

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

**KRONİK OUABAİN UYGULANMIŞ SIÇANLARIN
DAMAR, BÖBREK VE KALP DOKULARINDA
RHO-KİNAZ ENZİM EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Gürkan GÖZÜBÜYÜK

Tez Danışmanı
Doç.Dr. Mustafa ARK

ANKARA
Ağustos 2007

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

**KRONİK OUABAİN UYGULANMIŞ SIÇANLARIN
DAMAR, BÖBREK VE KALP DOKULARINDA
RHO-KİNAZ ENZİM EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Gürkan GÖZÜBÜYÜK

Tez Danışmanı
Doç.Dr. Mustafa ARK

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 02 / 2007-11 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Ağustos 2007

Tez dönemim boyunca benden desteğini esirgemeyen, tecrübeleri ile her türlü yardımda bulunan tez danışmanım **Doç. Dr. Mustafa ARK'a** sonsuz teşekkür ederim.

Öğrencilik hayatım ve tez dönemim boyunca benden desteğini
esirgemeyen, bana olan güvenlerini her zaman hissettiren **annem Songül**
ve babam Mehmet Ali GÖZÜBÜYÜK'e sonsuz teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca bana, her türlü yardımda bulunan ve destekleyen arkadaşlarım **Uzm. Ecz. Ela KADIOĞLU, Ecz. Onur KADIOĞLU, Uzm. Ecz. Eda AYPAR ve Ecz. Aysun ÖZDEMİR'e** sonsuz teşekkür ederim.

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

DOKTORA /YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

ÖĞRENCİNİN ADI ve SOYADI : Gürkan Gözübüyük
ANABİLİM DALI : Farmakoloji
SINAV TARİHİ : 12.09.2007
TEZ KONUSU : Kronik aabain uygulanmış sıganların
damar, böbrek ve kalp dokularında
rho-kinaz enzim ekspresyonlarının incelenmesi

KARAR

Yukarıda belirtilen tarihte yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda yukarıda konusu belirtilen tezin

Düzeltilmesine :
Kabulüne : ✓
Reddine :

OYBİRLİĞİ / ~~OYÇOKLUĞU~~ ile karar verilmiştir.

GEREKÇE

Prof. Dr. Nurettin ABACIOĞLU
Gazi Üniversitesi Eczacılık
Fakültesi Farmakoloji
Anabilim Dalı
06330 Etiler/Beşiktaş/İstanbul

JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. Bolkan Dincel
ÜYE

ÜYE

Dr. Dr. Mustafa ARK
ÜYE

ÜYE

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	V
Tablolar	VI
Grafikler	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Esansiyel Hipertansiyon Etiyopatogenezi	3
2.2.Na ⁺ /K ⁺ ATPaz ve fonksiyonları	4
2.3.Kardiyak Glikozidler ve Endojen Ouabain	11
2.4.Küçük GTP Bağlayıcı Proteinler, RhoA/Rho-kinaz Yolağı ve Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	14
2.4.1.Küçük GTP Bağlayıcı Proteinler	14
2.4.2.RhoA/Rho-kinaz Yolağı	17
2.4.3.Rho-kinaz Aktivitesinin Düzenlenmesi	19
2.4.4.Rho-kinazın Dokulardaki Dağılımı ve İntrasellüler Lokalizasyonu	21
2.4.5.Substratlar ve Hücrel Fonksiyonlar	21
2.4.6.Miyozin ve Kontraksiyon	23
2.4.7.RhoA/Rho-kinaz'ın Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	23

2.4.7.1.Kardiyovasküler Hastalıklar ve Rho-kinaz	23
2.4.7.2.Kanser ve Rho-kinaz	25
2.4.7.3.Göz Hastalıkları ve Rho-kinaz	25
2.4.7.4.Obstetrik ve Rho-kinaz	26
2.4.7.5.Üriner Sistem ve Rho-kinaz	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1.Gereçler	27
3.1.1.Kullanılan Deney Hayvanları	27
3.1.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
3.1.3.Kullanılan Aletler	28
3.2.Yöntem	29
3.2.1.İn-vivo Kan Basıncı Ölçümü (Tail Cuff Yöntemi)	29
3.2.2.Doku Homojenizasyonu ve Protein Miktar Tayini	29
3.2.3.İmmunoelektroblotting (İmmunoelektroblotlama)	32
3.2.4.İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1.Ouabain İle İndüklenen Hipertansiyon	35
4.2.Aort, Böbrek ve Kalpteki ROCK Ekspresyonları	37
4.2.1.Aort Dokusundaki ROCK Ekspresyonu	37
4.2.2.Böbrek Dokusundaki ROCK Ekspresyonu	39
4.2.3.Kalp Dokusundaki ROCK Ekspresyonu	40
5. TARTIŞMA	41

6. SONUÇ	43
7. ÖZET	44
8. SUMMARY	45
9. KAYNAKLAR	46
10. ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİLLER

Şekil 1: Na ⁺ /K ⁺ ATPaz'ın alt üniteleri.	6
Şekil 2: Ouabain Na ⁺ /K ⁺ ATPaz'a bağlanması.	9
Şekil 3: Ouabain Na ⁺ /K ⁺ ATPaz-IP3R aracılığı ile hücre proliferasyonunu.	10
Şekil 4: Endojen kardiyotonik steroid ouabain'in kimyasal yapısı.	12
Şekil 5: Küçük G proteini aktivasyonu.	16
Şekil 6: Vasküler düz kas hücre kontraksiyonunda Rho/ROCK düzenlenme mekanizması.	18
Şekil 7: Rho-kinaz enziminin düzenlenmesi.	20
Şekil 8: Ouabain uygulanmış ve kontrol grubu sıçanların aorta dokularındaki ROCK1 ekspresyonu.	37
Şekil 9: Ouabain uygulanmış ve kontrol grubu sıçanların aorta dokularındaki ROCK2 ekspresyonu.	38
Şekil 10: Ouabain uygulanmış ve kontrol grubu sıçanların böbrek dokularındaki ROCK1 ekspresyonu.	39
Şekil 11: Ouabain uygulanmış ve kontrol grubu sıçanların kalp dokularındaki ROCK1 ekspresyonu.	40

TABLÖLAR

Tablo 1: Rho-kinaz substratları.	22
Tablo 2: BCA yöntemi ile protein miktar tayininde plak yerleşim tablosu.	31

GRAFİKLER

**Grafik 1: Kontrol ve ouabain uygulanan sıçanlardaki kuyruk
manşeti yöntemi ile elde edilen haftalık ortalama sistolik kan
basıncı grafiğı** **36**

1.GİRİŞ

Kan basıncının regülasyonunun fizyolojisi uzun yıllardır iyi bilinmektedir. Fakat esansiyel hipertansiyonun nedenleri henüz o kadar net değildir¹. Esansiyel hipertansiyon, bütün hipertansiyon vakalarının %95'ini kapsamaktadır ve her hastanın farklı yüksek kan basıncına neden olan farklı faktörler içeren heterojen bir hastalıktır. Yüksek kan basıncı ile inme, miyokardial infarktüs, kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklar arasında güçlü pozitif ve sürekli bir bağlantı vardır².

Esansiyel hipertansiyonda endotele bağlı vazodilatasyon cevabının bozulması ve vazokonstriktörlere olan hassasiyetin artması periferik damar direncini arttırabilmektedir³.

Bazı hastalarda halen esansiyel hipertansiyonun etiyolojisi ile ilgili yeni bir mekanizma incelenmektedir. Bu mekanizma, böbreklerin Na^+ atılım yeteneğinin hasar görmesi ile beraber endojen Na^+ - K^+ pompası inhibitörünün plazma düzeyinin artması ile ilgilidir. Nitekim kanıtlar son yıllarda Na^+ - K^+ pompasının fonksiyonelliğinin, digoksin benzeri faktörleri ve bufadienolid türevlerini içeren endojen bileşiklerle modüle edildiğini göstermektedir. Bu endojen inhibitörlerden bir tanesi, ouabain benzeri faktör (OLF) olarak adlandırılmaktadır⁴.

Na^+/K^+ ATPaz plazma membranına yerleşik olarak, Na^+ iyonlarını hücre dışına, K^+ iyonlarını hücre içine adenozin trifosfat hidrolizi enerjisini kullanarak transfer etmektedir. Na^+/K^+ ATPaz enzimi kardiyotonik steroidlerin (CTS) bağlanabildiği spesifik bağlanma bölgesi içermektedir. Bitkilerden elde edilen digitalis ve memeli analogu olan ouabain bu CTS ailesine aittir ve Na^+/K^+ ATPaz enzimini doza bağımlı olarak inhibe etmektedir⁵.

Ouabainin Na^+/K^+ ATPaz'a bağlanması, diğer proteinleri farklı sinyal modüllerine fosforilleyen aktif "temel reseptör" formasyonu ile sonuçlanan Src sitoplazmik tirozin kinazı aktive etmektedir. Bu da mitojen aktif protein kinaz ve protein kinaz C izozimlerini içeren çoklu protein kinazları aktive etmektedir⁶. Na^+/K^+ ATPaz'ı inhibe etmeyecek dozdaki ouabain, Ca^{++} salınımını arttırarak pozitif kardiyak inotrop etkiye neden olmaktadır⁷.

Plazma da dahil olmak üzere neredeyse bütün dokularda ouabain benzeri immünoreaktivite bulunmuştur. Kronik renal yetmezlik, hiperaldosteronizm, konjestif kalp yetmezliği ve preeklampside yüksek oranlarda dolaşımda ouabain bulunmuştur⁸.

RhoA/Rho-kinaz sinyalinin, anjiyotensin II ve vazopresörlerle ilişkisi, kardiyovasküler patofizyoloji için önem kazanmaktadır⁹. Rho küçük GTPazdır ve sinyal iletimini düzenleyen moleküler bir anahtar olarak kabul edilir. Rho-kinaz, miyozin fosfatazı inaktive ederek düz kas kasılmasına neden olan miyozin hafif zincirin fosforilasyonunu düzenlemektedir ve düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlılığının düzenlenmesinden sorumludur^{10,11}. Rho-kinaz aracılıklı kalsiyum duyarlılığının, hipertansiyon ve koroner arter spazmı gibi hastalıklarda rolü bulunmaktadır¹².

Rho-kinazın fizyopatolojik olaylardaki rolleri, Y27632 gibi Rho-kinaz inhibitörleri kullanılarak değerlendirilmiştir¹³. Y27632 hipertansif sıçanlarda yüksek kan basıncını doza bağımlı olarak düşürmekte iken normal kan basıncı değerlerine herhangi bir etkide bulunmamaktadır. Bu bulgu, Rho-Rho-kinaz aracılıklı Ca^{2+} duyarlılığına bağlı düz kas kontraksiyonunun hipertansiyona neden olabildiğini göstermiştir¹⁴.

Bu çalışmadaki amaç ouabain ile hipertansiyon oluşturulan sıçanların kalp, aorta ve böbreklerindeki rho-kinaz ekspresyonundaki olası değişikliklerin incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Esansiyel Hipertansiyon Etiyopatogenezi

Renovasküler hastalık, renal yetmezlik, feokromastoma, aldosteronizm veya diğer sekonder hipertansiyon nedenleri gibi ikincil nedenler olmadan oluşan yüksek kan basıncına esansiyel hipertansiyon denmektedir. Esansiyel hipertansiyon, bütün hipertansiyon vakalarının %95'ini kapsamaktadır. Esansiyel hipertansiyon, her hastanın farklı yüksek kan basıncına neden olan farklı faktörler içerdiği heterojen bir hastalıktır. Esansiyel hipertansiyon kardiyovasküler hastalıklar (CVD) için majör bir risk faktörü teşkil etmektedir. Yüksek kan basıncı dünya üzerindeki milyonlarca insanda CVD riskini arttırmaktadır. Kan basıncı ile CVD (inme, miyokardial infarktüs, kalp yetmezliği), renal yetmezlik ve mortalite riski arasında güçlü pozitif ve sürekli bir bağlantı vardır².

Son on yıl içerisinde, inme insidansının (stroke incidence) yaşa bağlı oranı artmış, koroner hastalığın yaşa bağlı kötüleşme oranının eğimi düşmüştür. Renal hastalığın son evre insidansı ve kalp yetersizliğinin görülme sıklığı artmıştır. Bunların major nedeni hipertansif popülasyonda kan basıncının (BP) yetersiz kontrolüdür².

Kan basıncının regülasyonunun fizyolojisi uzun yıllardır iyi bilinmektedir. Fakat esansiyel hipertansiyonun nedenleri henüz o kadar net değildir¹. Esansiyel hipertansiyonun karakterizasyonunda önemli klinik, patolojik ve hemodinamik nitelikler mevcuttur. Klinik olarak hipertansiyon çoğunlukla, metabolik sendrom, obezite ve hiperürisemi bulunan kişilerde veya hiperaktif sempatik sinir sistem aktivitesi olan kişilerde görülmektedir. Diğer bilinen karakteristikler ise ailevi geçmiş, siyah ırk ve düşük doğum ağırlığıdır¹⁵.

Esansiyel hipertansiyon patogenezinde öne sürülen teoriler, renal sodium homeostazisinde defekt, fonksiyonel vazokonstriksiyon ve vasküler düz kas yapısında defektir¹⁶. Patolojik olarak hipertansiyon, aterosklerozis ile ilgilidir. Özellikle böbreklerdeki preglomerüler damarlarını içermektedir. Klasik bir bulgu olarak medial fibrosise neden olabilen interlobular ve arkuat arterlerin medial hipertrofisinden (fibroelastik kalınlaşma) ibarettir. Afferent arteriyoller, homojen eozinofilik yapının subendotelial bozukluğundan da etkilenerek kalınlaşma gösterebilmektedir. Şiddetli veya uzun süreli hipertansiyon

çoğunlukla birçok ciddi renal aterosklerotik değişikliklerle ilgilidir. Glomerüler damar sistemi, bozulmuş renal plazma dolaşımı ile göze çarpan afferent arteriyollerin rezistansının yükselmesi, hemodinamik olarak ilişkilidir. Böbreğin iç kısımlarında kan akımının bozulması, kortikal vazokonstriksiyon ile sonuçlanmaktadır. Esansiyel hipertansiyonlu hastaların % 35-65'inde, antihipertansif terapilerden önce, normal hikayesinde artmış proteinüri belgelenmiştir¹⁵.

Esansiyel hipertansiyonda endotele bağlı vazodilatasyon cevabının bozulması ve vazokonstriktörlere olan hassasiyetin artması periferik damar direncini arttırabilmektedir³. Esansiyel hipertansiyonlu hastalarda, normal periferik arteriyel rezistansla birlikte kalp atım hızında ve hacminde artış rapor edilmiştir. Periferik rezistansın artması ve damar endotelinin kalınlaşması önemli kan basıncı ve nabız basıncı ile birlikte görülmektedir. Endotelial disfonksiyon kan akımının düzenlenmesinde rol oynamaktadır¹⁷.

Bazı hastalarda halen esansiyel hipertansiyonun etiyolojisi ile ilgili yeni bir mekanizma incelenmektedir. Bu mekanizma, böbreklerin Na^+ atılım yeteneğinin hasar görmesi ile beraber endojen Na^+/K^+ pompası inhibitörünün plazma düzeyinin artması ile ilgilidir. Nitekim kanıtlar bu yıllarda Na^+/K^+ pompasının fonksiyonelliğinin, digoksin benzeri faktörleri ve bufadienolide türevlerini içeren endojen bileşiklerle modüle edildiğini göstermektedir. Bu endojen inhibitörlerden bir tanesi, ouabain benzeri faktör (OLF) olarak adlandırılmakta ve hem insanlarda hem de sıçanlarda özenle incelenmektedir ve ouabainin izomeri ile yakın ilişkide olduğu gösterilmiştir⁴.

2.2. Na^+/K^+ ATPaz Fonksiyonları ve Endojen Ouabain

Na^+/K^+ ATPaz plazma membranına yerleşik olarak, Na^+ iyonlarını hücre dışına, K^+ iyonlarını hücre içine adenosin trifosfat hidrolizi enerjisini kullanarak transfer etmektedir. Na^+/K^+ ATPaz enzimi kardiyotonik steroidlerin (CTS) bağlanabildiği spesifik bağlanma bölgesi içerir. Bitkilerden elde edilen digitalis ve memeli analogu olan ouabain bu CTS ailesine aittir. CTS Na^+/K^+ ATPaz enzimini doza bağımlı olarak inhibe etmektedir⁵.

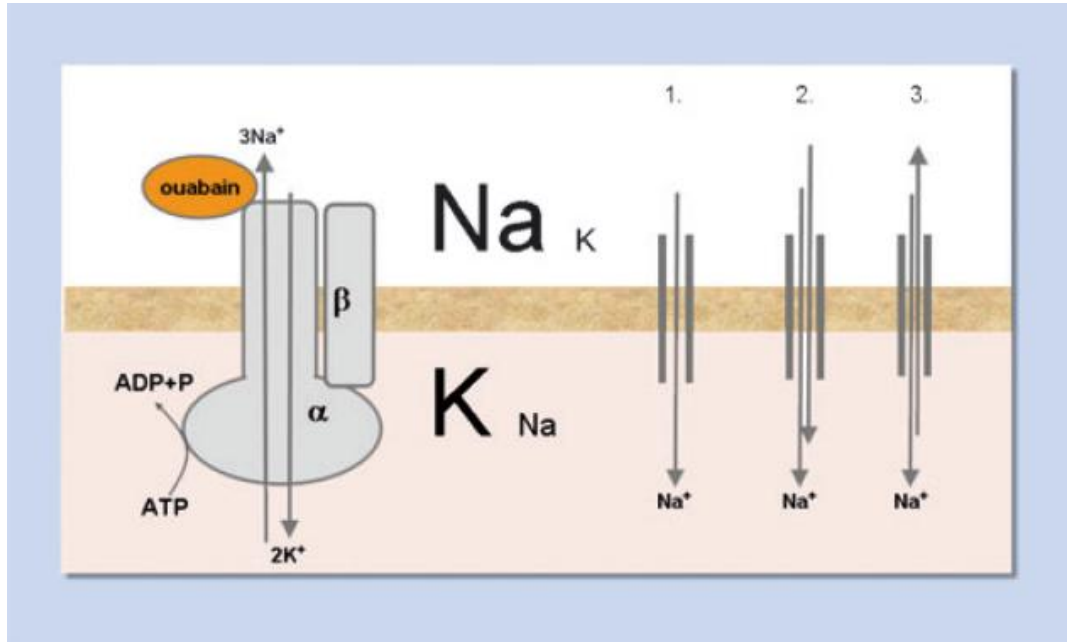
Na^+/K^+ ATPaz ekspresyonu bütün memeli hücrelerinde mevcuttur. Adenosin trifosfat (ATP) hidrolizi enerjisini kullanarak sodyum ve potasyumun vektörel transportunu $3\text{Na}^+ : 2\text{K}^+$

oranında sağlamaktadır. Bu oran plazma membranında elektrokimyasal bir fark oluşturmaktadır. Oluşan bu elektrokimyasal fark, iyonların, aminoasitlerin, glukoz ve birçok farklı bileşiğin sodyum ile çift oluşturarak hücre içine girmesini kolaylaştırmaktadır⁷.

Na^+/K^+ ATPaz enziminin alfa ve beta olmak üzere iki alt ünitesi vardır (Şekil 1). Alfa ünitesi, sodyum potasyum transportunun gerçekleştiği ve ATP ile CTS'nin bağlanma bölgelerinin bulunduğu katalitik alt ünedir. Beta alt ünitesi ise, fonksiyonel enzimler topluluğu ve bunların plazma membranına bütünleşmesi için gerekli olan alt ünedir⁷.

CTS'nin Na^+/K^+ ATPaz enzimine bağlanması gen ekspresyonuna ve hücre büyümesine neden olur. Yakın zamandaki çalışmalar enzimin birçok çözülen ve membran proteinleri ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Na^+/K^+ ATPaz enziminin diğer proteinler ile etkileşime girmesi sadece pompalama fonksiyonunun düzenlenmesi için değil enzimin bir sinyal düzenleyicisi olarak rol almasını sağlaması açısından önemlidir¹⁸.

Na^+/K^+ ATPaz enzimi; hücreler, organlar ve vücuttaki sıvı ve elektrolit dengesini sağlamadaki iyi bilinen rolüne ilave olarak sinyal iletimi, büyüme modülatörü, apoptozis, hücre adezyonu ve motilitesinde de rol alır. Sinyal iletimi fonksiyonu ouabainin bağlanması ile tetiklenmektedir⁷.



Şekil 1: Na⁺/K⁺ ATPaz'ın alfa ve beta olmak üzere iki alt ünitesi vardır. Bu iki alt ünite Na⁺/K⁺ ATPaz'ın plazma membranına doğru eklenmesi için gereklidir. Na⁺/K⁺ ATPaz, Na⁺ iyonunun hücre dışına, K⁺ iyonunun hücre içine transportunda enerji olarak ATP kullanır. Oluşan elektrokimyasal fark Na⁺ iyonunun, sodyum kanallarından(1), Na-glukoz gibi ko-tranposterler (2) ve Na-Ca değıştirci gibi toplayıcı transpoterler (3) ile ilave enerji gerektirmeden hücre içine girmesine izin verir. (7 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

Na^+/K^+ ATPaz pompası P-tipi ATPaz ailesinin bir üyesidir. İyonları pompalama görevinden başka farklı intrasellüler kompartmanlara sinyal iletilisini sağlar. Bazı hücre tiplerinde Na^+/K^+ ATPaz sinyali ve bunun protein kısımları plazma membranlarına bağlanmış olarak yer alır. Ouabainin Na^+/K^+ ATPaz'a bağlanması, diğer proteinleri farklı sinyal modüllerine fosforilleyen aktif "temel reseptör" formasyonu ile sonuçlanan Src sitoplazmik tirozin kinazı aktive eder. Bu da mitojen aktif protein kinaz ve protein kinaz C izozimlerini içeren çoklu protein kinazları aktive eder. Aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin (ROS) mitokondriyel üretimini artırır ve intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunu düzenler. Ouabain kardiyak miyositlerde hipertrofik büyümeyi ve düz kas hücrelerindeki proliferasyonu stimüle etmesine rağmen, bazı malin hücrelerdeki apoptozisi indükler. Sonuç olarak enzimin sinyal fonksiyonu kardiyak miyositlerdeki ouabain aracılıklı genomik olmayan etkilere öncülük eder⁶.

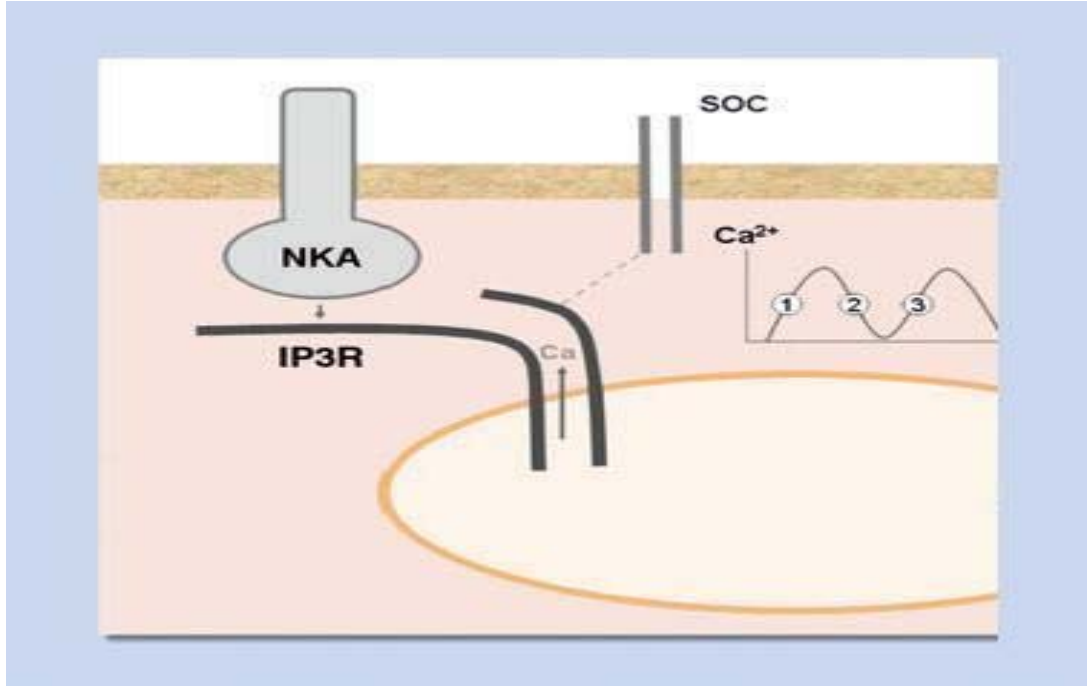
Bitkilerden elde edilen digitalis 200 yıldan fazla zamandır kalp yetersizliğinde kullanılmaktadır. Na^+/K^+ ATPaz digitalis için spesifik bir reseptördür. Digitalis doza bağımlı olarak pompa aracılıklı transportu inhibe etmektedir¹⁹. Bu bulgular digitalisin memeli analogunu araştırmaya yöneltmiştir. Şu an steroid türevi olan ve adrenal korteks ve hipotalamusta üretilen memeli hormonu olan ouabainin Na^+/K^+ ATPaz enzimine yüksek afinite ile bağlandığına ve pompa aktivitesini doza bağımlı inhibe ettiğine dair birçok bulgu vardır. Diğer steroid hormonlarından farklı olarak ouabain plazma membranına penetre olmamaktadır⁸.

Plazma da dahil olmak üzere neredeyse bütün dokularda ouabain benzeri immünoreaktivite bulunmuştur. Kronik renal yetmezlik, hiperaldosteronizm, konjestif kalp yetmezliği ve preeklampsyada yüksek oranlarda dolaşımda bulunan ouabain bulunmuştur. Dolaşımdaki ouabainin yükselmesi aynı zamanda gebelik, postnatal hayat ve uninefrektomi sonrası kalan böbreğin büyümesini takip eden dönemi içeren büyüme ve gelişme evrelerinde de incelenmiştir⁸.

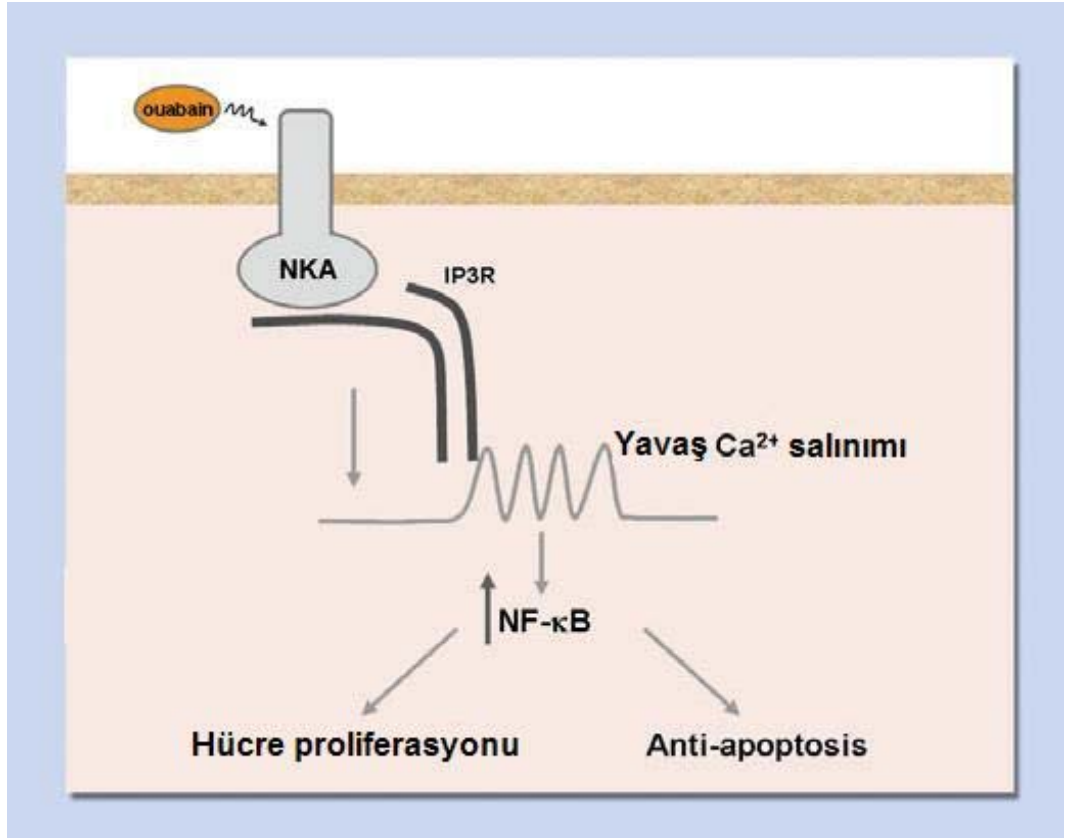
Kardiyotonik steroidlerin (CTS) düşük dozlarda en az iki farklı intrasellüler sinyal dizisini aktive ettiği, çeşitli hücre tiplerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu etki hücresel elektrolit yapısında herhangi büyük bir değişim olmadan meydana gelmektedir²⁰.

Kalsiyum birçok intrasellüler sinyalde rol alır. Hemen hemen bütün hücre kontrol sistemleri kalsiyumu düzenleyici olarak kullanmaktadır. Kardiyovasküler fonksiyon ile ilgili birçok düzenleyici mekanizmada kalsiyum yer almaktadır. Ouabainin, kalsiyumun salınımını tetiklediği Aizman ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir²¹. Kalsiyumun salınımını tetikleyen ouabain dozu, pompa aracılıklı transportu ya parsiyal inhibe etmekte veya hiç inhibe etmemektedir. Fakat bu etki, kalsiyum salınımını kontrol eden inositol trifosfat reseptörünün (IP3R) inhibisyonu ile veya intrasellüler kalsiyum deposunun tükenmesi ile ortadan kalkmaktadır. IP3R kalsiyum konsantrasyonunun değişimine çok duyarlıdır, intrasellüler kalsiyum konsantrasyonu arttığı zaman bu kanal kapanır ve sistolik kalsiyum konsantrasyonu düşer (Şekil 2). Ouabain Na^+/K^+ ATPaz'a bağlanır ve Na^+/K^+ ATPaz-IP3R etkileşimi yeniden IP3R kanalının açılması ile sonuçlanır⁷.

Ouabain bağımlı kalsiyum salınımı spesifik olarak kalsiyum bağımlı transkripsiyonel faktörü NFkB'yi aktive eder. Bu faktör, hücre büyümesi ve apoptozisten sorumlu genleri düzenler. NFkB, anti-apoptotik proteinleri indükleyerek veya pro-apoptotik genleri suprese ederek apoptozisi inhibe eder. Nanomolar konsantrasyondaki ouabain NFkB'yi aktive eder ve apoptozisi önler. Ouabainin anti-apoptozis etkisi için NFkB aktivasyonu şarttır. Düşük dozdaki ouabain aynı zamanda hücre büyümesini arttırır (Şekil 3). Bu etki, sadece ouabainin Na^+/K^+ ATPaz'ı inhibe etmeyecek kadarki dozlarında görülmektedir ve intrasellüler depolardan IP3R aracılıklı kalsiyum salınmasına bağlıdır⁷.



Şekil 2: Ouabain Na^+/K^+ ATPaz'a bağlandığında, endoplazmik redikulumdaki IP3R ile birleşir. Bu IP3R molekülündeki kalsiyum kanallarının açılmasına ve intrasellüler kalsiyum düzeyinin artmasına neden olur. IP3R kalsiyuma duyarlıdır ve kanal tekrar kapanarak kalsiyum düzeyi düşer. Plazma membranındaki depo bağımlı kalsiyum kanalları (SOC) daha sonra daha fazla kalsiyumun hücre içine girmesini sağlar. Bu siklus ouabainin Na^+/K^+ ATPaz'a bağlı kaldığı sürece tekrarlanır. (7 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)



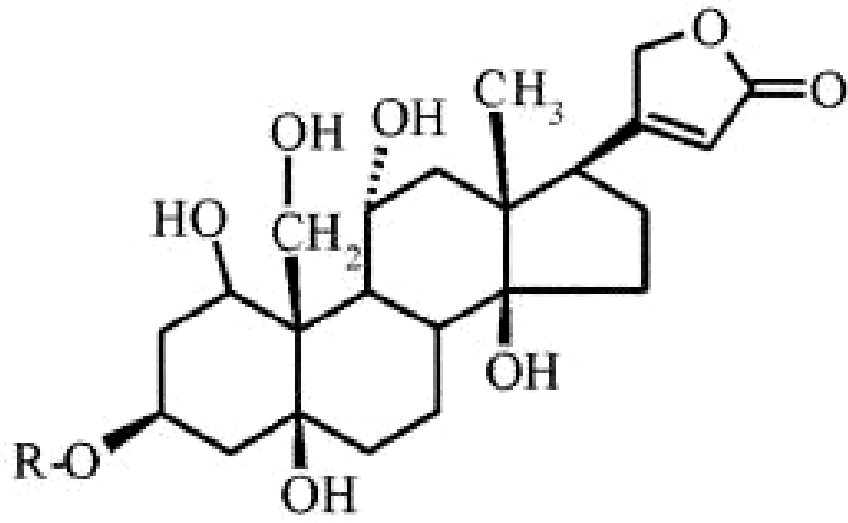
Şekil 3: Ouabain Na⁺/K⁺ ATPaz-IP3R aracılığı ile hücre proliferasyonunu arttırır, apoptozisi inhibe eder. (7 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

2.3.Kardiyak Glikozidler ve Endojen Ouabain

Kardiyotonik steroid olan digitalis ve türevleri, 200 yılı aşkındır konjestif kalp hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. 1953 yılında Schatzman, kardiyotonik steroidlerin sodyum pompasını inhibe ettiğini²² ve digitalis reseptörünün plazma membranındaki Na^+/K^+ ATPaz olduğunu keşfetmiştir²³. Memeli kardiyak kasında $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiştiricisinin 1960 sonlarında bulunması, kardiyak steroidlerin sodyum pompasını inhibe etmesi ile ikincil bir etki olarak kardiyak kasta pozitif inotrop etkiyle sonuçlanan, intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonunun artmasına neden olduğunun anlaşılmasına öncülük etmiştir.

Şu an, sodyum pompasının α_1 izoformunun, kardiyomiyositlerin plazma membranında dağılmış olarak bulunduğu bilinmektedir. Fakat α_2 , ve α_3 izoformlarının plazma membranında, endoplazmik redikuluma yakın bulunmaktadır. Plazmerozom aynı zamanda $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiştirici proteini de içerir. Na^+/K^+ ATPaz'ın α_2 , ve α_3 izoformlarının inhibisyonu, sitosolik Na^+ konsantrasyonunu ve indirekt olarak Ca^{2+} konsantrasyonunun değişmesine öncülük etmektedir. Bu sarkoplazmik redikulumdaki Ca^{2+} içeriğini ve Ca^{2+} sinyalini module eder. Bu modulasyon kardiyak glikozidler pozitif inotropik etkilerine liderlik eder. Kardiyovasküler dokularda endojen digitalis benzeri bileşiklerin üretiminin artması Na^+/K^+ ATPaz enzimini inhibe ederek hipertansiyona katkıda bulunur²².

Endojen Ouabain (Şekil 4) adrenal korteksin ve hipotalamusun steroid yapıda hormonudur. Ouabain benzeri immünoreaktivite, plazma dahil neredeyse bütün dokularda bulunmuştur. Fakat en yüksek konsantrasyon adrenal, hipofiz ve hipotalamusta gözlemlenmiştir²⁴.



OUABAIN
R = Rhamnose

Şekil 4: Endojen kardiyotonik steroid ouabain'in kimyasal yapısı. (22 nolu kaynaktan alınmıştır.)

Oral ve parenteral olarak sağlanan ouabain, adrenal tarafından tutulmaktadır. İntestinal sistemde ouabain tutulumu %3–5 oranındadır. Ouabain majör olarak adrenal bezde stoklanmakta ve/veya sentezlenmektedir ve salınımı hormonal stimölasyon ile olmaktadır²².

Sodyum dengesizliğinde, kronik renal yetmezlikte, hiperaldosteronizmde, konjestif kalp yetmezliğinde ve preeklampside endojen ouabain yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur^{25,26,27,28}. Ouabainin düşük dozlarda insanda vazokonstriksiyona neden olduğu gösterilmiştir. Dolaşımdaki endojen ouabain seviyesi kan basıncı ile doğrudan ilişkilidir. Sıçanların uzun süreli düşük dozlarda (nanomolar) ouabain veya diğer kardenolitre maruz kalması hipertansiyona neden olmuştur²⁹.

Endojen ouabain gibi birçok endojen kardiyak glikozit esansiyel hipertansiyonun patogeneğinde rol almaktadır. Uzun süreli yüksek tuzlu diyet ile beslenme, kardiyak glikozitlerin plazma seviyesinin artmasına neden olmaktadır. Esansiyel hipertansiyonlu hastaların %50'sinden fazlasında endojen ouabain seviyesinin yükseldiği gözlemlenmiştir³⁰.

Genel olarak kardiyak glikozidlerin, intrasellüler Na^+ seviyesini arttırmak için plazma membranında $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPaz enzimini inhibe ettiğine inanılmaktadır. Hücrede Na^+ birikmesi intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunu yükseltir. Bu nedenle kalp kası dahil vasküler düz kasın kontraksiyonunu arttırmaktadır. Bu olaylar zinciri hipertansiyona neden olabilmektedir³¹.

2.4.Küçük GTP Bağlayıcı Proteinler, RhoA/Rho-kinaz Yolağı ve Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

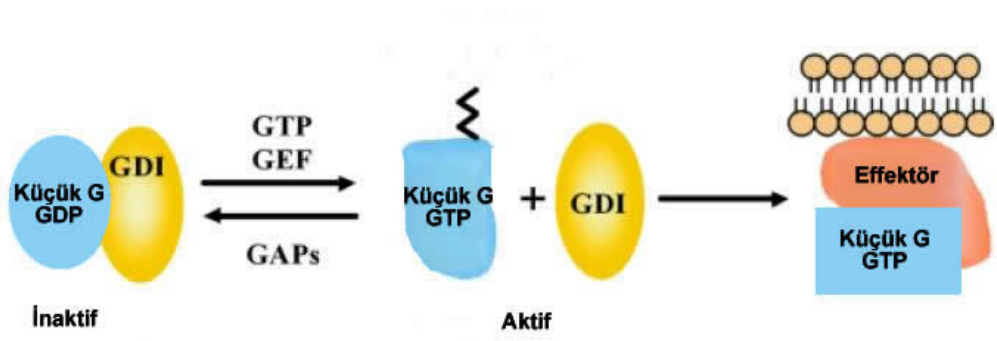
RhoA/Rho-kinaz sinyali ve bunun nitrikoksit seviyesi, anjiyotensin II ve vazopresörlerle ilişkisi, kardiyovasküler patofizyoloji için önem kazanmaktadır⁹. Rho küçük GTPazdır ve sinyal iletimini düzenleyen moleküler bir anahtar olarak kabul edilir. Hücreler, lizofosfatidik asit (LPA) gibi ekstrasellüler sinyal ile stimüle edildiği zaman, inaktif formu olan GDP Rho'nun aktif formu olan ve spesifik efektörlere bağlanan GTP Rho'ya dönüştüğü düşünülmektedir. Rho'nun birçok efektör molekülü Rho'nun aktif formu ile spesifik etkileşimlerine göre aydınlatılmış durumdadır. Rho-kinaz, Rho'nun birçok hücrel alt fonksiyonları ile ilgilidir. Rho-kinaz, miyozin hafif zinciri (MLC) doğrudan fosforilleyerek ve miyozin bağlanma alt ünitesinin (MBS) fosforilasyonu üzerinden miyozin fosfatazın inaktivasyonu ile MLC fosforilasyonunu düzenleyebilmektedir. Rho-kinaz ve miyozin fosfataz, düz kas kasılmasına neden olan MLC'nin fosforilasyonunu koordineli bir şekilde düzenlemektedir³².

Memeli Rho ailesi en az 14 farklı üye içermektedir. Bu proteinler öncelikle hücre iskeletinin kontrolünde, stres liflerinin oluşumunda, fibroblastların fokal adezyonunda ve düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlılığının düzenlenmesinden sorumludur¹¹.

2.4.1.Küçük GTP Bağlayıcı Proteinler

Küçük G proteinleri monomerik yapıda ve GTPaz aktivitesine sahiptir³³. Küçük G-protein ailesi yüzden fazla üye içermektedir. Bunlar yapılarının benzerliklerine göre 5 alt ailede sınıflandırılmışlardır. Bu alt aileler: Ras, Rho/Rac/Cdc42, Rab, Sar1/Arf ve Ran aileleri olarak isimlendirilmişlerdir. Küçük GTPazların moleküler kütleleri 20–40 kDa arasındadır. Ras ailesi GTPaz'lar, gen transkripsiyonuna liderlik etmek için hücre sinyal iletimini regüle etmektedir. Rho ailesi GTPaz'lar aktin hücre iskeletini düzenlemekte ve gen transkripsiyonunu etkilemektedir. Rab ve Arf ailesi GTPaz'lar hücrelerin farklı membran kompartmanları arasındaki veziküler trafiğin formasyonu ve hareketini kontrol etmektedir. Ran ailesi GTPaz'lar hem mikrotübül organizasyonunu hem de nükleositooplazmik protein transportunu düzenlemektedir. Bütün bu GTPaz'ların ökaryotik hücre fonksiyonlarını kontrol eden bir moleküler anahtar fonksiyonları vardır³⁴.

Küçük G proteinleri diğer G proteinleri gibi GDP ve GTP ile spesifik etkileşme ve GTPaz aktivitesi için sorumlu aminoasit dizilimine sahiptir. Effektörleri ile etkileşebilmek için de ayrı bir bölgeye sahiptirler¹¹. Küçük G proteinleri GDP-bağlı inaktif ve GTP-bağlı aktif olmak üzere birbirine dönüşebilen iki forma sahiptir³⁴. İnaktif form GDP'nin aktif formu GTP'ye dönüşüm reaksiyonu GEF (Guanin nükleotid değiştirici protein, guanin nükleotid değiştirici faktör) ile stimüle edilirken, GDP/GTP dönüşüm reaksiyonu GDI (Guanin nükleotid dissosiasyon inhibitörü) ile inhibe edilir. Bu GDP/GTP dönüşüm reaksiyonunun hız kısıtlayıcı basamağı GDP-bağlı formdan GDP'nin ayrılmasıdır. Bu reaksiyon oldukça yavaştır ve GEF tarafından stimüle edilir. Hücre bir stimulus ile uyarıldığında küçük G proteini, GEF aracılığı ile inaktif formdan aktif forma dönüşür. Aktif hale gelmiş küçük G proteini de daha sonra 'downstream' efektörlerini uyararak kendisine ait spesifik etkilerin oluşmasına neden olur (Şekil 5)³⁵.



Şekil 5: Küçük G proteini aktivasyonunun regülasyon modeli. GDI, Guanin nükleotid dissosiasyon inhibitörü; GEF, Guanin nükleotid değıştirici faktör; GAPs, GTPaz aktive edici protein. (35 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

Bu küçük G proteinlerinden Rho'nun uyarılması citron kinaz, rho-kinaz, rhoektin, proteinkinaz N gibi 'downstream' efektörlerin uyarılmasına neden olur. Bunlardan en fazla inceleneni ve üzerinde en çok çalışılanı Rho-kinazdır³³.

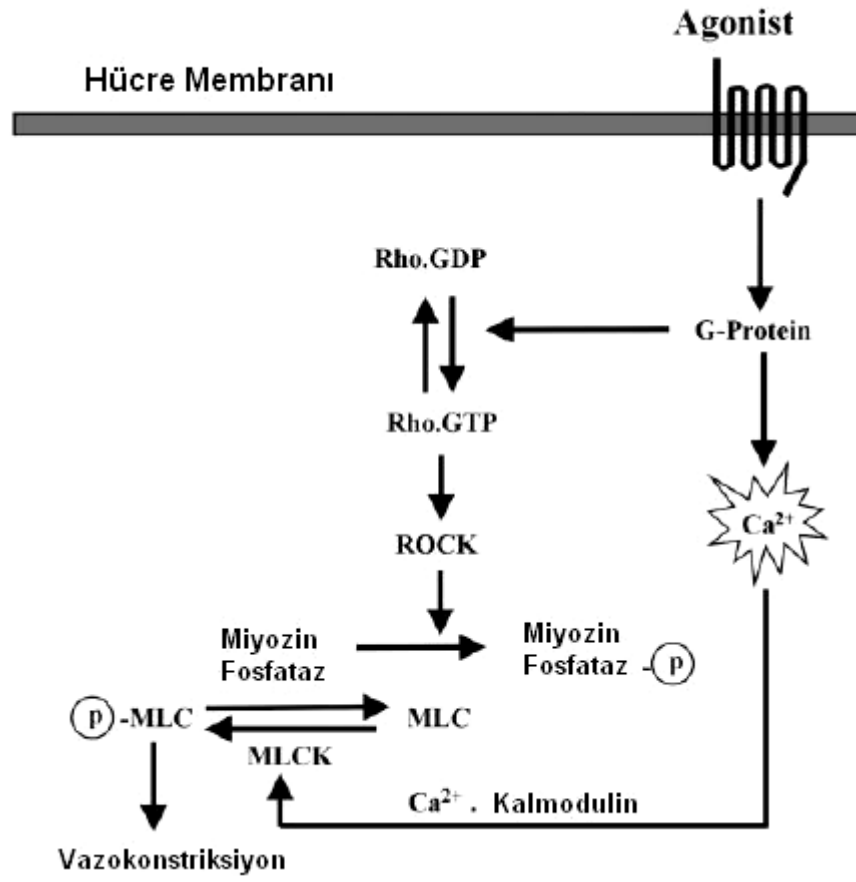
2.4.2.RhoA/Rho-kinaz Yolağı

Rho-kinaz enziminin ROCK1 ve ROCK2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Rho-kinaz yolağının; düz kas hücrelerinde Ca^{2+} duyarlılığı, aktin hücre iskeleti reorganizasyonu, hücre adezyonu, hücrel kontraksiyon gibi fizyolojik olaylarda, anjina, hipertansiyon, glokom, kanser invazyonu, preeklampsi gibi patolojik olaylarda rol oynadığı, insan ve hayvanlar üzerinde yapılan in-vivo ve in-vitro deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur³³.

Sitoplazmik serbest kalsiyum seviyesindeki artış düz kaslarda kasılmayı tetikleyen temel mekanizmadır. Aynı zamanda düz kaslarda agonist ile indüklenen kontraksiyon büyük oranda membran potansiyelinden bağımsız mekanizmalar ile düzenlenmektedir¹¹.

İntraselüler Ca^{2+} seviyesindeki artış, Ca^{2+} 'un kalmoduline bağlanmasını artırır. Ca^{2+} -kalmodulin kompleksi, MLC'yi fosforile etmek için, MLC kinazı aktive eder (Şekil 6)³³. Düz kas kasılmasının seviyesini MLC fosforilasyonunun derecesinin belirlediği genel olarak kabul görmektedir. MLC fosforilasyonu düz kaslarda kontraksiyona neden olurken, hücre içi Ca^{2+} seviyesinin azalmasını takiben MLC defosforilasyonu gerçekleşir ve bu da gevşemeye neden olur¹¹.

Hücre içi kalsiyum ölçülerek yapılan çalışmalarda, kalsiyum konsantrasyonunun MLC fosforilasyonu ve kasılmayla paralellik göstermediği belirlenmiştir. MLC fosforilasyonunun miktarı veya agonist stimülasyonu ile oluşturulan kontraksiyonun gücü, depolarizasyonla oluşturulan kalsiyum artışının neden olduğu kasılmalardan daha büyük olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, MLC fosforilasyonunu ve kalsiyum konsantrasyonundan bağımsız kontraksiyonun derecesini düzenleyen önemli ilave mekanizmalar önerilmiştir. Daha sonraki çalışmalar göstermiştir ki, GTP-bağlayıcı proteinler agonist-bağımlı kalsiyum duyarlılığında rol almaktadırlar¹¹.



Şekil 6: Vasküler düz kas hücre kontraksiyonunda Rho/ROCK düzenlenme mekanizması. Daire içindeki P fosforilasyonu göstermektedir. MLC, miyozin hafif zincir; MLCK, MLC kinaz. (33 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

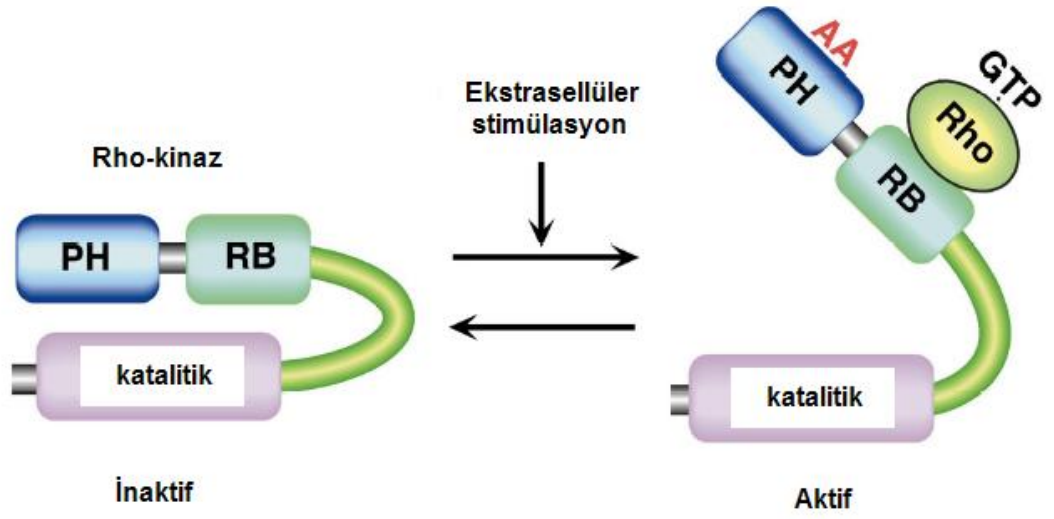
Küçük GTPaz Rho'nun agonistlerle indüklenen kalsiyum duyarlılığından sorumlu olduğu ve bu etkiyi miyozin fosfataz aktivitesinin inhibisyonu ile oluşturduğu düşünülmektedir. Rho proteinleri bu etkiyi downstream efektörleri olan Rho-kinaz "Rho-associated kinase" aracılığı ile oluşturmaktadır³⁶.

Rho-kinaz için spesifik inhibitörler kullanılarak daha sonra yapılan çalışmalar, Rho-kinaz aracılıklı kalsiyum duyarlılığının hipertansiyon ve koroner arter spazmı gibi hastalıklarda rolü olduğunu göstermiştir¹².

2.4.3.Rho-kinaz Aktivitesinin Düzenlenmesi

Rho-kinaz bir Serin/Treonin protein kinazdır ve GTP Rho-binding protein olarak tanımlanmıştır. Rho-kinaz enziminin Rock 1 ve Rock 2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır.

Rho-kinaz orta kısmında dolanmış "coiled-coil" bir alan ve C terminali sonlanmasında ise PH-benzeri "pleckstrin homology" alan içerdiği düşünülmektedir³⁷. PH alanı iki bölgeden oluşmaktadır. GTP.Rho dolanmış alanın C-terminali ile etkileşime girmekte ve Rho-kinazın fosfotransferaz aktivitesini aktive etmektedir. Rho-kinazın C-terminal kısmını kaybetmesi, Rho-kinazı aktif hale getirir. Rho-kinazın C-terminal alanı Rho-bağlanma (RB) bölgesi ve PH alanı içermektedir. RB ve PH alanlarının enzimi inaktif hale getirmek için katalitik bölge ile etkileşime girdiği düşünülmektedir (Şekil 7)³².



Şekil 7: Rho-kinaz enziminin düzenlenmesi. RB, Rho-bağlanma bölgesi; PH, plekstrin-benzeri bölge; AA, araşidonik asit. (32 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

2.4.4.Rho-kinazın Dokulardaki Dağılımı ve İntrasellüler Lokalizasyonu

Rho-kinaz ROCK 2 ekspresyonu beyinde yüksek oranda, akciğerde ise hafiflik olarak orta seviyededir. ROCK 1 ekspresyonu ise yüksek oranlarda kalp, akciğer, iskelet kası, böbrek ve pankreasta, orta oranda ise plasenta, karaciğerde iken beyinde hemen hemen hiç görünmemektedir. Rho-kinazın sıgır beyindeki dağılımı gözlemlenmiş ve serebral kortekste Rho-kinazın güçlü immünoreaktivite etkisi görülmüştür. Rho-kinaz ekspresyonunun seviyesinin fare beyininde postnatal gelişim evresinde yavaş yavaş arttığı gözlemlenmiştir³².

2.4.5.Substratlar ve Hücresel Fonksiyonlar

Aynı zamanda Rho'nun efektörü olan miyozin fosfatazın miyozin bağlanma alt ünitesi (MBS), Rho-kinazın ilk aydınlatılan substratıdır. Miyozin fosfataz; MBS, tip 1 fosfataz katalitik alt ünite ve düzenleyici alt ünite olmak üzere üç alt üniteden oluşmaktadır. Miyozin fosfataz, MBS aracılığı ile fosforillenmiş MLC'ye bağlanmakta ve onu defosforillemektedir. MBS'nin Rho-kinaz ile fosforilasyonu, in vitro ortamda miyozin fosfatazın inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır¹⁰. Rho-kinaz hem MBS'yi hem de MLC'yi fosforillemektedir. MLC'ye ilave olarak ezrin/radixin/moesin (ERM) ailesi proteinler de Rho-kinaz ve miyozin fosfataz için iyi substratlardır. Bu moleküllerin fosforilasyon seviyesini ve organizasyonunu, Rho-kinaz ve miyozin fosfataz birlikte düzenlemektedirler³².

MBS, MLC ve ERM'ye ilave olarak Rho-kinaz birkaç proteini daha fosforillemekte ve düzenlemektedir. Adducin ile membran dalgalanması "ruffling" ve hücre migrasyonunu düzenlemektedir. Rho-kinaz ayrıca Na^+-H^+ değiştiriciyi de fosforilleyerek aktive eder. Aktin bağlayıcı protein, kofilini fosforilleyerek depolimerize aktin filamentlerini inhibe eden LIM-kinaz'ı fosforilleyerek aktive etmektedir (Tablo 1)¹³.

Tablo 1: Rho-kinaz substratları (13 nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

Substrat	Fonksiyonel değişiklik	Biyolojik özellik
Miyozin fosfataz MBS	Miyozin fosfataz inhibisyonu	Düz kas kontraksiyonunda Ca^{2+} duyarlılığı, stres liflerinin oluşumu, fokal adezyon oluşumu, hücre kontraksiyonu, hücre mobilitesi
Miyozin (MLC)	Miyozinin F-aktin'a bağlanmasında artış	
ERM (ezrin, radiksin ve moesin)	ERM aktivasyonu	Mikrovillus oluşumu
Adducin	F-aktin'e bağlanmada artış	Hücre motilitesi, membran büzülmesi "ruffling"
Na^+-H^+ değiştirici	Deęiştiricinin aktivasyonu	Stres liflerinin oluşumu
LIM-kinaz	Kinaz aktivitesinde artış	Kofilin fosforilasyonu

2.4.6.Miyozin ve Kontraksiyon

Rho-kinaz MLC'yi MLC kinaz gibi Ser-19 ve Thr-18'den fosforillemektedir. Bu fosforilasyon miyozin ATPaz'ı aktive etmektedir. MLC'nin Ser-19 üzerinden fosforillenmesinin, hücresel kontraksiyon, hücre motilitesi ve sitokinezisde önemli rol alan aktin aktivasyonlu miyozin ATPaz'ı indüklediği bilinmektedir. Rho veya Rho-kinazın aktif formu hücrelerde ortaya çıktığında, MLC'nin fosforilasyonunda artış ile birlikte stres liflerinin oluşumu, fokal adezyonlar ve düz kas kontraksiyonu gözlemlenmiştir³².

2.4.7.RhoA/Rho-kinaz'ın Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

Kas hücreleri dışında ROCK'lar birçok hücresel fonksiyonları Rho ikincil "downstream" etkileri ile düzenler. En önemlisi, ROCK'lar aktin-hücre iskeleti topluluğunu ve hücre kontraktilitesini kontrol ederek birçok fizyolojik olaya katılmaktadır. Şimdiye kadar ROCK 1 ve ROCK 2'nin farklı fonksiyonları olduğuna dair çok fazla bilgi yoktur fakat bazı durumlarda farklı regüle edebilmektedirler. Örneğin, apoptozis süresince sadece ROCK 1 bölünmektedir³⁸.

2.4.7.1.Kardiyovasküler Hastalıklar ve Rho-kinaz

Rho-kinazın fizyopatolojik olaylardaki rolleri, Y27632 gibi Rho-kinaz inhibitörleri kullanılarak değerlendirilmiştir¹³. Y27632 hipertansif sıçanlarda yüksek kan basıncını doza bağımlı olarak düşürmekte iken normal kan basıncı değerlerine herhangi bir etkiye bulunmamaktadır. Bu bulgu, Rho/Rho-kinaz aracılıklı Ca^{2+} duyarlılığına bağlı düz kas kontraksiyonunun hipertansiyona neden olabildiğini göstermiştir¹⁴.

Domuza ait spastik koroner arter modelinde Rho-kinaz yolağı ayrıntıları ile incelenmiştir. Bu modelde koroner arterin dış çeperi lokal olarak inflamasyonel lezyonu ve ardışık aterosklerotik modellemeyi indükleyen inflamatuvar sitokin, interlökin 1β (IL- 1β) ile muamele edilmiş. IL- 1β uygulanmış bölgede, Histamin, 5-HT ve trombosit aktive edici faktör (PAF) lokal olarak koroner spazm gibi koroner hiperkonstrüksiyona neden olmuştur. 5-HT ile indüklenmiş spastik bölgede, MLC fosforilasyonu artmıştır. Burada MLC fosforilasyonu ile oluşan vazokonstrüksiyon arasında pozitif bir ilişki vardır¹³.

Rho-kinaz'ın spesifik inhibitörü olan hidroksifasudil, 5-HT aracılıklı koroner hiperkontraksiyonu doza bağımlı olarak inhibe etmektedir. Spazmın bu inhibisyonuna, 5-HT aracılıklı MLC fosforilasyonu eşlik etmektedir. Bu sonuçlar, Rho-kinaz yolağı ile artan MLC fosforilasyonunun koroner arter spazmın patogenezinde çok önemli bir rol aldığını göstermektedir¹³.

MBS'nin Rho-kinaz ile Ser849/584 fosforilasyonunu ortaya çıkartan bir antikör kullanılarak yapılan bir çalışmada, MBS'nin fosforilasyonunun kontrol grubuna göre spastik lezyonlu koroner arter grubunda daha fazla olduğu ve fosforilasyonun oluşumu ile kontraksiyonun şiddeti arasında anlamlı bir ilişki olduğu gözlemlenmiş ve spastik lezyonlu bölgede ROK β mRNA ekspresyonunun anlamlı oranda arttığı görülmüştür. Rho-kinazın spastik lezyonlu bölgede upregüle olduğu ve bunun miyozin fosfataz aktivitesini MBS'nin fosforilasyonu üzerinden inhibe ederek hiperkontraksiyona neden olduğu önerilmiştir³⁹.

Bu bulgulardan yola çıkıldığı taktirde, Rho-kinaz insanlarda anormal düz kas kontraksiyonu kökenli bir çok hastalık için terapötik bir hedef olabilir. Ateroskleroz da hipertansiyon ve vazospazmın nedenlerine ortak olabilmektedir. Aterosklerozun patogenezi, neointimal formasyon ve patolojik vasküler remodelleme gibi histolojik değişimlere neden olan kronik proliferasyon, migrasyon ve makrofajların, düz kas hücrelerinin veya endotelial hücrelerin invazyonunu içermektedir¹³.

Şu anki kanıtlar, Rho-kinaz yolağının aterosklerotik lezyonların oluşmasında rol aldığını göstermektedir. Spesifik inhibitörler ile Rho-kinaz'ın inhibisyonu neointimal formasyonu inhibe etmektedir. Rho-kinazın, makrofajların ve düz kas hücrelerinin arterlerin dış çeperinden orta veya içe doğru invazyonu ve migrasyonunu düzenleyerek neointimal formasyonla ilgili olduğu görünmektedir¹³.

Shimokawa ve arkadaşları tarafından yapılan faz II çalışmada stabil efor anjinalı hastalarda hidroksifasudil uygulanmasından sonra fasudilin antianjinal etkisi araştırılmıştır. Faz IIa denemelerde 45 hastaya fasudil artan dozlarda (5-10-20mg) 2 hafta oral uygulanmıştır. Faz IIb denemelerde 125 hastaya fasudil artan dozlarda (5-10-20 ve 40mg) 4 hafta oral uygulanmış, yorucu egzersiz testi tedaviden önce ve sonra yapılmıştır. Fasudil tedavisinin, maksimum egzersiz testi tedaviden önce ve sonra yapılmıştır. Fasudil tedavisinin, maksimum egzersiz zamanını

uzattığı ve yorucu egzersiz testinde 1mm ST segment depresyonunun başlama zamanını önemli derecede geciktirdiği, egzersiz esnasında kalp hızı ve kan basıncını tedaviden önce ve sonra değiştirmedeği gözlemlenmiştir. Bir başka çalışmada vazospastik anjinalı hastalarda asetilkolin ile oluşan koroner vazospazmın fasudil ile önlendiği gösterilmiştir³³.

Bu çalışmaların sonucunda fasudil gibi Rho-kinaz inhibitörlerinin mikrovasküler anjinalı hastalarda terapötik önem taşıdığı ve stabil efor anjinalının tedavisi için yeni vazodilatör bir ilaç sınıfı olabileceği öne sürülmüştür³³.

2.4.7.2.Kanser Ve Rho-kinaz

Tümörlü ve tümörlü olmayan mesane örneklerinde westernblot tekniği ile Rho ve Rho-kinaz kantitasyonu yapılmıştır. Sonuçta artmış RhoA, RhoC ve Rho-kinaz üretiminin kas invazyonu, lenf nodu metastazı ve tümörün kötü yönde farklılaşması ile ilgili olduğu görülmüştür. Rho/Rho-kinaz yolağının mesane kanserinin oluşumu ve ilerlemesinde rolü olduğu ve prognostik marker olabileceği öne sürülmüştür³³.

Testiküler germ hücre tümörlü 57 Japon hastadan alınan örneklerde RhoA ve Rho-kinaz genlerinin mRNA seviyeleri analiz edilmiştir. RhoA ve Rho-kinaz mRNA'ları tümörlü dokuda tümörlü olmayan dokudan daha fazla bulunmuştur. Yüksek RhoA ve Rho-kinaz mRNA ekspresyonunun tümörün evresi ile ilgili olduğu, RhoA, Rho-kinaz yolunun testiküler germ hücreli tümörlerin ilerlemesinde rol oynadığı öne sürülmüştür⁴⁰.

2.4.7.3.Göz Hastalıkları Ve Rho-kinaz

İnsan lens epitelyum hücrelerinde Rho ve büyüme faktörlerinin ilişkisi araştırılmıştır. Aköz ve vitröz humordan kaynaklanan büyüme faktör ve hormonlar lens epitelyum hücrelerinin büyüme ve gelişmesini düzenler. Büyüme faktörlerinin etkisi; lens hücrelerinde aktin hücre iskelet yapısı üzerinde etkilidir. Büyüme faktörlerinin Rho-GTPaz aktivitesini stimüle ettiği gösterilmiştir. Rho/Rho-kinaz yolağının, büyüme faktörlerinin oluşturduğu hücre iskeleti reorganizasyonunda önemli downstream efektör olduğu ortaya konmuştur³³.

2.4.7.4.Obstetrik ve Rho-kinaz

İnsan gebe myometriumunda, ROCK 1 ve ROCK 2 izoformlarının arttığı gösterilmiştir. Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin oksitosinle oluşan kontraktıl aktiviteyi doza bağımlı olarak azalttığı ortaya konmuştur. Rho-kinaz inhibitörlerinin erken doğum tehdidinde yeni tokolitik ajan olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür^{41,33,2}.

Ark ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, normal ve preeklampitik insan plasentalarında ROCK 2 ekspresyonları incelenmiş. Çalışma sonucunda ROCK 2 enziminin preeklampitik plasentalarda arttığı ve aktif ROCK 2 enziminin ölçülebilir düzeyde olduğu gösterilmiştir².

2.4.7.5.Üriner Sistem ve Rho-kinaz

Rowland ve arkadaşları tarafından iyicil prostat hiperplazisinde (BPH) Rho-kinaz'ın rolü araştırılmıştır. BPH'de obstrüksiyon ile mekanik olarak üriner akım engellenir. BPH'de sadece prostatın genişlediği statik komponent ve düz kas tonusunun arttığı dinamik komponent olmak üzere iki komponenti vardır. Günümüzdeki tedavi prostat hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmek veya tonusunu azaltmaktır. Rowland ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada prostatik düz kas hücrelerinde Rho-kinaz inhibitörlerinin antiproliferatif ve gevşetici etkisinin olduğu gösterilmiştir. BPH tedavisinde Rho-kinaz inhibitörlerinin kullanılabileceği öne sürülmüştür⁴².

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Gereçler

3.1.1.Kullanılan Deney Hayvanları

Deneylerde, Wistar cinsi 250-300g ağırlığında, erkek fareler kullanılmıştır.

3.1.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Biotechnology)	Ouabain (Sigma)
	Sıvı nitrojen (MVE)
	Bisinkoninik asit (BCA) (Sigma)
	Siğır serum albumini (BSA) (Santa Cruz
	Parafin (Pechiney)
	SDS (Bio Rad)
	Sucrose (Amresco)
	Bromophenol Blue (Sigma)
	Betamerkaptoetanol (Sigma)
	Moleküler marker “ Chemiluminescent Blue Ranger® ”
(MM) (Pierce)	
	% 30 Acrylamide/Bis (Bio-Rad)
	Tris HCl buffer (pH: 6.8 - 0.5 M) (Bio-Rad)
	SDS (Bio-Rad)
	Ammonium per sulfate (Amresco)
	TEMED (Amresco)
	Tris (1.5 M, pH: 8.8) (Bio-Rad)
	APS (Amresco)
	Metanol (Carlo Erba)
	Nitrocellulose membran (Bio-Rad)
	PVDF membran (Bio-Rad)
	Süt tozu (ST) (Pınar)
	Antikor ROCK 1 (BD)
	Antikor ROCK 2 (BD)
	Anti Mouse (AM) (Pierce)
	ECL Advance (Pierce)
	X-Ray Film (Agfa)
	Developer (Kodak)
	Fixer (Kodak)

Ouabain gnlk olarak SF'te zlerek hazırlanmıştır ve ışıktan korunarak +4 °C'de saklanmıştır.

3.1.3.Kullanılan Aletler

Hassas terazi (Shimadzu)
Mikropipet (Eppendorf Research)
Vortex (Firlabo)
Jiletli Homojenizatr (IKA)
Supersonic Homojenizatör (SONICS)
Santrifüj (Nüve)
Su banyosu (Nüve)
Plate okuyucu (Platereader)
Çalkalayıcı (IKA)
Isıtıcı (FALC)
Elektroforez Tank (Bio Rad)
Elektroforez Tank (Invitrogen)
Semi Dry Tank Blot (Bio Rad)
Tank Blot (Bio Rad)

3.2.Yöntem

3.2.1.İn-vivo Kan Basıncı Ölçümü (Kuyruk Manşonu Yöntemi)

Ouabain 28 µg/kg dozda serum fizyolojikde çözünerek 6 hafta boyunca sıçanlara, hergün intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir^{43,44,45}.

Sıçanların kan basıncı ölçümünde, kuyruk manşonu yöntemi kullanılmıştır. Deney hayvanlarının sistolik kan basınçları 6 hafta boyunca haftada 2 kez kuyruklarından kuyruk manşonu yöntemi ile ölçülmüş ve değerlerin ortalaması alınmıştır.

3.2.2.Doku Homojenizasyonu ve Protein Miktar Tayini

Ouabain uygulanmış deney hayvanlarının ve kontrol gurubunun aort, kalp ve böbrekleri alınarak eppendorflara konulmuş ve deney gününe kadar –80 °C’de saklanmıştır.

Dokuları homojenize etmek için soğutucudan alınan dokular, buz aküsüne konulmuştur. Böbrekler petri kabında jilet ile önce küçük parçalara bölündükten sonra eppendorfa alınarak IKA marka bıçaklı homojenizatörde 2 dakika homojenize edilmiştir. Kalpler petri kabında jilet ile önce küçük parçalara bölündükten sonra eppendorfa alınarak IKA marka bıçaklı homojenizatörde 2 dakika homojenize edilmiştir. Aortun içerisinde sıvı nitrojen bulunan havana konularak havaneli ile sıvı nitrojen uçana kadar ezilmiştir.

Toz haline gelen aort homojenizasyon tamponu (160 µl) içeren eppendorfa alınarak SONICS marka supersonik homojenizatörde 2 kez 10’ar saniye homojenize edilmiştir. Kalp ve böbrekleri içeren eppendorflara 160 µl homojenizasyon tamponu eklendikten sonra aort içeren eppendorflarla birlikte önce vortekslenerek santrifüj cihazına konulmuştur. Bütün dokular santrifüj cihazında +4 °C’de, 10000 G’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra her bir eppendorftan süpernatantlar mikropipet aracılığı (150 µl) ile temiz eppendorflara aktarılmıştır.

Homojenize edilmiş dokulardaki proteinlerin miktar tayini için bisinkoninik asit (BCA) yöntemi kullanılmıştır⁵². Bu yöntem proteinlerin BCA ile tepkimeye girdiklerinde 562nm'de verdikleri absorbens değerlerinin bilinen standart protein konsantrasyonlarındaki absorbens değeri ile karşılaştırılarak hesaplanmasına dayanmaktadır.

Dokular plaka konulmadan önce her dokunun konulacak hacimlerini ve kontrol için kullanılacak proteinin hacimlerini gösteren tablo (Tablo 2) hazırlanmıştır. Tabloya göre belirlenmiş hacimlerde plak içindeki bölümlere d.H₂O, sıgır albumini (BSA) ve doku homojenatları konmuştur. Böbrekler 1/20 oranda distile su ile dilüe edildikten sonra, kalpler 1/30 oranında dilüe edildikten sonra plate'e yerleştirilmiştir. Plate'de bulunan her bölüm distile su ile 20µl'ye tamamlandıktan sonra her bölüme 200µl BCA (1/50 oranında %4 CuSO₄ ile dilüe edilmiş) eklenmiştir.

Plak tamamen dolduktan sonra, plağın üzeri parafin ile kapatılarak 5 dakika boyunca dakikada 50 hızda çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Çalkalamanın ardından plak, daha önceden 37 °C sıcaklığa getirilmiş su banyosunda bekletilmiştir.

Su banyosunun ardından plak, plak okuyucuya yerleştirilerek 562nm'de ölçüm yapılmıştır. Ölçülen absorbens değerleri hesaplanarak, her bir plate hücrelerinde bulunan protein miktarları (µg) bulunmuştur. Plak hücrelerindeki protein miktarını gösteren bu değer kullanarak ependorflarda bulunan ana numunedeki protein miktarı aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$M_e = d \times (M_o / V_p)$$

M_e: Ependorfta bulunan protein miktarı

V_p: Plak konan hacim

M_o: Ölçülen protein miktarı (µg)

d: Dilüe oranı

3.2.3. Immunoelktroblotlama (Immunoelctroblotting)

Immunoelktroblotlama_yöntemi 3 temel basamaktan oluşmaktadır. İlk aşamada proteinler, elektrik akımı ile poliakrilamid jelde molekül ağırlıklarına göre farklı hızlarda sürüklenirler. İkinci aşamada, sürüklenen bu proteinler yine elektrik akımı ile jel üzerinden membran yüzeyine aktarılırlar. Son aşamada ise analiz edilmek istenen proteine spesifik birincil antikor analiz edilmek istenen proteine ve kemilüminesans madde ile ışık veren ikincil antikor birincil antikora bağlanarak karanlık odada x-ray filmde oluşturduğu görüntüden istenilen protein analiz edilmektedir.

Örnek içindeki protein miktarlarına göre, en az protein içeren örnek göz önüne alınarak immunotransblotting yönteminde jele konacak örneklerin hacimleri hesaplanır. Bu hesaplamada amaç çukurların kapasitesini aşmadan her hücreye eşit miktarda proteini koyabilmektir. Bu hesaplama yapılırken jel hücrelerine örneklerin 1:2 oranında örnek tampon ile karıştırılarak konacağı göz önüne alınarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$M_j = M_e \times K \times V_j$$

M_e : Ependorfta bulunan protein miktarı (μg)

K : Örnek ve örnek tampon karışma oranı

V_j : Jel hücresinin hacmi (μl)

M_j : Jele konacak ortak protein miktarı (μg)

Jele konması gereken protein miktarı bulunduğundan sonra, her jel hücrelerine alınacak örneklerin hacimleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\ddot{O}_j = M_j / M_e$$

$\ddot{O}_j$: Örnekten alınması gereken hacim (μl)

M_j : Jele konacak ortak protein miktarı (μg)

M_e : Ependorfta bulunan protein miktarı (μg)

Çeker ocakta, 1 μl betamerkapto-etanol / 110 μl örnek tampon karışımı (1 kısım) ile ependorflarda bulunan homojenatlar (2k, 150–120 μl arasında) yeni ependorflarda karıştırılmıştır (Kalp, 5:1; böbrek, 7:1; aort, 1:1 oranlarında). Ependorflar 5 dakika süresince 90°C'de

ısıtıcıda bekletilmiştir. Hesaplanan değerlere göre jeldeki her çukura aynı miktarda protein gelecek şekilde ependorflardaki örnekler jele yüklenmiştir.

Jeller elektroforez için running buffer içeren tanka (Bio Rad) konularak, proteinler alt jele gelene kadar 20 Volt, alt jele geldikten sonra ise 200 Volt'ta jelin en altına sürüklenene kadar elektroforeze devam edilmiştir.

Elektroforezin ardından jelde sürüklenerek moleköl ağırlıklarına göre dizilen proteinleri membrana aktarmak için (aort için PVDF membran, kalp ve böbrek için nitroselüloz membran) jeller tanka konur. Böbrek ve aort için, transblot solüsyonu içeren (%20 metanol içeren running buffer) tankta (Invitrogen) blotlama yapılmıştır. Böbrek için 50 Volt, 336 mA'de 1 saat, aort için ise 49 Volt, 345 mA'de 1 saat bolotlama yapılmıştır. Kalp için ise birinci jel semi dry blot (Bio Rad) ile transblot solüsyonu varlığında 20 Volt'da 1 saat, ikinci jel tank blot ile 30 Volt 350 mA'de 1 saat blotlama yapılmıştır.

Blotlama ardından membranlar TBS-T ile kısaca yıkanmıştır. Ardından membranlar % 5 süt tozu içeren TBS-T ile çalkalayıcıda bloklama yapılmıştır. Bloklamanın ardından membranlar ayrı ayrı ilk önce primer antikor ile (% 5 süt tozu içeren TBS-T ile 1/200 – 1/500 oranlarında ROCK 1, ROCK 2) 2,5 saat çalkalayıcı üzerinde çalkalanmıştır. Primer antikoran ardından membranlar, sekonder antikor (Anti Mouse) ile 1 saat çalkalanmıştır (Sekonder antikor AM %5 süt tozu içeren TBS-T ile 1/1000 oranında hazırlanmıştır). Sekonder antikordan sonra 3 kez 5'er dakika TBS-T ile membranlar yıkanmıştır. Bu şekilde, analiz etmek istediğimiz proteine spesifik olan primer antikor proteine bağlanmakta, ve kemilüminesans madde ile ışık veren sekonder antikor da primer antikora bağlanmaktadır.

ECL+Advance, 1:1 oranında karıştırılarak kemilüminesans madde hazırlanmış ve membran 10 dakika süresince karanlık ortamda yıkanmıştır. Kemilüminesans madde ile yıkanan membranın filmi karanlık odada x-ray film ile çekilerek elektroforez ile moleköl ağırlığına göre sürüklenmiş proteinin x-ray filmde oluşturduğu görüntü moleküler marker'ların oluşturduğu görüntü ile karşılaştırılmıştır. X-ray filmdeki görüntülerden Scion Image (v 4.0.2) programı ile bantların optik dansiteleri ($AU\ cm^{-1}$ "Absorbans ünitesi") belirlenmiştir.

3.2.4. İstatistiksel Analiz

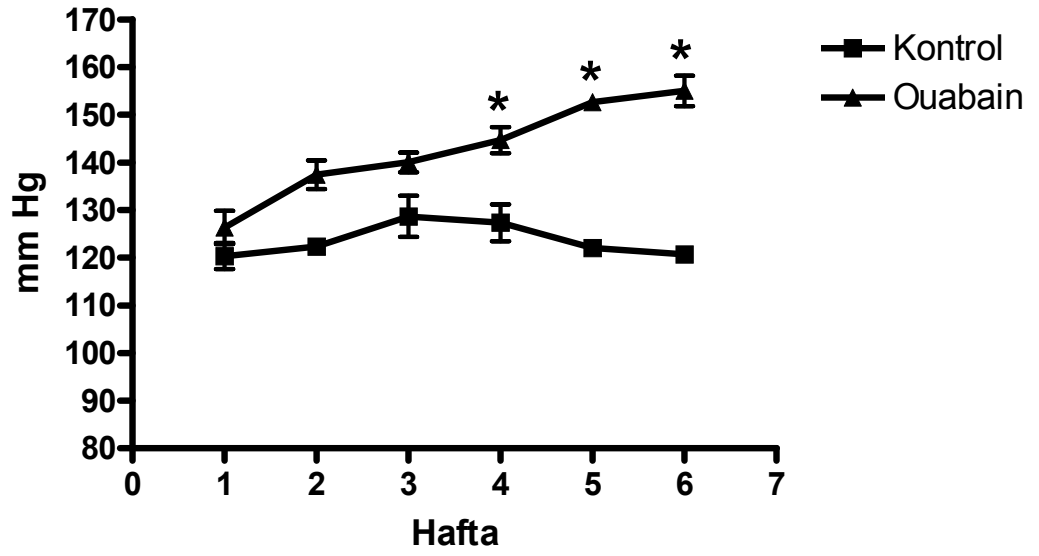
Kontrol ve ouabain uygulanmış deney hayvanlarında tespit edilen sistolik kan basınçları, ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası şeklinde ifade edilmiştir.

Sistolik kan basıncı ölçümü ve dokulardaki rho-kinaz enzim ekspresyonunun ölçümünde tek yönlü Varyans (ANOVA) analizi ile Student ortalamalar arası “unpaired” t testi kullanılmıştır. $P < 0,05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1.Ouabain İle İndüklenen Hipertansiyon

6 hafta boyunca hergün 28 µg/kg ouabain uygulanan sıçanlarda ve SF uygulanan kontrol grubunda haftada iki defa kuyruk manşonu yöntemi ile sistolik kan basınçları ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları grafik 1’de gösterilmiştir. Ölçüm sonucu ouabain uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna göre sistolik kan basıncında artış görülmüştür. 6 hafta sonunda kontrol grubundaki sistolik kan basıncı $120,667 \pm 0,882$ n=6 iken, ouabain uygulanan grupta bu değer $155 \pm 3,184$ n=9 çıkmıştır. Ouabain uygulamasına bağlı kan basıncındaki artış 4. haftadan itibaren anlamlılık kazanmıştır.

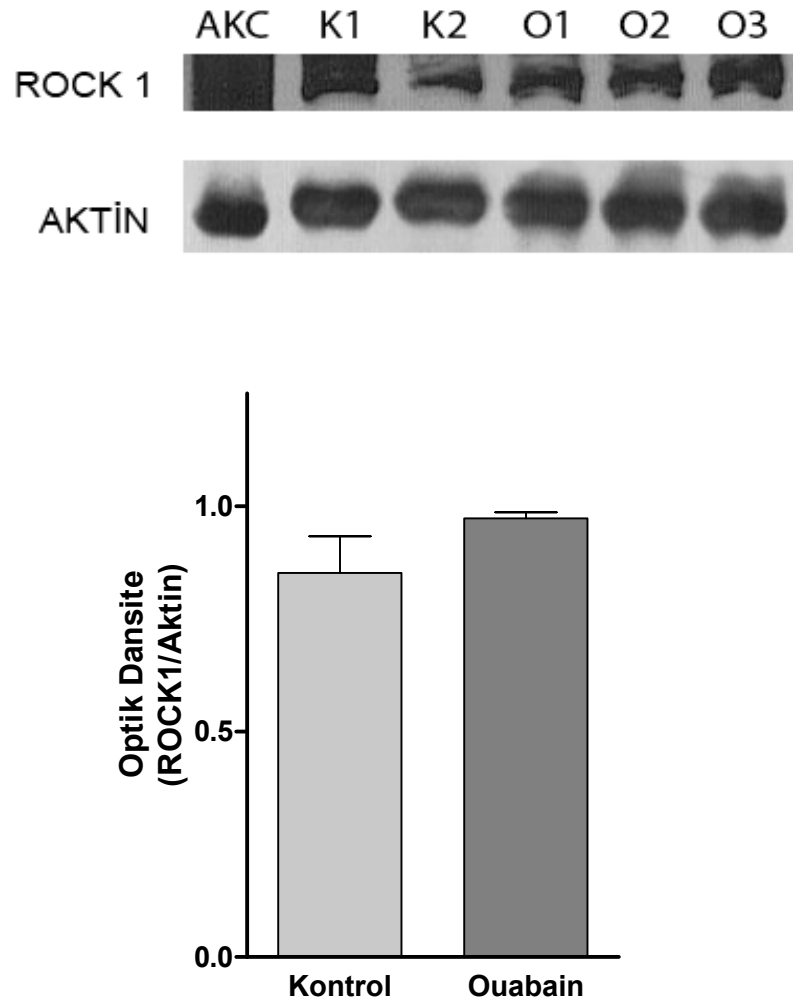


Grafik 1: Kontrol ve ouabain uygulanan sıçanlardaki kuyruk manşonu yöntemi ile elde edilen haftalık ortalama sistolik kan basıncı grafiği. * Ouabain uygulanmış ve uygulanmamış gruplar arasında anlamlı farklılık ($p < 0,05$).

4.2.Aort, Böbrek ve Kalpteki ROCK Ekspresyonları

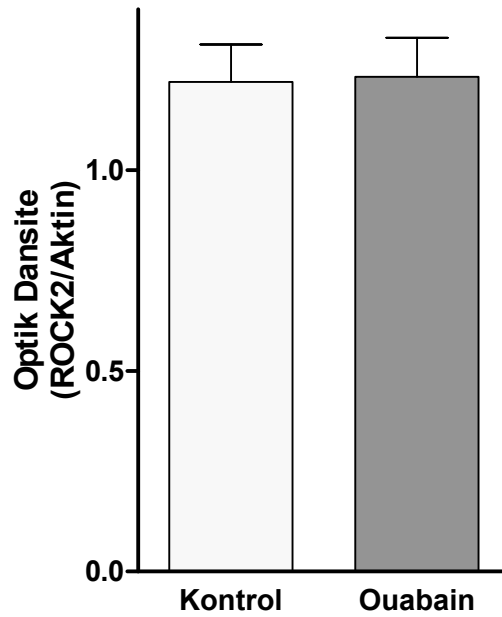
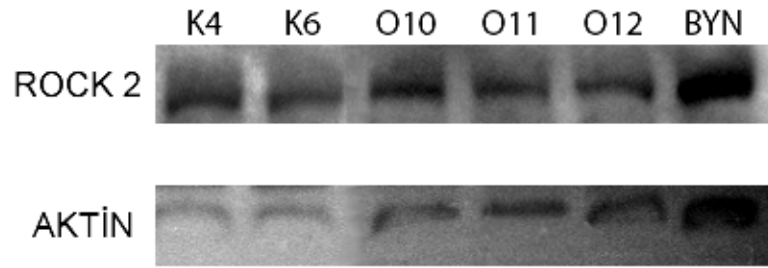
4.2.1.Aort Dokusundaki ROCK Ekspresyonu

Kontrol grubundan alınan aort dokularındaki ROCK1'e ait optik dansite değeri $0,85 \pm 0,08$ $n=4$ bulunmuştur. Ouabain uygulanmış sıçanlardan alınan aorta dokularındaki ROCK1'e ait optik dansite değeri $0,97 \pm 0,01$ $n=3$ bulunmuştur. Kontrol grubu ile ouabain uygulanmış gruplardan alınan aort dokularındaki ROCK1'e ait optik dansite arasındaki fark istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmamıştır (Şekil 8).



Şekil 8: Ouabain uygulanmış ve kontrol grubu sıçanların aorta dokularındaki ROCK1 ekspresyonu.

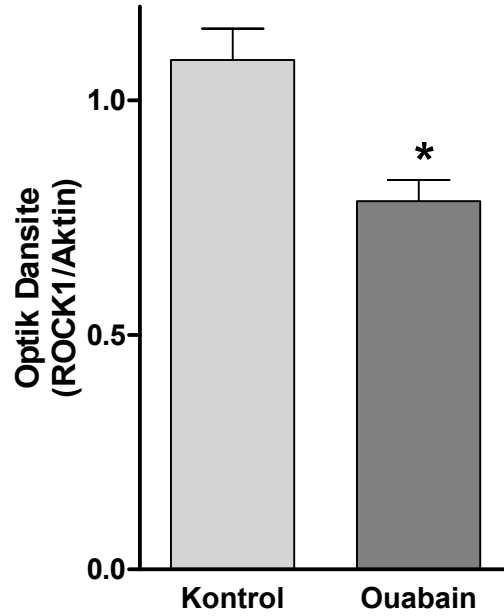
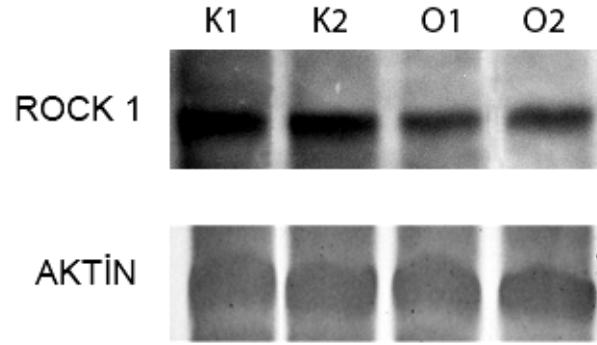
Kontrol grubundan alınan aort dokularındaki ROCK2'ye ait optik dansite değeri $1,22 \pm 0,09$ $n=3$ bulunmuştur. Ouabain uygulanmış sıçanlardan alınan aort dokularındaki ROCK2'ye ait optik dansite değeri $1,23 \pm 0,09$ $n=5$ bulunmuştur. Kontrol grubu ile ouabain uygulanmış gruplardan alınan aort dokularındaki ROCK2'ye ait optik dansite arasındaki fark istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmamıştır (Şekil 9).



Şekil 9: Ouabain uygulanmış ve kontrol grubu sıçanların aorta dokularındaki ROCK2 ekspresyonu.

4.2.2.Böbrek Dokusundaki ROCK Ekspresyonu

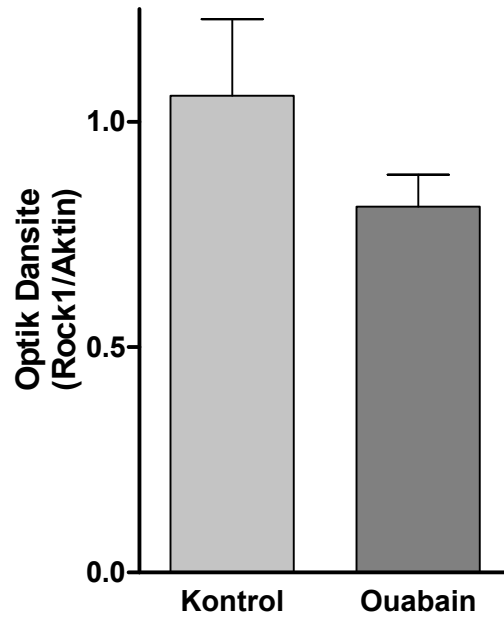
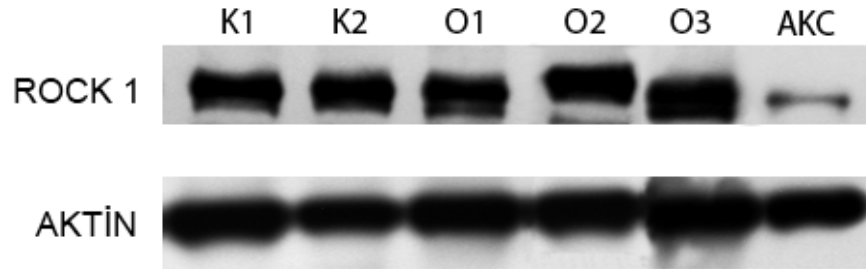
Kontrol grubundan alınan böbrek dokularındaki ROCK1'e ait optik dansite değeri $1,08 \pm 0,06$ $n=3$ bulunmuştur. Ouabain uygulanmış sıçanlardan alınan böbrek dokularındaki ROCK1'e ait optik dansite değeri $0,78 \pm 0,04$ $n=6$ bulunmuştur. Kontrol grubu ile ouabain uygulanmış gruplardan alınan böbrek dokularındaki ROCK1'e ait optik dansite arasındaki fark istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmuştur (Şekil 10). Bu sonuçlar böbrekteki ROCK1 ekspresyonunun ouabain uygulanan grupta kontrole göre daha düşük olduğunu göstermiştir.



Şekil 10: Ouabain uygulanmış ve kontrol grubu sıçanların böbrek dokularındaki ROCK1 ekspresyonu.

4.2.3.Kalp Dokusundaki ROCK Ekspresyonu

Kontrol grubundan alınan kalp dokularındaki ROCK1'e ait optik dansite değeri $1,05 \pm 0,17$ $n=4$ bulunmuştur. Ouabain uygulanmış sıçanlardan alınan kalp dokularındaki ROCK1'e ait optik dansite değeri $0,81 \pm 0,07$ $n=5$ bulunmuştur. Kontrol grubu ile ouabain uygulanmış gruplardan alınan kalp dokularındaki ROCK1'e ait optik dansite arasındaki fark istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmamıştır (Şekil 11).



Şekil 11: Ouabain uygulanmış ve kontrol grubu sıçanların kalp dokularındaki ROCK1 ekspresyonu.

5.TARTIŞMA

Esansiyel hipertansiyonun etiyolojisinde ouabainin önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Ouabainin bu etkisini Na^+K^+ ATPaz'ı inhibe ederek oluşturduğu düşünülmektedir^{4,7}. Ancak çalışmalar ouabainin farklı mekanizmalarla da hipertansiyon etiyopatogenezine katkıda bulunabileceğini göstermiştir^{4,46}. Rho-kinaz enzimi miyozin fosfatazı inaktive ederek düz kas kasılmasına neden olan miyozin hafif zincirin fosforilasyonuna neden olmakta ve düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlılığını düzenlemektedir^{10,11,47}. Mukai ve arkadaşları, Rho-kinaz'ın aktivasyonunun hipertansiyonun gelişiminden sorumlu olduğunu göstermişler⁴⁷. Bu nedenle biz hem ouabainin hem de Rho-kinaz'ın rolünü incelemek için, ouabain ile indüklenen hipertansiyonda RhoA/Rho-kinaz'ın rolü olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Yaptığımız çalışmada, ouabain ile hipertansiyon oluşturulan sıçanların kalp, aort ve böbreklerdeki rho-kinaz ekspresyonundaki değişiklikleri inceledik.

Western Blot yöntemi ile yapılan deneylerin sonucunda aort ve kalp dokularında ROCK enzim ekspresyonlarında kontrol grubuna göre bir değişiklik gözlemlenmezken, böbrek dokularında kontrol grubuna göre ROCK enzim ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir.

Farklı hipertansiyon modellerinde aort ve kalp dokularında Rho-kinaz ekspresyonlarında artış gözlemlenmiştir⁴⁹. Ancak bizim yaptığımız çalışmada ouabain ile indüklenen hipertansiyonda aort ve kalpteki rho-kinaz ekspresyonlarında herhangi bir farklılık belirleyemedik. Rho-kinaz ekspresyonu ouabain ile indüklenen hipertansiyonda aortta değişmemesine rağmen hipertansiyonda önemli olabilecek mezenterik yataklarda ve/veya renal arterlerde değişmiş olabilir.

Diğer taraftan, aorttaki ROCK ekspresyonu değişmemiş olmasına rağmen aktivasyonlarında bir değişiklik olması olasıdır. Bunun için, izole organlarda fonksiyonel çalışmaların ve MYPT fosforilasyonunun incelenmesi gerekmektedir. Ancak bu tez kapsamındaki çalışmalarda bu deneyler gerçekleştirilmemiştir.

Ouabain ile indüklenen hipertansif sıçanların böbrek dokularında, kontrol grubuna göre Rho-kinaz ekspresyonunun düştüğünü

gözlemledik. ROCK ekspresyonunun düşmüş olmasının nedeni hipertansiyonu kompanse etmek için olabilir.

Rho A'nın aktif formunun renal epitel hücre kültüründe, hücre içine enjeksiyonu sonucunda, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enziminin sitozolden membrana yer değiştirdiği gözlemlenmiştir⁵⁰. Bazolateral membranlardaki $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz düzeyinin artması da indirekt olarak vücuda Na^+ 'un geri kazandırılmasına aracılık edebilir. Bu da intravasküler Na^+ miktarını artırarak hipertansiyona neden olabilecek bir mekanizma olabilir.

Ouabain ile indüklenen hipertansiyonda böbrek ROCK ekspresyonundaki azalma, belki de bu hipertansif etkinliği kompanse edebilmek amacı ile gelişmiş olabilir.

Yüksek tuz diyeti ile beslenerek hipertansiyon oluşturulan sıçanlara Rho-kinaz inhibitörü olan fasudil uygulanması ile 7 hafta sonunda aktive olmuş renin-anjiyotensin II sistemine etki etmeden, azalan böbrek fonksiyonlarında artış gözlemlenmiştir ve artmış kan basıncında herhangi bir düşme gözlemlenmemiştir⁵¹. Yüksek tuz diyeti ile hipertansiyon oluşturulan sıçanların böbrek dokularında Rho-kinaz mRNA ekspresyonundaki artış gözlemlenirken Rho-kinaz seviyelerinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Rho-kinaz inhibitörü olan fasudilin uygulanması ile Rho-kinaz mRNA seviyesinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu da ouabain uygulanmış sıçanlarda hipertansiyonun oluşmasında farklı yolların rol alabileceğini düşündürmektedir.

Nishikimi ve arkadaşları "Dahl salt sensitive" sıçanlarda ROCK 1 ve ROCK 2 mRNA düzeylerinin arttığını göstermişlerdir⁴⁹. Bizim çalışmamızda ROCK 1 ekspresyonları böbrek dokularında azalmıştır. Bunun bir nedeni farklı hipertansiyon modellerindeki ROCK ekspresyonlarının farklı şekilde değişiyor olması olabilir. Diğer taraftan Nishikimi ve arkadaşlarının çalışmasında sadece mRNA düzeyleri incelenmiş, protein ekspresyonlarına bakılmamıştır. Dolayısı ile mRNA ve protein ekspresyonlarının bu hipertansiyon modelinde de farklı gelişmesi olasıdır.

6.SONUÇ

Ouabain ile indüklenen hipertansif sıçanların aort, böbrek ve kalp dokularındaki Rho-kinaz ekspresyonları, kontrol grubu sıçanların aort, böbrek ve kalp dokularındakiler ile karşılaştırılmıştır.

Miyozin hafif zincir fosfatazı inhibe ederek düz kas kontraksiyonundan sorumlu olan Rho-kinaz'ın ekspresyonu, aort ve kalp dokularında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir anlam ifade edecek şekilde değişiklik göstermemiştir. Bu bulgu bize ouabain ile indüklenen hipertansiyonda düz kas kontraksiyonunda Rho-kinaz yolağından farklı yolların da etkili rol alabileceğini ve Rho-kinaz ekspresyonunda artma olmamasına rağmen aktivitesinde bir artış olabileceğini düşündürmüştür.

Ouabain ile indüklenen hipertansif sıçanların böbrek dokularındaki Rho-kinaz ekspresyonunda, kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu bulunmuştur. Bu azalma Na^+ - K^+ ATPaz enziminin sitozolden membrana yer değiştirmesi ile veya daha farklı mekanizmalarla oluşan hipertansif etkinliği kompanse edebilmek amacı ile gelişmiş olabilir.

Bulgularımız bize ouabain aracılıklı hipertansiyonda Rho/rho-kinaz yolağının rolünün daha detaylı olarak incelenmesinin gerekli olduğunu göstermektedir. Özellikle diğer damar yataklarında ve böbreklerde Rho/ROCK ekspresyon ve aktivitelerinin incelenmesi sonucu ouabain-hipertansiyon arasındaki ilişkinin daha iyi bir şekilde ortaya konulması sağlanabilir.

7.ÖZET

Kronik ouabain uygulanmış sıçanların damar, böbrek ve kalp dokularında rho-kinaz enzim ekspresyonlarının incelenmesi

Ouabain ile indüklenen hipertansif sıçanların aort, böbrek ve kalp dokularındaki Rho-kinaz ekspresyonlarındaki olası değişikliklerin incelenmesi için, normal ve hipertansif hayvanların bu dokularındaki rho-kinaz düzeyleri karşılaştırıldı.

Sıçanlara 6 hafta boyunca hergün 28 µg/kg ouabain enjekte edildi. Ouabain tedavisi ardından, aort, böbrek ve kalp dokuları alınarak homojenize edildi. Dokulardaki rho-kinaz ekspresyonu Western Blot yöntemi ile incelendi.

Kontrol ile hipertansif hayvanlar arasında, aort ve kalp dokularındaki rho-kinaz ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Fakat, normal tansiyonlu sıçanların böbrek dokuları ile karşılaştırıldığında, hipertansif sıçanların böbrek dokusundaki rho-kinaz ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Böbrek dokusundaki ROCK 1 ekspresyonu, ouabain aracılıklı hipertansiyonun etkilerini kompanse edebilmek için düşmüş olabilir.

Normal ve hipertansif sıçanların aort ve kalp dokularındaki rho-kinaz ekspresyonunda bir değişiklik olmamasına rağmen, bu dokularda rho-kinaz aktivitesinde bir artış olmuş olabilir. Fakat biz bu enzimin aktivitesini çalışmamızda incelemedik.

Ouabain aracılıklı hipertansiyonda rho-kinazların tam rolünü açıklayabilmek için, hipertansiyonda önemli olan özellikle böbrek, renal ve mezenterik arterlerde daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ouabain, rho-kinaz, Na⁺K⁺ ATPaz, ouabain-aracılıklı hipertansiyon.

8.SUMMARY

Investigation of rho-kinase expression in the kidney, heart and blood vessel tissues of chronic ouabain treated rats.

To investigate the possible expression changes of rho-kinases in the blood vessel, kidney and heart tissues of ouabain-induced hypertensive rats, we compared the levels of rho-kinases between those tissues of normotensive and hypertensive animals.

Ouabain were injected to rats 28 µg/kg per day for 6 weeks. After ouabain treatment, aorta, kidney and heart tissues were collected and homogenised. Rho-kinase expression of the tissues were evaluated by Western Blotting.

We did not find significantly change of rho-kinase expression between the aorta and heart tissues of control and hypertensive animals. But rho-kinase expressions significantly reduced in the hypertensive kidney tissues when compared to normotensive group. Kidney ROCK1 expressions may be decreased to compensate the effects of ouabain-induced hypertension.

Although the rho-kinase expressions between control and hypertensive animals on the heart and aorta didn't change, there may be an increased activity of rho-kinase in those tissues. However we did not evaluate the activity of the enzyme.

To explain the exact role of rho-kinases in the ouabain induced hypertension, further studies are needed particularly in the kidney, renal and mesenteric arteries important in the hypertension.

Keywords: Ouabain, rho-kinase, Na^+K^+ ATPase, ouabain-induced hypertension.

9.KAYNAKLAR

1: Brown MJ. The causes of essential hypertension. Br J Clin Pharmacol 1996; 42 : 21-27.

2: Ark M, Yılmaz N, Yazıcı G, Kubata H, Aktaş S. Rho -associated protein kinase II (rock II) expression in normal and preeclamptic human placentas. Placenta 2005; 26 : 81-84.

3: Zoghi M, Nalbantgil İ. Hipertansiyon ve Endotel Fonksiyon Bozukluğu. Ana Kar Der 2002; 2 : 142-147.

4: Ferrari P, Ferrandi M, Torielli L, Tripodi G, Melloni P, Bianchi G. PST 2238: A New Antihypertensive Compound that Modulates Na⁺,K⁺-ATPase and Antagonizes the Pressor Effect of OLF. Cardiovascular Drug Reviews 1999; 17(1) : 39-57 .

5: Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. Annu Rev Physiol 2003; 65 : 817-849.

6: Xie Z, Cai T. Na⁺-K⁺-ATPase-Mediated Signal Transduction: From Protein Interaction to Cellular Function. Molecular Interventions 2003; 3(3) : 157-168.

7: Aperia A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. Journal of Internal Medicine 2007; 261 : 44-52 .

8: Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous cardiac glycosides: hormones using the sodium pump as signal transducer. Semin Nephrol 2005; 25 : 343-51.

9: Calo LA, Pessina AC. RhoA/Rho-kinase pathway: much more than just a modulation of vascular tone. Evidence from studies in humans. Journal of Hypertension 2007; 25 : 259-264.

- 10: Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996; 273 : 245-248.
- 11: Ark M, Kubat H, Yılmaz N. Küçük GTP bağlayıcı proteinler. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi* 2003; 2 : 161-168.
- 12: Cleber E, Teixeira R, Clinton W. Targeting the vascular RhoA-Rho-kinase signaling pathway in hypertension. *Drug Discovery Today Therapeutic Strategies* 2005; 3 : 193-199.
- 13: Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho–Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2001; 22(1) : 32-39.
- 14: Uehata M, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997; 389 : 990-994.
- 15: Johnson RJ, Segal MS, Srinivas T, Ejaz A, Mu W, Roncal C, et al. Essential Hypertension, Progressive Renal Disease, and Uric Acid: A Pathogenetic Link? *J Am Soc Nephrol* 2005; 16 : 1909-1919.
- 16: Segura J, Campo C, Ruilope LM. Chronic kidney disease and global cardiovascular risk in essential hypertension. *Minerva Med* 2004; 95 : 375-383.
- 17: Berkin KE, Ball SG. Essential hypertension: the heart and hypertension. *Heart* 2001; 86 : 467-475.
- 18: Excerpta Medica International. Na⁺-K⁺ ATPase and Related ATPase. Amsterdam: Elsevier; 2000.

19: Skou JC. The identification of the sodium pump. *Biosci Rep* 2004; 24 : 436-51.

20: Scheiner BG, Schoner W. A fresh facet for ouabain action. *Nat Med* 2001; 1288 : 7-9.

21: Aizman O, Uhle'n P, Lal M, Brismar H, Aperia A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98 : 13420-13424.

22: Schoner W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *Eur J Biochem* 2002; 269 : 2440-2448.

23: Skou JC. The influence of some cations on an adenosinetriphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 1957; 23 : 394-401.

24: Schoner W. Endogenous cardiogenic steroids. *Cell Mol Biol* 2001; 47: 273-280.

25: Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *Am J Physiol* 1993; 264(33) : 1367-1387.

26: Hamlyn JM, Lu Z, Manunta P, Ludens JH, Kimura K, Shah JR, Laredo J, Hamilton JP, Hamilton MJ, Hamilton BP. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. *Clin Exp Hypertens* 1998; 20 : 523-533.

27: Gottlieb S, Rogowski AC, Weinberg M, Krichten CM, Hamilton BC, Hamlyn JM. Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1992; 86 : 420-425.

28: Hasegawa T, Masugi F, Ogihara T, Humahara Y. Increase in plasma ouabainlike inhibitor of Na^{+},K^{+} -ATPase with high sodium intake in patients with essential hypertension. *J Clin Hypertens* 1987; 3 : 419-429.

29: Manunta P, Rogowski AC, Hamilton BP, Hamlyn JM. Ouabain-induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure. *J Hypertens* 1994; 12: 549-560.

30: Manunta P, Stella P, Rivera R, Ciurlino D, Cusi D, Ferrandi M, et al. Left ventricular mass, stroke volume, and ouabain-like factor in essential hypertension. *Hypertension* 1999; 34 : 450-456.

31: Iwamoto T, Kita S. Topics on the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger: Role of Vascular NCX1 in Salt-Dependent Hypertension. *J Pharmacol Sci* 2006; 102 : 32-36.

32: Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and Functions of Rho-Associated Kinase. *Experimental Cell Research* 2000; 261 : 44-51.

33: Kubat H, Ark M. İnsanda Rho-kinazın rolü. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2005; 2 : 153-159.

34: Bhattacharya M, Babwah AV, Ferguson SSG. Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochemical Society Transactions* 2004; 32(6) : 1040-1044.

35: Barandier C, Ming XF, Yang Z. Small G Proteins as Novel Therapeutic Targets in Cardiovascular Medicine. *News Physiol Sci* 2003; 18 : 18-22.

36: Gong MC, Iizuka K, Nixon G, et al. Role of guanine nucleotide binding proteins –ras- family of trimeric proteins or both Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93 : 1340-1345.

37: Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* 1995; 270 : 29051-29054.

38: Riento K, Ridley AJ. Kinases in cell behaviour. *Nature* 2003; 4 : 446-456.

39: Kandabashi T, et al. Inhibition of myosin phosphatase by upregulated Rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1 β . *Circulation* 2000; 101 : 1319-1323.

40: Kamai T, Arai K, Sumi S, Tsuji T, Honda M, Yamanashi T, Yoshida KI. The rho/rho-kinase pathway is involved in the progression of testicular germ cell tumour. *BJU Int* 2002; 89 : 445-449.

41: Moran CJ, Friel AM, Smith TJ, Cairns M, Morrison JJ. Expression and modulation of rho-kinase in human pregnant myometrium. *Molecular Human Reproduction* 2002; 8 : 196-200.

42: Rees RW, Foxwell NA, Ralph DJ, Kel PD, Moncada S, Celletti S. Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, inhibits proliferation and adrenergic contraction of psoriatic smooth muscle cells. *J Urol* 2003; 170 : 2517-2522.

43: Rossoni LV, Xavier FE, Moreira CM, Falcochio D, Amanso AM, Tanoue CU, Carvalho CRO, Vassallo DV. Ouabain-induced hypertension enhances left ventricular contractility in rats. *Life Sciences* 2006; 79 : 1537-1545.

44: Briones AM, Xavier FE, Arribas SM, Gonzalez MC, Rossoni LV, Alonso MJ, Salas M. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291 : 193-201.

45: Kent MAH, Huang BS, Huysse JVV, Leenen FHH. Brain Na⁺,K⁺-ATPase isozyme activity and protein expression in ouabain-induced hypertension. *Brain research* 2004; 1018 : 171-180.

46: Nishikimi T, Matsuoka H. Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies of Chronic Renal Injury: Renoprotective Effect of Rho-Kinase Inhibitor in Hypertensive Glomerulosclerosis. *Journal of Pharmacological Sciences* 2006; 100 : 22-28.

47: Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290 : 661-668.

48: Lai A, Frishman WH. Rho-kinase inhibition in the therapy of cardiovascular disease. *Cardiology in review* 2005; 13(6) : 285-292.

49: Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Letters* 1996; 392 : 189-193.

50: Maeda A, Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Translocation of Na⁺,K⁺-ATPase is induced by Rho small GTPase in renal epithelial cells. *BBRC* 2002; 297 : 1231-1237.

51: Nishikimi T, Akimoto T, Wang X, Mori Y, Tadokoro K, Ishikawa Y, Shimokawa H, Ono H, Matsuoka H. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates glomerulosclerosis in Dahl salt-sensitive rats. *Journal of hypertension* 2004; 22 : 1787-1796.

52: Krieg R.C, Dong Y, Schwamborn K, Knuechel R. Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS PAGE. *Journal of biochemical and biophysical methods* 2005; 65 : 13-19.

10.ÖZGEÇMİŞ

Adı	Gürkan
Soyadı	GÖZÜBÜYÜK
Doğum Yeri ve Tarihi	Gölbaşı 13.08.1977

Eğitimi

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 1995-2003
Sakarya Anadolu Lisesi 1988-1995
Namık Kemal İlkokulu 1983-1988

Yabancı Dili

İngilizce

1977 yılında Adıyaman'da doğdum. 1995 yılında yüksek öğrenimime başladığım Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden 2003 yılında mezun oldum. Liseyi Sakarya Anadolu Lisesi'nde, Ortaokulu Bolu İzzet Baysan Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 3 sene eczane eczacılığı yaptım.