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability role of Rho kinase and protein tyrosine kinase. **Circ Res** 2000; 87, 335-340.
 11. Aranson D, Rayfield EJ. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: Molecular mechanisms. **Cardiovasc Diabetol** 2002; 1, 1-10.
 12. Begum N, Duddy N, Sandu O, et al. Regulation of myosin-bound protein phosphatase by insulin in vascular smooth muscle cells: evaluation of the role of Rho kinase and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent signaling pathways. **Mol Endocrinol** 2000; 14: 9, 1365 – 76.
 13. Begum N, Sandu OA, Dudy N. Negative regulation of Rho signaling by insulin and its impact on actin cytoskeleton organization in vascular smooth muscle cells. Role of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate signaling pathways. **Diabetes** 2002; 51, 2256-2263.
 14. Belai A, Lincoln J, Milner P et al. Enteric nerves in diabetic rat: increase in VIP but not substance P. **Gastroenterol** 1985; 89, 967-976.
 15. Bivalacqua TJ, Hellstorm WJG, Kadowitz PJ et al. Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: In diabetic-associated erectile dysfunction. **Biochem Biophys Res Commun** 2001; 283, 923-927.
 16. Boado R, Colombo O, Zaninoviç, AA. Effects of diabetes beta hydroxybutiric acid and metabolic acidosis on the pituitary-thyroid axis in the rat. **J Endocrinol Invest** 1985; 8,

- 107-111.
17. Boettner B, Aelst LV. The role of Rho GTPases in disease development. **Gene** 2002; 286, 155-174.
 18. Buchan AMJ, Lin C-Y, Choi J, et al. Somatostatin acting at receptor substrate 1, inhibits Rho activity, the assembly of actin stress fibers, and cell migration. **J Biol Chem** 2002; 277, 28431-28438.
 19. Buhl AM, Johnson NL, Dahanasekaran N, Johnson GL et al. G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. **J Biol Chem** 1995; 270: 42, 24631-4.
 20. Bunag RD, Tomita T, Sasaki S. Streptozotocin diabetic rats are hypertensive despite reduced hypothalamic responsiveness. **Hypertension** 1982; 4, 556-565.
 21. Büyükaşar K, Göçmen C, Seçilmiş A, et al. Evidence that the nitrergic neurotransmitter and endothelium-derived relaxing factor might be S- nitrosothiols in the isolated mouse corpus cavernosum. **Acta Med Okayama** 1999; 53, 209-215.
 22. Büyükaşar K, Göçmen C, Şingirik E et al. Possible nature of mediator responsible for electrically-induced relaxations in the longitudinal muscle preparation of the mouse gastric fundus. **Ann Med Sci** 1994; 3, 39-44.
 23. Büyükaşar K, Levent A. Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and acetylcholine release in the mouse gastric fundus. **Biochem Biophys Res Commun** 2003; 303, 777-781.
 24. Calles-Escandon J and Cıpolla M: Diabetes and endothelial dysfunction: A clinical perspective. **Endocr Rev** 2001; 22: 1, 36-52.
 25. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, et al. Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. **Diabetes Med** 1991; 8, 540-542.
 26. Chang EB, Bergenstal RM, and Field M. Diarrhea in streptozotocin-treated rats: loss of adrenergic regulation of intestinal fluid and electrolyte transport. **J Clin Invest** 1985; 75, 1666-1670.
 27. Chiba Y, Takada Y, Miyomata S, et al. Augmented acetylcholine-induced, Rho-mediated Ca^{2+} sensitization of bronchial smooth muscle contraction in antigen-induced airway hypertensive rats. **Br J Pharmacol** 1999; 127, 597-560.
 28. Chiba Y, Takeyama H, Sakai H, et al. Effects of Y-27632 on acetylcholine-induced

- contraction of intact and permeabilized intrapulmonary bronchial smooth muscles in rats. **Eur J Pharmacol** 2001; 427, 77-82.
29. Chitaley K, Bivalacqua TJ, Champion CJ et al. Adeno-associated viral gene transfer of dominant negative RhoA enhances erectile function in rats. **Biochem Biophys Res Commun** 2002; 298, 427-432.
 30. Chitaley K, Webb RC. Microtubule depolymerization facilitates contraction of rat aorta via activation of Rho-kinase. **Vasc Pharmacol** 2002; 38, 157-161.
 31. Chitaley K, Webb RC. Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of Rho-kinase signaling. **Hypertension** 2002; 39: 2, 438-442.
 32. Chitaley K, Wingard CJ, Webb RC, et al. Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. **Nature** 2001; 7, 119-122
 33. Chu NV, Edelman SV. Diabetes and erectile dysfunction. **Clin Diabetes** 2001; 19: 1, 45-47.
 34. Coussin F, Scott RH, Wise A. Et al. Comparison of sphingosine 1-phosphate-induced intracellular signaling pathways in vascular smooth muscles differential roles in vasoconstriction. **Circ Res** 2002; 91, 151-157.
 35. Cowell JA, Winocour PD, Lopes-Virella M et al. New concepts about the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. **Am J Med** 1983; 75, 67-79.
 36. Dhanasekaran N, Dermott JM. Signaling by the G12 class of G proteins. **Cell Signal** 1996; 8: 4, 235-45.
 37. Diederich W, Stief CG, Lue TF, Tanagho EA. Norepinephrine involvement in penile detumescence. **J Urol** 1990; 143: 1264.
 38. Dinçer ÜD, Bidasee KR, Gürer Ş, Tay A, et al. The Effect of Diabetes on Expression of β_1 -, β_2 , and β_3 -adrenoceptors in Rat Hearts. **Diabetes** 2001; 50, 455-461.
 39. Dinçer ÜD, Onay A, Arı N, et al. The effects of diabetes on β -adrenoceptor mediated responsiveness of human and rat atria. **Diabetes Res Clin pract** 1998; 40, 113-122.
 40. Ersoy G, Çakır B. Tiazolidonlar: Diyabetes mellitus tedavisinde güncel yaklaşım. **Klinik Bilimler & Doktor** 2001; 7: 6, 769-773
 41. Eto M, Kozai T, Cosentino F et al. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. **Circulation** 2002; 105, 1756-1759.

42. Flatt PR, Bailey CJ, and Conlon JM. Somatostatin, gastrin-releasing peptide and gastrin in stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes and insulinoma. **J Nutr** 1991; 121, 1414-1417.
43. Fleischacker E, Esanbhalu VE, Graier WF. Human diabetes is associated with hyperreactivity of vascular smooth muscle cells due to altered subcellular Ca^{2+} distribution. **Diabetes** 1999; 48, 1323-1330.
44. Fradkin JE (Acting Director). Division of Diabetes, Endocrinology and Metabolic Diseases. September 2000 Council.
45. Fu X, Gong M.C, Jia T, Somlyo AV. & Somlyo AP. The effects of the Rho kinase inhibitor Y27632 on arachidonic acid, GTP γ S, and phorbol ester-induced Ca^{2+} -sensitization of smooth muscle. **FEBS Lett** 1998; 440, 183—187.
46. Fukata Y, Amano M and Kaubuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends Pharmacol Sci** 2001; 22: 1, 32-39.
47. Garcia Leme J, Böhm GM, Migliorini RH et al. Possible participation of insulin in the control of vascular permeability. **Eur J Pharmacol** 1974; 29, 298-306.
48. Gohla A, Harhammer R, Schultz G. The G-protein G_{13} but not G_{12} mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to rho. **The J Biol Chem** 1998; 273: 8, 4653-4659.
49. Golovchenko I, Goalstone ML, Watson P, et al. Hyperinsulinemia enhances transcriptional activity of nuclear factor- κ B induced by angiotensin II, hyperglycemia, and advanced glycosylation end products in vascular smooth muscle cells. **Circ Res** 2000; 87, 746-52.
50. Gorio A, Di Giulio AM, Donadoni L, et al. Early neurochemical changes in the autonomic neuropathy of the gut in experimental diabetes. **Int J Clin Pharmacol Res** 1992; 12, 217-224.
51. Göçmen C, Seçilmiş A, Kumcu EK. Effects of vitamin E and sodium selenate on neurogenic and endothelial relaxation of corpus cavernosum in the diabetic mouse. **Eur J Pharmacol** 2000; 398, 93-98.
52. Göçmen C, Uçar P, Şingirik, E, et al. An in vitro study of nonadrenergic-noncholinergic activity on the cavernous tissue of mouse. **Urol Res** 1997; 25, 269-275.

53. Gökhale MS, Shah DH, Hakim Z, et al. Effects of chronic treatment with amlodipine in non-insulin dependant diabetic rats. **Pharmacol Res** 1998; 37, 455-459.
54. Hall JL, Matter CM, Wang X, et al. Apoptosis through a protein kinase C-dependant pathway. **Circ Res** 2000; 87, 574-450.
55. Hashimoto K, Peebles Jr. RS, Sheller JR, et al. Suppression of airway hyperresponsiveness induced by ovalbumin sensitization and RSV infection with Y-27632, a Rho kinase inhibitor. **Thorax** 2002; 57,524-527.
56. Hayashi M, Senba S, Saito I, et al. Changes in blood pressure, urinary kallikrein, and urinary prostaglandin E2 in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmakol** 1983; 322, 290-294.
57. Hedlund H, Andersson K. Comparison of the responses to drugs acting on adrenoreceptors and muscarinic receptors in human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. **J Auton Pharmacol** 1985; 5: 81.
58. Hehenberg K, King GL. PKC and diabetic complications. **Endocrine Fellows Foundation** 1999; 6: 1, 1-11.
59. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Circ Res** 2001; 88, 14-22.
60. Horowitz M, and Fraser R. Disordered gastric motor function in diabetes mellitus. **Diabetologia** 1994; 37, 543-551.
61. Igarashi M, Wakasaki H, Takahara N, et al. Diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. **J Clin Invest** 1999; 103, 185-195.
62. Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, et al. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochem Biophys Res Comm** 1990; 170, 843.
63. Itoh K, Yoshika K, Akedo H, et al. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. **Nat Med** 1999; 5: 2, 221-5.
64. Izzo JL, Mc Caron DA, James WE. The microcirculation in hypertension: An overview. **Curr Concepts Hypertension** 1998; 2: 3, 1-7.
65. Jack AM, Keegan A, Cotter MA, Cameron, NE. Effects of diabetes and evening primrose oil treatment on responses of aorta, corpus cavernosum and mesenteric vasculature in rats. **Life Sci** 2002; 71, 1863-1877.

66. Jenkinson KM, Reid JJ. Altered non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in gastric fundus from streptozotocin-diabetic rats. **Eur J Pharmacol** 2000; 4:401(2), 251-8.
67. Jeremy JY, Thompson CS and Mikhailidis DP. Differential changes of prostanoid synthesis by the gastrointestinal tract, mesenteric vasculature and hepatic portal vein of diabetic rats. **In Vivo** (Attiki) 1992; 6, 635-639.
68. Josh DP, and Mansuri SM. Effect of experimental diabetes on adrenergic receptor activity in cardiac and non-cardiac smooth muscles of rat. **Indian J Pharmacol** 1991 23, 104-108.
69. Kamata K, Miyata N, and Kasuya Y. Involvement of endothelial cells in the relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in naive and streptozotocin-induced diabetic rats. **J Pharmacol Exp Ther** 1989; 249, 890-894.
70. Kamata K, Sakamoto A, and Kasuya Y. Changes in the sensitivity of rat stomach fundus to various drug in streptozotocin-induced diabetic rats. **Jpn J Pharmacol** 1988; 47, 99-102.
71. Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 1985; 25, 593-603.
72. Kandabashi T, Shimokawa H, Mukai Y, et al. Involvement of rho-kinase in agonist-induced contractions of arteriosclerotic human arteries. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2002; 22, 243-248.
73. Kaneko T, Amano M, Maeda A, et al. Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase. **Biochem Biophys Res Commun** 2000; 273, 110-116.
74. Kaputlu I, Özdem S, Şadan G, Gökalp O. Effects of diabetes on non-adrenergic, non-cholinergic relaxation induced by GABA and electrical stimulation in the rat isolated duodenum. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 1999; 26(9), 724-8.
75. Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 10. baskı. Feryal matbaacılık, 2002 Ankara. sayfa 1177-1220.
76. Keegan A, Cotter MA, Cameron NE. Effects of chelator treatment on aorta and corpus cavernosum from diabetic rats. **Free Radic Biol Med** 1999; 27: 5/6, 536-543.
77. Khan MA, Thompson CS, Sullivan ME, et al. The role of prostoglandins in the erectile dysfunction. **Prostaglandins leukot and essent fatty acids** 1999; 60, 169-174.
78. Kimura I, Hata Y, Islam A et al. Diabetes mellitus-induced enhancement of prostaglandin

- F_{2α}-responses is inhibited by lipoxygenase-but not cyclooxygenase-inhibitors in mesenteric veins and arteries of mouse and rat. **Jpn J Pharmacol** 1994; 64, 65-70.
79. Kobayashi T and Kamata K. Relationship among cholesterol, superoxide anion and endothelium-dependent relaxation in diabetic rats. **Eur J Pharmacol** 1999 Feb 19; 367:2-3, 213-22.
 80. Koch KL. Diabetic gastropathy: gastric neuromuscular dysfunction in diabetes mellitus: a review of symptoms, pathophysiology, and treatment. **Dig Dis Sci** 1999; 44(6): 1061-75.
 81. Korolkiewicz R, Szyk A, Kato S et al. Effects of diabetes mellitus on the contractile activity of carbachol and galanin in isolated gastric fundus strips of rats. **Pharmacology** 1998; 57: 2, 65-78.
 82. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and development of diabetic complications. **Diabetes** 1998; 47, 859-866.
 83. Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M et al. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through Myosin light chain phosphorylation. **J Biol Chem** 1997; 272: 19, 12257-12260.
 84. Law SC, and King RG. Effects ponelrestat on depressor responses to arachidonic acid in streptozotocin-diabetic rats. **Gen Pharmacol** 1990; 21, 135-139.
 85. Linkoln J, Boker JT, Crowe R, et al. Myenteric plexus in streptozotocin-treated rats: neurochemical and histochemical evidence for diabetic neuropathy in the gut. **Gastroenterol** 1984; 86, 654-661.
 86. Lithell H, Berne C. Diabetogenic drugs. In pharmacology of diabetes: Present practise and future perspectives, ed. by CE Mogensen and E Standl, vol 3, pp57-74, Walter de Gruyter Berlin 1991.
 87. Marin J and Rodrigez-Martinez A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacol Ther** 1997; 75: 2, 111-134.
 88. Masiero L, Lapidos KA, Ambudkar I, et al. Regulation of the RhoA pathway in human endothelial cell spreading on type IV collagen: role of calcium influx. **J Cell Sci** 1999;112, 3205-3213.
 89. McGregor E, Gosling M, Beattie DK, et al. Circumferential stretching of saphenous vein smooth muscle enhances vasoconstrictor responses by Rho kinase-dependent pathways. **Cardiovasc Res** 2002;53, 219-216.

90. Meininger CJ, Marinos R.S, Hatekeyama K et al. Impaired Nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. **Biochem J** 2000; 349, 353-356.
91. Miao L, Calvert JW, Tang J et al. Upregulation of small GTPase RhoA in the basilar artery from diabetic (mellitus) rats. **Life Sci** 2002; 71, 1175-85.
92. Miao L, Dai Y, Zhang J. Mechanism of RhoA/Rho kinase activation in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. **Am J Physiol** 2002; 283, 983-989.
93. Mills TM, Chitaley K, Lewis RW, et al. Nitric oxide inhibits RhoA/Rho-kinase signaling to cause penile erection. **Eur J Pharmacol** 2002; 439, 173-174.
94. Miyazaki K, Yano T, Schmidt DJ, et al. Rho-dependent agonist-induced spatio-temporal change in myosin phosphorylation in smooth muscle cells. **J Biol Chem** 2002; 277, 725-734.
95. Mukai Y, Shimokawa H, Mataba T et al. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease—a novel therapeutic target in hypertension. **The FASEB J** 2001february 20, express article 10.1096/fj.00-0735 fje published online.
96. Nagumo H, Sasaki Y, Ono Y et al. Rho kinase inhibitor HA-1077 prevents Rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells. **Am Physiol Cell Physiol** 2000; 278, 57-65.
97. Nilsson PH. Diabetic gastroparesis: a review. **J Diabetes Complications** 1996; 10(2), 113-22.
98. Nishigaki R, Guo F, Onda M et al. Ultrastructural changes and immunohistochemical localization of NOS AGE_s and NF- κ B in aorta of streptozosin treated Mongolian gerbils. **J nippon Med Sch** 1999; 6: 63, 166-175
99. Nowak TW, Harrinton B, Weisbruch JP, et al. Structural and functional characteristics of muscle from diabetic rodent small intestine. **Am J Physiol** 1990; 258, 690-698.
100. Obgonmaya KI and Arem R. Diabetic Diarrhea: pathophysiology, diagnosis and management. **Arch Intern Med** 1990; 150, 262-275.
101. Ohara T, Sussman KE, and Draznin B. Effect of diabetes on cytosolic free Ca²⁺, Na⁺, K⁺-ATPase in rat aorta. **Diabetes** 1991; 40, 1560-1563.
102. Ördög T, Takayama I, Cheung WK, et al. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. **Diabetes** 2000; 49(10), 1731-9.

103. Orhan S: bölüm 8 Diyabetes Mellitus. Endokrinoloji Metabolizma ve Beslenme Hastalıkları. Sencer E Tayf Ofset 2001 Nobel Tıp Kitabevleri sayfa: 246, 247, 268-273.
104. Owen, MP, Carrier GO. Calcium dependence of norepinephrine-induced vascular contraction in experimental diabetes. **J Pharmacol Exp Ther** 1980; 212, 253-258.
105. Özçelikay AT, Pekiner, C, Arı N, et al. The effect of vanadyl treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia** 1994; 37, 572-578.
106. Özçelikay AT, Tay A, Güner Ş, et al. Reversal effect of l-arginine treatment on blood pressure and vascular responsiveness of streptozotocin-diabetic rats. **Pharmacol Res** 2000; 41, 201-209.
107. Öztürk Y, Altan VM, and Yıldızoğlu-Arı N. Duration-dependent changes in calcium responsiveness in the alloxan-diabetic rat intestine. **J Diabetes Complications** 1996 ;10(5), 288-93.
108. Öztürk Y, Altan VM, and Yıldızoğlu-Arı N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. **Pharmacol Rev** 1996; 48: 1, 69-112.
109. Öztürk Y, Aydın S, Altan VM et al. Effect and short and long term streptozotocin diabetes on smooth muscle calmodulin levels in the rat. **Cell Calcium** 1994; 16, 81-86.
110. Öztürk Y, Aydın S, Özçelikay AT, Altan VM et al. Calmodulin content and in vitro contractility of duodenum from streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin therapy and calmodulin antagonism. **Eur J Pharmacol** 1997; 19: 321(1), 59-65.
111. Park JK, Lee SO, Kim YG, et al. Role of rho-kinase activity in angiotensin II-induced contraction of rabbit clitoral cavernosum smooth muscle. **Int J Imp Res** 2002;14, 472-477.
112. Pausawasdi N, Ramamoarty S, Stepan V, et al. Regulation and function of p38 protein kinase in isolated canine gastric parietal cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2000; 278, 24-31.
113. Peterson RV, Edelman SD, Kim D. Musculoskeletal Complications of Diabetes Mellitus. **Clin Diabetes** 2001; 19, 132-135.
114. Piercy M, Taylor SG. A comparison of spasmogenic and relaxant responses in aorta from C57/BL/KsJ diabetic mice with those from their non-diabetic litter mates. **Pharmacology** 1998; 56, 267-275.
115. Popov D, Hasu M, Costache G, et al. Capillary and aortic endothelia interact in situ with

- nonenzimatically glycosylated albumin and develop specific alterations in early experimental diabetes. **Acta Diabetol** 1997; 34, 285-293.
116. Prasad MV, Dermott JM, Heasley LE, et al. Activation of Jun kinase/stress-activated protein kinase by GTPase-deficient mutations of G alpha 12 and G alpha 13. **J Biol Chem** 1995; 270, 18655-18659.
 117. Quigley EM. The pathophysiology of diabetic gastroenteropathy: more vague than vagal. **Gastroenterology** 1997; 113(5):1790-4.
 118. Ramabadran K, Bansinath M, Turndorf H et al. Hyperglycemia as a factor of affecting K opiate agonist-induced inhibition of the gastrointestinal transit in mice. **J Pharm Pharmacol** 1989; 41, 496-498.
 119. Ramabadran K, Bansinath M, Turndorf H et al. Streptozotocin-diabetes attenuates α_2 -adrenoceptor agonist-induced delay in small intestinal transit in mice. **J Auton Pharmacol** 1990; 10, 163-171.
 120. Ramos OL. Diabetes mellitus and hypertension: state of the art lecture. **Hypertension** (Dallas) 1988; 11 suppl. 1, 114-118.
 121. Rees RW, Ralph DJ, Royle M, et al. Y-27632, an inhibitor of Rho-kinase, antagonizes noradrenergic contractions in the rabbit and human penile corpus cavernosum. **Br J Pharmacol** 2001; 133: 4, 455-8.
 122. Rees RW, Ziessen T, Ralph DJ, et al. Human and rabbit cavernosal smooth muscle cells expressed Rho-kinase. **Int J Imp Res** 2002; 14, 1-7.
 123. Robinson DN, Spudich JA. Towards a molecular understanding of cytokinesis. **Trends Cell Biol** 2000; 10, 228-237.
 124. Rossowski WJ, Cheng B-L, Taylor Je, et al. Human α -urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinase and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. **Eur J Pharmacol** 2002; 438, 159-170.
 125. Sakai Y, Inuzu M, Aihara K et al. Relations between contractile responses and β -adrenoceptors in gastric fundus of diabetic rats. **Life Sci** 1991; 48, 1043-1049.
 126. Sandu OA, Ragalia L and Begum N. Diabetes in Goto-Kakizaki Rat is accompanied by impaired insulin-mediated myosin-bound phosphatase activation and smooth muscle cell relaxation. **Diabetes** 2000; 49, 2178-2189.
 127. Santilli S, Fiegel VD and Knighton DR. Alloxan diabetes alters the rabbit transendothelial

- wall oxygen gradient. **J Vasc Surg** 1993;18, 227-233.
128. Saurin J-C, Fallavier M, Sordat B. Et al. Bombesin stimulates invasion and migration of Iscerol colon carcinoma cells in a Rho-dependent manner. **Cancer Res** 2002; 62, 4829-4835.
 129. Shearman MS, Sekiguchi K and Nishizuka Y. Modulation of ion channel activity: a key role of the protein kinase C enzyme family. **Pharmacol Rev** 1989; 41, 211-237.
 130. Shin HM, Je HD, Gallant C, Tao TC, et al. Differential association and localization of myosin phosphatase subunit during agonist-induced signal transduction in smooth muscle. **Circ Res** 2002; 90, 546-553.
 131. Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Et al. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase mediated Ca^{2+} sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. **Circ Res** 2002; 91, 112-119.
 132. Sobey CG. Potassium channel in vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2001; 21, 28-38.
 133. Somlyo AP, Somlyo AV. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. **Acta Physiol Scand** 1998;164, 437-448.
 134. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and non-muscle myosin II. **Journal of Physiology** 2000; 522:2, 177-185.
 135. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction, regulation in smooth muscle. **Nature** 1994; 372, 231-236.
 136. Soriano FG, Pacher P, Mabley J, et al. Rapid reversal of diabetic endothelial dysfunction with pharmacological inhibition of Poly (ADP-Riboz) Polymerase. **Circ Res** 2001; 89, 684-691.
 137. Soulie ML, Cros G, Serrano JJ, et al. Impairment of contractile response to carbachol and muscarinic receptor coupling in gastric antral smooth muscle cells isolated from diabetic streptozotocin-treated rats and db/db mice. **Mol Cell Biochem** 1992; 12:109, 185
 138. Sullivan ME, Mumtaz FH, Dashwood MR, et al. Enhanced relaxation of diabetic rabbit cavernosal smooth muscle in response to nitric oxide: potential relevance to erectile dysfunction. **Int J Impot Res** 2002; 14, 523-532.
 139. Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR et al Nitric oxide and penile erection: Is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? **Cardiovasc Res** 1999; 43,

- 658–665.
140. Swärd K, Dreja K, Susnjar M, et al. Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca^{2+} sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. **J Physiol** 2000; 522, 33-49.
 141. Taggart MJ, Leavis P, Feron O, Et al. Inhibition of PKC_α and RhoA translocation in differentiated smooth muscle by a caveolin scaffolding domain peptide. **Exp Cell Res** 2000; 258, 72-81.
 142. Takahashi T, Kojima Y, Tsunoda Y et al. Impaired intracellular signal transduction in gastric smooth muscle of diabetic BB/W rats. **Am J Physiol** 1996; 270, 411-417.
 143. Takai Y, Minakuchi R, Kikkawa U, et al. Membrane phospholipid turnover, receptor function, and protein phosphorylation. **Prog Brain Res** 1982; 56, 289-301.
 144. Takai Y, Sasaki T, Matazaki T. Small GTP-Binding Proteins. **Physiol Rev** 2001; 81: 1, 153-208.
 145. Thompson CS, Mumtaz FH, Khan MA, et al. The effect of sildenafil on corpus cavernosal smooth muscle relaxation and cyclic GMP formation in the diabetic rabbit. **Eur J Pharmacol** 2001; 425, 57-64.
 146. Tomizawa H, Yamazaki M, Kunika K et al. Association of elastin glycation and calcium deposit in diabetic rat aorta. **Diabetes Res Clin Pract** 1993; 19, 1-8.
 147. Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, et al. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. **Pharmacol Rev** 1992; 44, 103-150
 148. Tomomosa T, Takahashi A, Kaneko H. Y-27632 inhibits gastric motility in conscious rats. **Life Sci** 2000; 66: 2, 29-34
 149. Triggle DJ. Calcium The control of smooth muscle and bronchial hyperreactivity. **Allergy (cph)** 1983; 38, 1-9.
 150. Tsao PS, Niebauer J, Buitrago R, et al. Interaction of diabetes and hypertension on determinants of endothelial adhesiveness. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1998; 18, 947-953
 151. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature** 1997; 389, 990–994.
 152. Uemura S, Matsushita H, Li W, et al. Diabetes mellitus enhances vascular matrix

- metalloproteinase activity role of oxidative stress. **Circ Res** 2001; 88, 1291-1298.
153. Vernet D, Cai L, Garban H, et al. Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WORdp (type I) and BBZ/WORdp (type II) rats with erectile dysfunction. **Endocrinology** 1995; 13, 5709-5717.
154. Wali R, Dudeja PK, Bolt MJ et al. Correction of abnormal small intestinal cytoplasmic protein kinase C activity in streptozotocin-induced diabetes by insulin therapy. **Biochem J** 1990; 272, 653-658.
155. Wang H, Eto M, Steers WD et al. RhoA-mediated Ca^{2+} sensitization in erectile function. **J Biol Chem** 2002; 277: 34, 30614-30621.
156. Way KJ, Reid JJ. The effects of diabetes on nitric oxide-mediated responses in rat corpus cavernosum. **Eur J Pharmacol** 1999; 376, 73-82.
157. White RE, Carrier GO. Vascular contraction induced by activation of membrane calcium ion channels is enhanced in streptozotocin-diabetes. **J Pharmacol Exp Ther** 1990; 253, 1057-1062.
158. Xue L, Suzuki H. Electrical responses of gastric smooth muscles in streptozotocin-induced diabetic rats. **Am J Physiol** 1997; 272(1 Pt 1), G77-83.
159. Yang R, Arem R and Chan L. Gastrointestinal tract complications of diabetes mellitus. **Arch Intern Med** 1984; 144, 1251-1254.
160. Yenigün M: Her Yönüyle Diyabetes Mellitus. 2.baskı, Tayf Ofset, 2001 İstanbul sayfa 51, 3.
161. Yıldızoğlu-Arı N, Altınkurt O, Öztürk Y, et al. Decreased gastro-intestinal responses to salbutamol and serotonin in streptozotocin-induced diabetes. **Gen Pharmacol** 1988; 19, 665-668.
162. Zhao L. Effects of free radicals in diabetes. The University of Iowa May 2 2001.