

.T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SAĞLIKLI GEBELERDEN ELDE EDİLEN
ERİTROSİTLERİN ATP ARACILI GEVŞEME
YANITLARINA OLASI ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Ece KILAVUZ

Yüksek Lisans Tezi

2023-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SAĞLIKLI GEBELERDEN ELDE EDİLEN ERİTROSİTLERİN ATP ARACILI
GEVŞEME YANITLARINA OLASI ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Ece KILAVUZ

Yüksek Lisans Tezi

DANIŞMAN

Doç. Dr. Pınar Ülker

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2020-5346 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2023-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı Fizyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Pınar ÜLKER
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Filiz BASRALI
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Nazmi YARAŞ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Selma Arzu VARDAR
Trakya Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Ece KILAVUZ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Pınar ÜLKER

TEŐEKKÖR

Lisansüstü eğitimim ve tez çalışmalarım süresince üstün bilgi birikimlerini ve deneyimlerini benden esirgemeyen Danışman hocam Doç. Dr. Pınar ÜLKER'e yine lisansüstü eğitimim esnasında tüm katkılarından dolayı başta Prof. Dr. Filiz BASRALI olmak üzere Anabilim Dalımızın değerli Hocalarına, çalışma arkadaşlarım Dr. Nur ÖZEN, Ahmet YILDIRIM ve Arş. Gör. Leyla ABUEİD'e, vermiş oldukları desteklerden dolayı Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün çalışanlarına ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim kıymetli ailem Havva-Nihat-Selen ve Selin KILAVUZ'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Amaç:Eritrositlerde yapısal ve NO üretim kapasitesi bakımından endotel hücrelerindeki benzer aktif eNOS enzimi bulunmaktadır. Eritrositlerdeki eNOS enziminin ATP ile aktifleştiği gösterilmiştir. Fakat bu enzimin ATP aracılı vazodilatasyon yanıtında fonksiyonel önemi bilinmemektedir. Çalışmanın amacı eritrosit eNOS enziminin ATP'ye cevaben gelişen vazodilatasyon yanıtının fonksiyonel önemi ve gebelik koşullarında eritrosit eNOS enziminin rolünün araştırılmasıdır.

Yöntem:30 adet Wistar sıçandan elde edilen aort halkaları organ banyosuna asıldı. Krebs Solüsyonu veya sağlıklı birey ve Gebeler elde edilen eritrositler varlığında ATP aracılı vazodilatasyon yanıtları incelendi.NOS enzim inhibitörü L-NAME,eNOS substratı L-arginin, arjinaz enzim inhibitörü varlığında tekrarlandı. Araştırmaya katılan sağlıklı ve gebe bireylerin kanında hücre içi NO oluşumu ve hücre içi eNOS aktivitesi değerlendirildi.

Bulgular:Sağlıklı eritrositlerinin ATP aracılı gevşeme yanıtları Krebs Solüsyonuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Gebe eritrositlerinin ATP aracılı gevşeme yanıtları ise sağlıklı eritrositlerine göre azdı. Gebe eritrositlerine L-arginin ve ABH eklenmesi ATP aracılı gevşeme yanıtlarını arttırdı, Sağlıklı eritrositlerine bir etkisi olmadı. Tüm grupların ATP aracılı gevşeme yanıtları L-name eklenmesi ile azaldı. hücre içi NO oluşumu,hücre içi eNOS aktivitesi sonuçları organ banyosu sonuçları ile paraleldi.

Sonuç:Bulgularımızda, ATP aracılı vazodilatasyon yanıtında endotel kaynaklı NO ile birlikte eritrosit eNOS enzimi tarafından üretilen NO'nun da rol aldığı ilk defa gösterilmiştir. Araştırmamızın, kan akımının lokal kontrolünde önemli bir yeri olan ATP aracılı vazodilatasyon mekanizmasına eritrosit penceresinden yeni bir katkı sağlayacağını umuyoruz. Öte yandan çalışmamız,eritrosit eNOS enzim aktivitesinin gebelik koşullarında kontrol koşullarından farklı şekilde düzenlendiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: ATP, Vazodilatasyon, Eritrosit, eNOS

ABSTRACT

Objective: There is an active eNOS enzyme similar to endothelial cells in terms of both structure and NO production capacity in erythrocytes. It has been shown that the eNOS enzyme in erythrocytes is stimulated by ATP, it is not known whether this enzyme has a functional significance in the ATP-mediated vasodilation response. The aim of this study is to investigate whether the erythrocyte eNOS enzyme has a role in the vasodilation response in response to ATP.

Method: Aortic rings obtained from 30 wistar rats were suspended in the organ bath. ATP-mediated vasodilation responses were examined in the presence of Krebs Solution or erythrocytes obtained from healthy individuals and pregnant women. NOS enzyme inhibitor L-NAME, eNOS substrate L-arginine was repeated in the presence of arginase enzyme inhibitor. 5 ml venous blood samples were taken from healthy and pregnant individuals participating in the study, intracellular NO formation and intracellular eNOS activity were evaluated.

Results: It was shown for the first time that NO, produced by the erythrocyte eNOS enzyme, also plays a role in the ATP-mediated vasodilation response, along with NO from endothelium. We hope that our findings will provide a new contribution from the erythrocyte window to the ATP-mediated vasodilation mechanism, which has an important role in the local control of blood flow. On the other hand, our study revealed that erythrocyte eNOS enzyme activity was regulated differently in pregnancy conditions than in control conditions.

Conclusion: It was shown for the first time that NO, produced by the erythrocyte eNOS enzyme, also plays a role in the ATP-mediated vasodilation response, along with NO from endothelium. We hope that our findings will provide a new contribution from the erythrocyte window to the ATP-mediated vasodilation mechanism, which has an important role in the local control of blood flow.

Key words: ATP, Vasodilation, Erythrocytes, eNOS

İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
ABSTRACT	2
TABLolar DİZİNİ	5
ŞEKİLLER DİZİNİ	6
SİMGELER ve KISALTMALAR	10
1. GİRİŞ	11
2. GENEL BİLGİLER	13
2.1 Kan Akımının Lokal Olarak Düzenlenmesi	13
2.1.1 Metabolik ve Miyojenik Kontrol	14
2.1.2 Endotel Aracılı Kontrol	15
2.1.3 Eritrosit Aracılı Kontrol	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	34
3.1 Kan Örneklerinin Toplanması	34
3.2 Eritrosit Süspansiyonlarının Hazırlanması	35
3.3 Deney Protokolü	35
3.3.1 İzole Damarların Asılması ve Stabilizasyon Aşamaları	36
3.3.2 Endotel Cevabı	36
3.3.3 Damar Banyosunda Uygulanan Deney Protokolleri	36
3.4 Hücrede NO Oluşumunun Gösterilmesi	38
3.5 eNOS Fosforilasyonunun Gösterilmesi	38
3.6 Hücre içi Arjinaz I Aktivitesinin Değerlendirilmesi	39
3.7 Verilerin Değerlendirilmesi	39
	3

4. BULGULAR	41
4.1 ATP Aracılı Vasküler Gevşeme Yanıtları	43
4.1.2 NOS Substratı L-arjinin varlığında ATP aracılı Vasküler Gevşeme Yanıtları	44
4.1.3 NOS inhibitörü L-name varlığında ATP aracılı Vasküler Gevşeme Yanıtları	46
4.1.4 Arjinaz İnhibitörü ABH varlığında ATP aracılı Vasküler Gevşeme Yanıtları	48
4.1.5 P _{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti PPDAS varlığında ATP aracılı Vasküler Gevşeme Yanıtları	50
4.1.6 Hücre içi Arjinaz Aktivitesinin Ölçümü	52
4.2 Hücrede NO Oluşumunun Gösterilmesi	53
4.2.1 Eritrositlerde ATP ile Uyarılan NO Oluşumuna NOS Substratı L-arjininin Etkisi	55
4.2.2 Eritrositlerde ATP ile Uyarılan NO Oluşumuna NOS Substratı L-Name'in Etkisi	58
4.2.3 Eritrositlerde ATP ile Uyarılan NO Oluşumuna P _{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti PPDAS'nin Etkisi	60
4.2.4 Eritrositlerde ATP ile Uyarılan NO Oluşumuna Arginaz-1 İnhibitörü ABH'ın Etkisi	62
4.3 Eritrosit eNOS enziminin Serin 1177 bölgesinin Fosforilasyon Düzeyinin Gösterilmesi	64
4.3.1 Eritrosit eNOS enziminin Serin 1177 Fosforilasyon düzeyine NOS Substratı L-arjininin Etkisi	65
4.3.2 Eritrosit eNOS enziminin Serin 1177 Fosforilasyon düzeyine P _{2x} purinerjik reseptör antagonisti PPDAS'nin Etkisi	68
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	81
7. KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	103

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Grupların Klinik Özelliklerinin Karşılaştırılması

41



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. L-Arginin'den Nitrik Oksit Biyosentezi	21
Şekil 2. 2. Nitrik Oksit Sentaz Ailesi.	22
Şekil 2. 3. Eritrositlerden Atp Salınımı.	27
Şekil 3.1. Organ Banyoları	37
Şekil 4. 1. Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. A. Kümülatif Olarak ($10^{-8} - 10^{-4}$ M) Atp'ye Verilen Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-6} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları.	43
Şekil 4. 2. Sadece Krebs Solüsyonu Varlığında Organ Banyosuna Nos Substratı L-Arjinin Eklenmesiyle Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları A.Kümülatif Olarak ($10^{-8} - 10^{-4}$ M) Atp'ye Verilen Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-6} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları.	44
Şekil 4. 3. Sağlıklı Eritrosit Varlığında Organ Banyosuna Nos Substratı L-Arjinin Eklenmesiyle Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. A. Kümülatif Olarak ($10^{-8} - 10^{-4}$ M) Verilen Atp'nin Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-6} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları.	45
Şekil 4. 4. Gebe Eritrosit Varlığında Organ Banyosuna Nos Substratı L-Arjinin Eklenmesiyle Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. A. Kümülatif Olarak ($10^{-8} - 10^{-4}$ M) Verilen Atp'nin Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-6} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları.	45
Şekil 4. 5. Sadece Krebs Solüsyonu Varlığında Organ Banyosuna Nos İnhibitörü L-Name Eklenmesiyle Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları A. Kümülatif Olarak ($10^{-8} - 10^{-4}$ M) Verilen Atp'nin Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-5} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları.	46
Şekil 4. 6. Sağlıklı Eritrosit Varlığında Organ Banyosuna Nos İnhibitörü L-Name Eklenmesiyle Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları A. Kümülatif Olarak ($10^{-8} - 10^{-4}$ M) Verilen Atp'nin Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-5} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları	47

Şekil 4. 7. Gebe Eritrosit Varlığında Organ Banyosuna Nos İnhibitörü L-Name Eklenmesiyle Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. A. Kümülatif Olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) Verilen Atp'nin Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-5} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. 47

Şekil 4. 8. Sadece Krebs Solüsyonu Varlığında Organ Banyosuna Arjinaz İnhibitörü Abh Eklenmesiyle Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. A. Kümülatif Olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) Verilen Atp'nin Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-5} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. 48

Şekil 4. 9. Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu Varlığında Organ Banyosuna Arginaz İnhibitörü Abh Eklenmesiyle Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. A. Kümülatif Olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) Verilen Atp'nin Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-5} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. 49

Şekil 4. 10. Gebe Eritrosit Süspansiyonu Varlığında Organ Banyosuna Arginaz İnhibitörü Abh Eklenmesiyle Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. A. Kümülatif Olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) Verilen Atp'nin Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-5} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. 49

Şekil 4. 11. Sadece Krebs Solüsyonu Varlığında Organ Banyosuna P_{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti Ppads Eklenmesiyle Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. A. Kümülatif Olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) Verilen Atp'nin Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-5} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. 50

Şekil 4. 12. Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu Varlığında Organ Banyosuna P_{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti Ppads Eklenmesiyle Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. A. Kümülatif Olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) Verilen Atp'nin Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-5} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. 51

Şekil 4. 13. Gebe Eritrosit Süspansiyonu Varlığında Organ Banyosuna P_{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti Ppads Eklenmesiyle Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. A. Kümülatif Olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) Verilen Atp'nin Doz-Yanıt Eğrisi. B. 10^{-5} M Atp'ye Cevaben Oluşan Gevşeme Yanıtları. 51

Şekil 4. 14. Gebe Ve Sağlıklı Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerin Hücre İçi Arjinaz Aktivitesi.	52
Şekil 4. 15. A. Sağlıklı Ve Gebe Bireylerinden El De Edilen Eritrositlere Atp Eklenmesinin Hücre İçi No Oluşumuna Etkisi. B. Akış Sitometresi Sonuçları.	53
Şekil 4. 16. A. Sağlıklı Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerde Atp İle Uyarılan No Oluşumuna Nos Substratı L-Arjininin Etkisi B. Akış Sitometresi Sonuçları.	55
Şekil 4. 17. A. Gebe Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerde Atp İle Uyarılan No Oluşumuna Nos Substratı L-Arjininin Etkisi B. Akış Sitometresi Sonuçları	56
Şekil 4. 18 A. Sağlıklı Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerde Atp İle Uyarılan No Oluşumuna Nos İnhibitörü L-Name'in Etkisi B. Akış Sitometresi Sonuçları	58
Şekil 4. 19. A. Gebe Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerde Atp İle Uyarılan No Oluşumuna Nos İnhibitörü L-Name'in Etkisi B. Akış Sitometresi Sonuçları	59
Şekil 4. 20. A. Sağlıklı Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerde Atp İle Uyarılan No Oluşumuna P _{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti Ppdas'nın Etkisi B. Akış Sitometresi Sonuçları.	60
Şekil 4. 21. A. Gebe Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerde Atp İle Uyarılan No Oluşumuna P _{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti Ppdas'nın Etkisi B. Akış Sitometresi Sonuçları.	61
Şekil 4.22. A. Sağlıklı Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerde Atp İle Uyarılan No Oluşumuna Arjinaz İnhibitörü Abh'in Etkisi B. Akış Sitometresi Sonuçları.	62
Şekil 4. 23. A. Gebe Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerde Atp İle Uyarılan No Oluşumuna Arginaz-1 İnhibitörü Abh'in Etkisi B. Akış Sitometresi Sonuçları.	63
Şekil 4. 24. A. Sağlıklı Ve Gebe Bireylerinden El De Edilen Eritrositlere Atp Eklenmesinin Serin 1177 Bölgesinin Fosforilasyonuna Etkisi.. B. Akış Sitometresi Sonuçları.	64
Şekil 4. 25. A. Sağlıklı Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerde Atp İle Uyarılan Serin 1177 Bölgesinin Fosforilasyonuna Nos Substratı L-Arjininin Etkisi B. Akış Sitometresi Sonuçları	65

Şekil 4. 26. A.Gebe Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerde Atp İle Uyarılan Serin 1177 Bölgesinin Fosforilasyonuna Nos Substratı L-Arjininin Etkisi B. Akış Sitometresi Sonuçları . 66

Şekil 4. 27. A.Sağlıklı Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerde Atp İle Uyarılan Serin 1177 Bölgesinin Fosforilasyonuna P_{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti Ppdas'nin Etkisi B. Akış Sitometresi Sonuçları . 68

Şekil 4. 28. A.Gebe Bireylerden Elde Edilen Eritrositlerde Atp İle Uyarılan Serin 1177 Bölgesinin Fosforilasyonuna P_{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti Ppdas'nin Etkisi B. Akış Sitometresi Sonuçları . 69

SİMGELER ve KISALTMALAR

Ca⁺⁺ : Kalsiyum

cGMP : Siklik guanozin 3',5' monofosfat

cAMP : Siklik adenozin monofosfat

IP3 : İnoзитol trifosfat

EDRF : Endotel kaynaklı gevşetici faktör

eNOS : Endotelyal nitrik oksit sentaz

Htc : Hematokrit

iNOS : Uyarılabilir nitrik oksit sentaz

NOS : Nitrik oksit sentaz

PI3K: Fosfoinozitol 3 kinaz

PKA: Proten Kinaz A

PLC : Fosfolipaz C

PKG : Protein kinaz G

AMPK : AMP-tarafından aktive edilen

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

GTP : Guanozin trifosfat

ET-1 : Endotelin-1

NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

FAD : Flavin adenin dinükleotid

FMN : Flavin adenin mononükleotid

BH4 : Tetrahidrobiopterin

1. GİRİŞ

Eritrositler, hem endotel aracılı hem de endotelden bağımsız mekanizmalarla kan basıncının ve lokal kan akımının düzenlenmesinde görev alır. Bu konuda bahsi geçen mekanizmalar eritrositlerden salınan moleküllere göre NO ve ATP olmak üzere 2 ana başlıkta toplanabilir (Gladwin ve ark., 2004; Sprague ve ark., n.d.; Ulker ve ark., 2013).

Eritrositlerden ATP Salınımı: Eritrositlerde glikolitik mekanizmalarla üretilen ATP'nin bir kısmı eritrositlerin dolaşım sisteminde karşılaştıkları hipoksi ve mekanik kuvvetler etkisiyle hücre dışına salınmaktadır (Kirby ve ark., 2015; Lim To ev ark., 2015; Zhang ve ark., 2018). Eritrositlerden çıkan ATP, endotel hücrelerinde purinerjik reseptörlere bağlanarak eNOS enzimini aktive eder. Aktif olan eNOS enzimi tarafından üretilen NO ise damar düz kas hücrelerine ulaşarak vazodilatasyona neden olarak doku perfüzyonunu artırır (Ellsworth ve ark., 2016; Kirby ve ark., 2012; Misiti ve ark., 2022; Racine & Dinunno, 2019a; Z. Zhou, 2021). Pulmoner arteriyel hipertansiyon gibi çeşitli patolojik koşullarda eritrositlerden salınan ATP miktarının azaldığı ve bunun vasküler direnç artışına katkı sağladığı gösterilmiştir (Sprague ve ark., 2001; Sprague & Ellsworth, 2012).

Eritrositlerden NO Salınımı: Eritrositler 3 farklı mekanizma ile plazmaya NO salınımı gerçekleştirir. Bunlardan ilki plazmada bulunan nitritin NO'ya indirgenmesi, ikincisi plazmada bulunan NO'nun hücre içine alınarak, taşınması ve hipoksik bölgelerde salınmasıdır (Dufour ve ark., 2010; Gladwin, 2006; Stamler J.S., 1997). Eritrositlerden NO salınımına neden olan üçüncü ve en önemli mekanizma ise aktif eNOS enzimi tarafından gerçekleştirilir (Kleinbongard ve ark., 2006; Ulker ve ark., 2011). Eritrositlerde hem aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları, hem de NO üretim kapasitesi bakımından endotel hücrelerindeki eNOS enzimi ile benzerdir (Kleinbongard ve ark., 2006). Eritrosit eNOS enziminin plazma NO biyoyararlanımına önemli ölçüde katkı sağladığı gösterilmiştir. Sadece eritrosit eNOS enziminin susturulduğu; endotel eNOS enziminin ise normal fonksiyona sahip olduğu hayvan modellerinde hipertansiyon geliştiği kanıtlanmıştır (Leo ve ark., 2021; Wood ve ark., 2013). Öte yandan, eritrosit eNOS enzimi kan akımının yerel düzenlenmesi ile kalbin

yapı ve fonksiyonlarının korunmasında da önemli roller üstlenmektedir. Nitekim, eritrosit eNOS enzimi tarafından üretilen NO, perfüzyon koşullarında endotel tabakası sıyrılmış damar segmentlerinde gevşemeye neden olmaktadır (Eligini ve ark., 2013; Mahdi ve ark., 2021; Ulker ve ark., 2013b). Eritrosit eNOS enzimi, endotel hücrelerindeki eNOS enzimi gibi substratı olan L-arjinin eksikliğinde aktive olamaz ve NO yerine süperoksit radikali (O_2^-) üretir. Eritrosit eNOS enzimi tarafından üretilen O_2^- bir taraftan oksidatif stresi arttırırken diğer taraftan ortamda bulunan NO'yu peroksinitrite indirgeyerek NO biyoyararlanımının azalmasına neden olur. Bu mekanizmanın Tip2 diyabet, pre-eklampsı ve covid-19'a bağlı gelişen endotel disfonksiyonunun da temel başlatıcı faktörü olduğu kanıtlanmıştır (Mahdi ve ark., 2022; McCann Haworth ve ark., 2021; Zhou ve ark., 2018)

Yukarıda da bahsedildiği gibi, ATP aracılı vazodilatasyon mekanizmasında NO kaynağı olarak literatürde sadece endotel hücreleri gösterilmektedir. Oysa, eritrositlerde de endoteldeki eşleniği gibi ATP ile aktive olduğu hücre içi NO üretimi arttırdığı gösterilmiş olsa da ATP'ye cevaben eritrosit eNOS enzimi tarafından üretilen NO'nun fonksiyonel bir öneme sahip olup olmadığı bugüne kadar hiç çalışılmamıştır. Bu çalışmanın ilk amacı, ATP'ye cevaben gelişen vazodilatasyon yanıtlarında eritrosit eNOS enzimi tarafından üretilen NO'nun olası rolünün araştırılmasıdır. Diğer amacı ise, eritrosit eNOS aktivitesinin gebelik koşullarında, kontrol koşullarından farklı şekilde düzenlenip düzenlenmediği ve Gebe eritrosit eNOS enziminin ATP'ye cevaben gelişen vazodilatasyon yanıtına etkisinin incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kan Akımının Lokal Olarak Düzenlenmesi

Canlılarda yaşamsal faaliyetleri düzenlemek amacıyla meydana gelen çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Bu mekanizmaların en önemlilerinden biri kan akımının lokal olarak düzenlenmesidir. Doku ve organların metabolik faaliyetlerinin eksiksiz sürdürülebilmesi için, kendi kan akımlarını düzenleyebilirler. Fonksiyonel olarak aktif dokularda, kan akışında belirgin artış veya azalış gerektiren çeşitli metabolik olaylar meydana gelir. Kan akımının bu şekilde lokal olarak düzenlenmesi iki şekilde olur. Uzun süreli (kronik) kontrol ve akut kontrol (Clifford., 2011).

1: Akut Kontrol: Akut kontrolde arteriyoller, metarteriyoller ve prekapiller sfinkterlerin lokal doku için gerekli kan akımını sağlamak amacıyla bölgesel olarak kasılma gerçekleştirirler ve bu mekanizma dakikalar ve saniyeler içinde meydana gelir. Nedenleri; Metabolik hızın artmasıyla yerel kan akışının artması, oksijen mevcudiyetinin azalması yerel kan akışının artması, besin maddelerine ve oksijen'e ihtiyaç arttıkça, Akut kontrol mekanizması devreye girer.

2: Uzun süreli (kronik) kontrol: Dokuya kan akışını sağlayan damarların zamanla fiziksel boyutlarında ve sayılarında azalma veya artma şeklinde kendini gösteren mekanizmadır. Nedenleri; doku vaskülaritesinde değişiklik, anjiyogenik faktörler, vasküler endotel büyüme faktörü ve angiogenin, uzun süreli kontrol mekanizmasını devreye sokar (Duncker D, 2008; Wolff ve ark., 2016).

Kan akımının yerel olarak düzenlenmesinde görev alan fonksiyonel mekanizmalar ise aşağıda sıralanmaktadır;

1: Metabolik ve miyojenik kontrol

2: Endotel aracılı kontrol

3: Eritrosit aracılı kontrol

2.1.1 Metabolik ve Miyojenik Kontrol

Memeli vücudunda doku ve organlarda gerçekleşen yerel kan akımının düzenlenmesi mekanizması, organların yapısında bulunan direnç damarlarındaki perfüzyon basıncına ve vazomotor tonus ile belirlenir. Vazomotor tonusu düzenleyen lokal faktörler arasında, miyojenik ve metabolik kontrol mekanizmaları, kırmızı kan hücrelerinden ve endotel hücrelerinden salınan çeşitli vazoaktif moleküller bulunur. Literatürde ve çoğu fizyoloji kitabında genellikle miyojenik ve metabolik kontrol mekanizmaları, kan akışının düzenlenmesinin otonöregülasyonu başlığı altında incelendiği görülmektedir (Goodwill ve ark., 2017).

Doku ve organlarda meydana gelen, kan akımının vücut homeostazının sabit tutmak amacıyla yaptığı doku ve organ kan akımında meydana gelen ani değişikliklere rağmen, kan akımının sabit tutulmasını sağlayan mekanizmalar mevcuttur (Goodwill ve ark., 2017; Secomb, 2008). Bu mekanizmalar miyojenik ve metabolik mekanizmalar olarak iki başlık altında tanımlanır.

Bir dokuda gerçekleşen metabolik aktiviteler o dokuya olan kan akışını kontrol etmektedir. Bu kontrol mekanizmasına kan akımının metabolik olarak düzenlenmesi denir. Metabolik hipoteze göre; damar düz kas hücreleri ve doku metabolizması arasında, dokunun ihtiyacına göre lokal olarak kan akımını düzenleyen bir mekanizma bulunur. Metabolik kontrol, dokunun oksijen ve enerji ihtiyacına göre salınan vazoaktif moleküllerle sağlanır (Fronck ve ark., 1975.; Hester ve Hammer, 2002). Bu vazodilatör moleküller serbestlenerek arterleri, metaarteriyolları ve prekapiller sfinkterleri genişletirler. Vazodilatör maddelerin oluşumu, oksijen düzeyi ne kadar az veya metabolizma hızı ne kadar fazla ise o kadar çoktur. Kan akımının metabolik olarak düzenlenmesinde rol alan vazodilatör moleküller, adenosin, karbondioksit, hidrojen, laktik asit, potasyum, bradikinin ve nitrik oksittir. Dokuda oksijen ve besin eksikliğinin ardından gerçekleşen lokal vazodilatasyon ile kan akımı artar. Bir süre sonra vazodilatasyon nedeniyle kanda artan oksijen konsantrasyonundan dolayı, damar düz kasında kasılma meydana gelir ve prekapiller sfinkterler kapanır (Davis & Sikes, 1990).

Lokal kan akımının düzenlenmesinde rol alan miyojenik vasküler kontrol mekanizması ise, doku metabolizmasından bağımsız olarak gerçekleşir. Miyojenik mekanizmada, arter ve arteriyollerde gerçekleşen intralüminal basıncın artmasına cevap olarak damar düz kasında bulunan gerim reseptörleri devreye girer ve damarlarda ani şekilde kasılma gerçekleşir. Bu olay sonucunda dokuya giden kan akımı azalır. Diğer bir yandan, damar içi basınç azaldığında damarların gerimi azalacağından arteriyoller dilate olur ve kan akımı artar. Miyojenik teori kısaca damar içi basıncın artması veya azalması durumunda arteriyollerdeki kan akımının sabit tutulmasıdır. Miyojenik yanıt sinir innervasyonu ya da hormonal mekanizmalar gibi dış uyaranlardan bağımsız olup, miyositler tarafından başlatılan bir mekanizmadır (Clifford, 2011; C. Zhang & Chilian, 2008).

2.1.2 Endotel Aracılı Kontrol

Endotel tabakası vücuttaki tüm damarların iç lümenini saran, kan dolaşımı ile çevre dokular arasında bir ara yüz oluşturan, yüksek düzeyde özelleşmiş bir yapıdır. Endotel tabakasını oluşturan endotel hücreleri ise damar yapısını düzenleyen vazokonstriktör ve vazodilatör otokoidler/mediyatörler salgılar. Bunun yanı sıra yapılan deneysel çalışmalarla endotel hücrelerinin damar gerimini ve shear stres gibi mekanik kuvvetleri algılayarak damar düz kas tonüsünü ayarladığı gösterilmiştir (Laughlin ve ark., 1996; Sandow ve ark., 2012).

Literatüre baktığımızda lokal kan akımının düzenlenmesinde endotel hücrelerinin rolü oldukça fazladır (Laughlin ve ark., 1996). Endotel hücrelerinin vasküler düz kas tonusunun düzenlenmesindeki esas rolleri ilk kez 1980 yılında araştırmacı Robert Furchgott tarafından yapılan bir dizi çalışma sonucu ortaya çıkmıştır (Furchgott & Zawadzki, 1980). Damar endotelinin çeşitli uyarılara yanıt olarak salgıladığı vazoaktif mediyatörler arasında endotelin, prostaglandin I₂, endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF), ve nitrik oksit yer alır (Laughlin ve ark., 1996).

Endotelinler

21 aminoasitli bir peptid olan endotelin-1, 1988'de Yanagisawa ve ark tarafından kültürlenmiş domuz aortik endotel hücrelerinin supernatanında güçlü bir vazokonstriktör madde olarak tanımlanmıştır (Bouallegue ve ark., 2007). Endotelin ailesi 4 farklı izotipten (ET-1,ET-2,ET-3,ET-4) oluşur. ET-1, endotelin ailesinin en baskın üyesi olmasının yanı sıra, yavaş salınımı ve uzun etki süresi ile tanımlanan en güçlü vazokonstriktör ajandır. Vasküler endotelin hücreleri, endotelin-1'in ana kaynağı olmasına rağmen endotelin-1'in üç izoformu olan ET-1, ET-2, ET-3 kodlayan genler makrofajlar, kardiyomiyositler, lökositler ve hipofiz bezi dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde ekspresse edilir (Bouallegue ve ark., 2007; Lankhorst ve ark., 2016). Ayrıca endotelin-1 hem kardiyovasküler hem de diğer dokularda çeşitli fizyolojik etkilere sahip olmakla birlikte inflamatuvar sitokinler, hipoksi, anjiyotensin-2 gibi uyaranlar ile salınabilmektedir.

ET-1 proendotelin olarak sentezlendikten sonra endotelin dönüştürü enzim (Ece) aracılığıyla aktif hale gelir. Daha sonrasında ET-1, endotelyal hücre tarafından salınmasıyla hedef dokudaki reseptörüne bağlanır. İki temel ET-1 reseptörü türü vardır. Endotelin-1 fizyolojik etkilerini hücre membranını 7 defa kat eden Gq proteinine bağlı ETA ve ETB reseptörleri aracılığıyla gösterirler. Diğer bir yandan ET-1 etkilerini, IP₃ sinyal yolu aktivasyonu ile gerçekleştirir. IP₃ yolağının aktivasyonu sarkoplazmik retikulum tarafından kalsiyum salınımına neden olur ve bu da düz kas kasılmasıyla sonuçlanır. Damar endotel hücrelerinde ETB reseptörleri bulunur. ETB reseptörü aktivasyonu, endotelyal nitrik oksit sentaz aracılı NO üretimini indükleyerek vasküler düz kasta gevşeme meydana gelir (Lavallée ve ark., 2001).

Prostaglandin I₂ (PGI₂)

Prostaglandin I₂ veya prostasiklin endotel hücreleri tarafından üretilen, fizyolojik olarak aktif bir prostanoittir. 1976 yılında John ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş olup, endotelden salınan ilk vazodilatör ajan olarak kayıtlara geçmiştir (Moncada ve ark., 1976). Hücre membranında bulunan fosfolipidlerden olan fosfolipaz A enzimi ile araşidonik asit üretildikten sonra COX₁ ve COX₂ enzimleri aracılığıyla araşidonik asidi

prostaglandin formuna dönüştürür. Yarılanma süresi 10 sn olup vücutta lokal hormon olarak etki gösterirler.

PIG₂ başta vasküler homeostaz olmak üzere vücutta bir çok mekanizmada rol oynar. Bilinen başlıca işlevleri; cGMP aracılı vazodilatasyonu gerçekleştirmek, trombosit agregasyonunu inhibe etmek ve immun hücre proliferasyonunu sınırlayarak inflamasyona aracılık etmektir (del Pozo ve ark., 2017; Majed & Khalil, 2012). Prostaglandin I₂ sentezini uyaran agonistler arasında substan P, epidermal büyüme faktörü, platelet büyüme faktörünün yanı sıra en güçlü uyaran agonisti ise bradikinindir (del Pozo ve ark., 2017).

Endotel Kaynaklı Hiperpolarize Edici Faktör (EDHF)

Endotel hücreleri çeşitli vazoaktif faktörleri serbest bırakarak vasküler düz kas hücrelerinin tonusunu kontrol eder. Geçmişten beri yapılan çalışmalarda siklooksijenaz ve nitrik oksit sentaz yollarının yanı sıra endotel hücrelerinden salınan vasküler düz kasta gevşemeye ve hiperpolarizasyona neden olan farklı bir faktör olduğunu gözlemlediler. Bu üçüncü endotel bağımlı yol tüm kan damarlarında tanımlanmıştır. Vasküler düz kas hücrelerinin hiperpolarizasyonu ile ilişkili olduğu ve endotelden salındığı için, endotel türevli hiperpolarize edici faktör olarak adlandırılmıştır (Edwards ve ark., 2010).

Literatürde EDHF'nin 3 farklı mekanizması gösterilmektedir. Birinci mekanizma endotel hücre membranında bulunan kalsiyum bağımlı potasyum kanallarının oluşturduğu hiperpolarizasyonun, konneksin proteinlerinden oluşan gap junctionlar aracılığıyla vasküler düz kasa iletilip düz kasta vazodilatasyona sebep olmasıdır. İkinci mekanizma, EDHF gibi sitokrom CYP450'den türetilen epoksieikosatrienoik asit (EET), büyük ve küçük koroner arterler olmak üzere çeşitli kan damarlarında BKCa kanalları vasıtasıyla vasküler düz kasta hiperpolarizasyona neden olur (Coleman ve ark., 2004; Sandow, 2004). Üçüncü mekanizma ise, damar endotel hücrelerinde bulunan kalsiyum ile aktive olan orta ve küçük potasyum kanalları yoluyla endotel hücrelerinden potasyum çıkışıyla inward rectifying potasyum (KIR) ve düz kas hücreleri üzerindeki sodyum/potasyum ATPase'ı aktive etmesiyle düz kasta vazodilatasyona neden olur (Fleming ve ark., 2001).

Nitrik Oksit

Nitrik oksit, insan vücudunda hemen hemen her hücre tiplerinde, dokularda ve organlarda sentezlenen nonpolar renksiz bir gazdır. Nitrik oksit yüksüz bir molekül olmasından kaynaklı hücre membranından kolayca geçebilme özelliğine sahiptir (Levine ve ark., 2012).

NO, ilk olarak 1772’de Joseph Priestly tarafından atmosferde bulunan ve sadece bir oksijen atomu ve bir nitrojen atomundan oluşan basit bir molekül olarak tanımlamıştır. Bu keşif sonrasında uzunca bir süre nitrik oksit, atmosfer kirletici bir gaz olarak bilinmekteydi (Gillman, 2018). 1977 yılında araştırmacı Ferid Murad yaptığı araştırmalarla nitrogliserinin kan damarlarını gevşettiğini ve ‘angina pectoris’(göğüs ağrısı) bulgusuna karşı faydalı etkileri olduğunu gösterdi. İlaçların kan damarları üzerindeki etkisini araştıran Furchgott, 1980 yılında yaptığı bir çalışmada yalnızca endotel sağlam olduğu takdirde asetilkolinin damarları gevşettiğini gösterdi. Bu araştırmanın sonucunda endotel hücrelerinden, vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesini sağlayan bilinmeyen bir sinyal molekülü keşfetti ve bu sinyal molekülüne endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) adı verildi. Bir diğer araştırmacı İgnarro ise yaptığı deneysel çalışmalarda EDRF’nin kimyasal ve fizyolojik yanıtını çalışarak 1986’da EDRF’nin aslında nitrik oksit ile aynı olduğu sonucuna vardı ve böylece Furchgott’unn endotelial faktörünü tanımladı (Bian & Murad, 2003).

Araştırmacılar Robert Furchgott, Ferid Murad ve Louis İgnarro ‘ Kardiyovasküler sistemde bir sinyal molekülü olarak NO’ ile ilgili çalışmalarından dolayı 1998 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülüne layık görülmüştür (Lowenstein ve ark., n.d.; Matin & Angeles Rodri, 1997).

Nitrik Oksit Fonksiyonları

NO’nun Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

Nitrik oksit, 1980’lerde endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak nitelendirildikten sonra birçok sistemde görev alan önemli bir sinyal moleküllerinden biri olarak hızla statü kazanmıştır (İgnarro ve ark., 1987; Loscalzo & Welch, 1995). Son 20 yılda yapılan

çalışmalarda ise nitrik oksitin direkt olarak kardiyovasküler sistemde görev alan, oldukça önemli bir gevşetici ajan olduğu tanımlanmıştır (Ignarro ve ark., 2002).

Vasküler homeostazının korunmasında nitrik oksitin rolü iyi tanımlanmıştır. Endotel hücrelerinden salınan nitrik oksit, vasküler düz kas hücrelerine difüze olduktan sonra, çözüner guanilil siklaz'ın (sGC) HEM kısmına bağlanarak aktif eder ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretiminin artmasına neden olur. cGMP'de vasküler düz kas gevşemesine aracılık eder (Ignarro ve ark., 1987, 2002).

Hücre içinde NO aracılı cGMP artışı farklı mekanizmalarla damarda vazodilatasyona sebep olur. Bu mekanizmalar şu şekildedir:

1. Hücre membranında bulunan Ca^{+2} -ATPaz'ların uyarılması
2. Potasyum kanallarının aktivasyonu sonucunda potasyumun hücre dışına çıkışının arttırılmasıyla hiperpolarizasyon oluşması
3. Hücre içinde bulunan Ca^{+2} 'nin azalmasını sağlayan G proteinlerinin ve reseptörlerin aktivasyonu
4. Düz kas kasılmasında rol oynayan miyozin hafif zincirinin defosforile olması (Ignarro ve ark., 2002; Liu & Huang, 2008).

Genel olarak nitrik oksit, damar sisteminde vazodilatasyona neden olmasının yanı sıra, antiinflamatuvar ve antitrombotik etkileriyle de bilinir (Sautebin, 2000; Sharma ve ark., 2007). Nitrik oksit biyoyararlanımı tehlikeye girdiğinde ise bu faydalı etkiler kaybolur ve endotel disfonksiyonu başlar.

NO ve Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri

Nitrik oksitin gastrointestinal sistemdeki rolü oldukça önemlidir. NO, vazodilatasyon ile midede kan akımını arttırır. Mide motilitesi, mide sekresyonu, mukozal bariyerin korunması, su ve elektrolit absorpsiyonu gibi fizyolojik olaylarda da rol aldığı gösterilmiştir (Stanek ve ark., 2008; Wallace, 2018).

NO ve Sinir Sistem Üzerine Etkileri

NO'nun sinir sistemine etkileri literatürde bilinmektedir. Nitrik oksit, periferik sinir sisteminde nonkolinerjik ve nonadrenerjik sinir sistemlerine etki etmesiyle solunum, vazodilatasyon, mide ve bağırsak fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar (T. M. Edwards & Rickard, 2007; Sartori & Scherrer, 1999). Merkezi sinir sisteminde ise, başlıca hafıza oluşumu, öğrenme gibi mekanizmalarda nörotransmitter olarak rol oynamıştır (T. M. Edwards & Rickard, 2007).

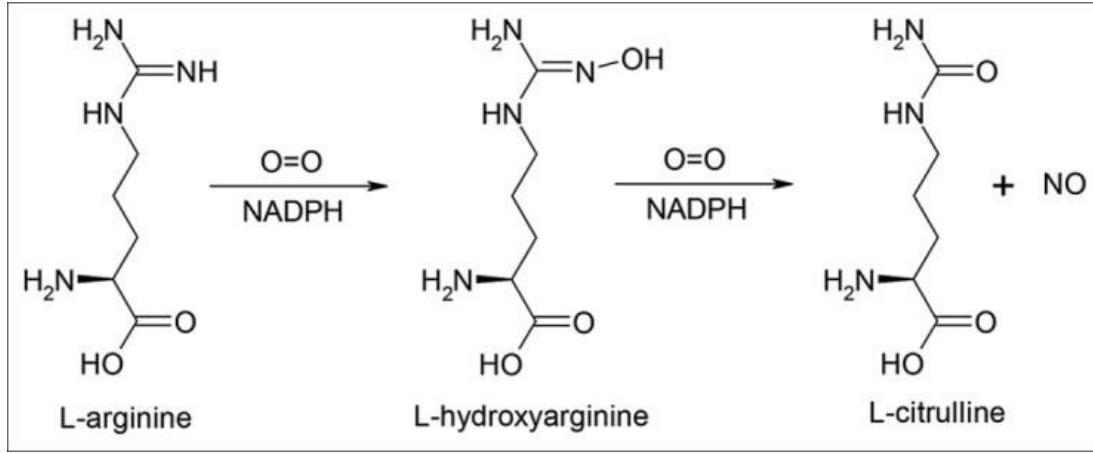
NO ve Renal Sistem Üzerine Etkileri

Nitrik oksit ile böbrekte medüller, glomerüler kan akışının ve kan basıncının düzenlenmesinin yanı sıra böbreklerdeki tübüllerin şekillenmesi, sodyum transportu, glomerüler filtrasyon, renal otoregülasyonu ve renal kan akımı gibi böbreğin ana fonksiyonlarının gerçekleştirilmesindeki görevi oldukça önemlidir (Carlström, 2021).

NO Üretimi

Vücudun çeşitli yerlerinde nitrik oksit üretimi gerçekleşir ve endojen nitrik oksit üretimi büyük ölçüde enzimatik yollarla yardımcıyla, küçük ölçüde ise enzimatik olmayan yollarla gerçekleşir (Donald ve ark., 2015; Zweier ve ark., 1999). NO, iki aşamalı bir reaksiyon ile nitrik oksit sentaz enzimi tarafından üretilir. Non-aromatik bir aminoasit olan L-argininin N terminal guanidin grubunun NO'ya çevrilmesiyle sentezlenir. NO biyosentez reaksiyon aşamaları şu şekildedir:

İlk aşamada, NADPH'tan gelen elektronların indirgenmesiyle L-arginin aminoasidine hidroksil grubu eklenir ve N-hidroksiarginin oluşur.



Şekil 2. 1.L-arginin'den nitrik oksit biyosentezi

İkinci aşamada ise yine NADPH'ten gelen elektron ile N-Hidroksiarginin L-sitrülin ve NO'ye çevrilir. NO çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalara katılırken, L-sitrülin tekrar L-arginin döngüsüne katılır ve L-arginin De Nova sentez mekanizması ile tekrar L-arginine çevrilir (Luiking ve ark., 2010; Moncada & Higgs, 2006). L-argininden nitrik oksit üretim reaksiyonu nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve oksijen bağımlıdır. Vasküler hemostazında oldukça önemli rollere sahip olan nitrik oksitin, nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla üretilmesi için gerekli olan birtakım substratlar ve koenzimler mevcuttur. Substratlar, moleküler oksijen, NADPH ve L-arginin amino asitidir. Kofaktörler ise, sitokrom p450, tetrahidrobiyopterin(BH4), flavin adenin dinükleotid (FAD) ve flavin mononükleotid (FMN) kullanılmaktadır (Şekil2.1) (Luiking ve ark., 2010).

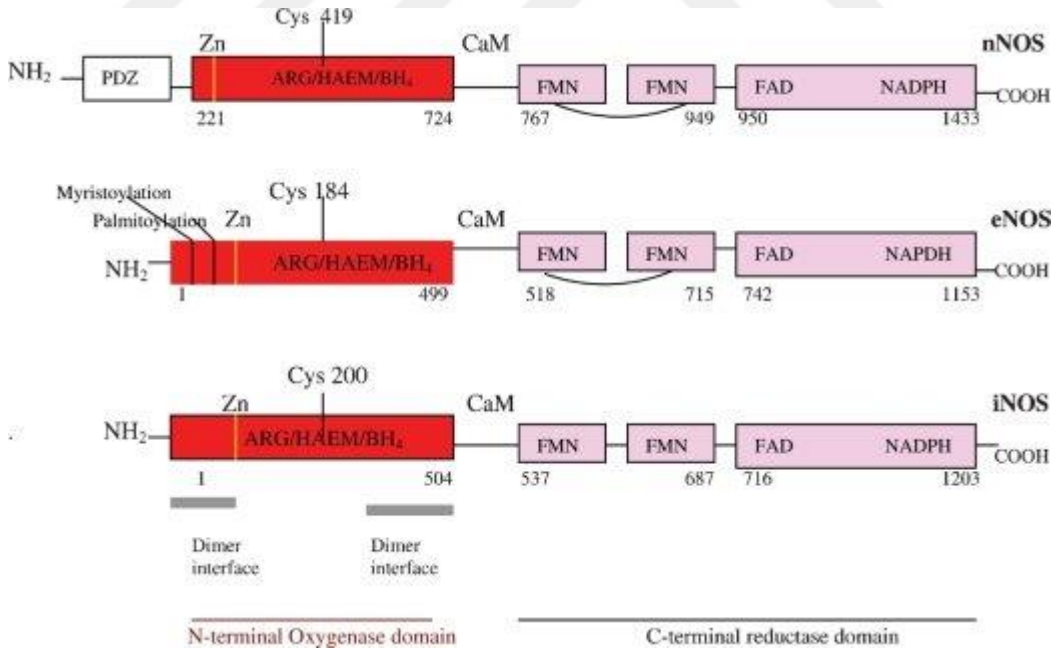
Nitrik oksitin birincil hücresel kaynağı olan nitrik oksit sentaz enzimi üç izoformdan oluşur. % 50-60 oranında bir homolojiye sahip olan bu izoformlar, Bult ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Nitrik oksit sentaz ailesi, lokasyonu ve hücre tipine göre üç ayrı şekilde bulunur.

Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (NOS1, nNOS) : Nöronal izoformudur. Yapısal olarak ekspresse edilir. Nitrejenik nöron uçlarında periferik ve merkezi nöron uçlarında, astrositlerde ve hipokampüste bulunur. Öğrenme, hafıza, nörogenesis ve ağrının iletiminde görev alırlar (Melikian ve ark., 2009; L. Zhou & Zhu, 2009).

İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (NOS2, iNOS) : Aktif makrofajarda ve mast hücrelerinde bulunur. Yapısal değildirler. Proinflamatuvar sitokinler ile indüklenirler. İnflamasyonda üretilip, immün cevapta rol alırlar (Pautz ve ark., 2010).

Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (NOS3, eNOS) : Endotelial izoformudur. Başlıca endotel hücreleri, eritrositleri trombositler ve kardiyomiyositlerde bulunur. Az düzeyde nöronlarda bulunurlar. Damar tonusu, platelet agregasyonu inhibisyonu ve lökosit adesyonunda görev alırlar (Fleming & Busse, 2003).

Üç izoform da farklı kromozomlar üzerindeki aynı genler tarafından kodlanır. Bulundukları yerler ile üstlendikleri roller birbirlerinden farklıdır. Tez konumdan dolayı Endotelial nitrik oksit sentaz enziminin detaylıca bahsedeceğim. Bütün nitrik oksit sentaz enzimleri monomer olarak sentez edilir. Her bir monomer iki subüniteden oluşur. Bunlar redüktaz (492-1205 aminoasit) ve oksijenaz (1-491 aminoasit) domeinleridir. Redüktaz bölgesinde NADPH, FAD ve FMN bulunur.



Şekil 2. 2.Nitrik Oksit Sentaz Ailesi.

Oksijenaz domeininde ise tetrahidrobiyopterin, L-arginin aminoasitinin ve HEM'in bağlanacağı özel bölgeler bulunur. Bunun dışında iki domeinin arasında kalmodulin

denilen bir bağlanma bölgesi bulunur. NOS enzimi monomer yapıda iken, redüktaz bölgesinde bulunan NADPH'tan flavinlere elektron transferi olur. Bunun sonucunda bazal düzeyde süperoksit radikali oluşur fakat oluşan bu O₂ patoloji oluşturacak düzeyde değildir. Endotelyal nitrik oksit sentaz ailesi yalnızca dimerik forma geçtiği zaman aktifleşir (Dudzinski ve ark., 2006; Wheatley, 2007). Nitrik oksit üretimi için gerekli olan elektronların sağlanması için redüktaz bölgesindeki NADPH dehidrojenize edilir ve ardından elektronlar nitrik oksitin oluşacağı bölge olan oksijenaz bölgesine geçer. Hücre içi kalsiyum artışının ardından eNOS enzimi üzerindeki CaM bağlanma bölgesine kalmodulin bağlanarak o bölgeyi aktifleştirmesinin ardından redüktaz bölgesindeki elektronlar oksijenaz bölgesine transferi hızlanır. eNOS enzimi kalsiyum bağımlı bir enzim olduğu için kalmodulin bölgesinin aktifleşmesi eNOS dimerizasyonu için mutlaka gereklidir. eNOS enziminin aktifleşmesi için önemli olan bir diğer yapı 'Hem' bölgesidir. Hem bağlanması da, redüktaz bölgesinden oksijenaz bölgesine elektron akışını hızlandırır. Ayrıca, bu elektron geçişi sırasında ferrik demirin (Fe⁺³) ferröz demire (Fe⁺²) indirgenmesi sağlanır. Bu reaksiyon sonrasında oksijenaz bölgesi BH₄ ve L-arginin'i bağlar. Fe⁺² daha sonra moleküler oksijenle birleşerek demir-oksijen kompleksini oluşturur bu kompleks L-arginin'in N terminal guadino parçasını oksitleyerek NO ve L- sitrülün oluşturur (Förstermann & Sessa, 2012).

Üç nitrik oksit sentaz ailesi de bir çinko bağlanma bölgesi içerir. Çinko (Zn) bağlanması bu enzimlerin dimerik formda kalmasını stabilize eder. Diğer bir yandan eNOS ve nNOS enzimlerinde CaM bağlanması Ca⁺² gerektirir. iNOS enzimi ise başka bir liganda gereksinim duymadan dimerik formu başına bir CaM molekülünü büyük bir afinite ile geri dönüşümsüz olarak bağlayabilir. (Wheatley, 2007). Ayrıca nNOS taşıdığı PDZ domeini ile diğer proteinlerin PDZ domenleri ile etkileşime girebilir. PDZ domeini nNOSu'n subselüler lokalizasyonunu belirler (Stricker ve ark., 1997). Yapısal izoformlarda, yani nNOS ve eNOS'ta BH₄ olmadan dimer yapı oluşur. Fakat iNOS dimeri için BH₄ şarttır. Vücutta NO konsantrasyonu düzenli olarak düşük seviyelerde dalgalanmalar gösterir ve eNOS ve nNOS tarafından kontrol edilir. iNOS enfeksiyon, enflamasyon veya vasküler travma durumlarında diğer iki NOS formunun ürettiğinin 100 – 1000 Katı kadar daha fazla NO üretir. Ayrıca iNOS Ca⁺² ve uyarıcı ajanlardan bağımsız çalıştığı için aktivitesi daha uzundur. NOS enzimi çeşitli hastalıklarda substratı

L-arginin ve kofaktörü BH4 eksikliğinden dolayı dimer yapı oluşturamaz ve nitrik oksit yerine süperoksit radikali oluşturur (Şekil 2.2) (Förstermann & Münzel, 2006; Förstermann & Sessa, 2012).

Nitrik oksit üreten bu üç nitrik oksit sentaz enzimlerinin hücre içindeki lokalizasyonları değişkenlik göstermektedir. iNOS ve nNOS çözünebilir sitozolik proteinlerdir. Fakat endotel hücrelerindeki NOS enziminin aktivitesi hücre membranındaki lokalizasyonuna bağlıdır. eNOS enzimi aktivite durumuna göre sitoplazmada ya da hücre membranında kaveola denilen bir yapıda bulunur. Kaveola hücre membranının hücre içine doğru oluşturduğu girintilerdir. Ancak yapısı hücre membranının diğer kısımlarından farklı olarak sifingolipidler ve kolesterolden çok zengin yapıda bulunur (Cau ve ark., 2012; Kagan ve ark., 1993). Hücre çekirdeğinde sentezlenen eNOS enzimi, golgi organelinde palmitolasyon ve miristolasyon denilen iki yağ asidi modifikasyonu ile hücre membranında bulunan kaveolada lokalize olur. Kaveolada enos caveolin-1 proteinine bağlı olarak bulunur. Bu şekilde caveolin-1 e bağlı iken eNOS inaktiftir. Çünkü caveolin 1'deki Thr-90, Thr-91 bölgeleri eNOS'un kalmodülün bağlama bölgesini kapatır. Hücreye kalsiyum girişi ile eNOS enzimi kaveolin-1'den ayrılır ve kalmodulin bağlama bölgesi açığa çıkmasıyla bu bölgeye CaM bağlanır (Z. Chen ve ark., 2018; Troiano ve ark., 2021). Daha sonrasında eNOS hücre membranındaki yerinden ayrılarak sitoplazmaya geçerek aktif moduna geçer. Kayma gerilimi gibi endotel hücre uyarıları (Bredt, 2003). Akt yolağını aktifleştirerek sitoplazmadaki eNOS enzimini serin 1177 bölgesinden fosforilize ederek enzim aktivitesini daha da artırır. Sitoplazmada aktif halde bulunan eNOS enzimine, bir stres proteini olan HSP90'ın bağlanması eNOS enziminin kalmoduline bağlama afinitesini artırır. (Danylovyh ve ark., 2018; Kagan ve ark., 1993). Akt yolağının inaktivasyonu ve hücre içinde kalsiyumun azalması ile endotel hücre nitrik oksit enzimi inhibe olur. Bu koşullarda eNOS enzimi Golgi organeline geçerek burada tekrar palmitolasyona uğradıktan sonra hücre membranındaki kaveolaya lokalize olur (Danylovyh ve ark., 2018; Taguchi ve ark., 2012).

eNOS Aktivitesi Kontrolü

Endotelden salınan nitrik oksit, kardiyovasküler homeostazının kritik bir düzenleyicisidir. Başlangıçta kalmodulin (CaM) tarafından düzenlenen bir enzim olduğu düşünülen eNOS'un, post-transyasyonel lipid modifikasyonları, protein-protein kalıntıları üzerinde meydana gelen fosforilasyon ve protein-protein etkileşimleriyle de kontrol edildiği gösterilmiştir (Bátori ve ark., 2017; Matsushita ve ark., 2001). Fizyolojik olarak, endotel hücreleri, laminar kayma stresi (Shear stres) de dahil olmak üzere kanın hemodinamik kuvvetlerine maruz kalır. Shear stres eNOS enzim aktivitesini arttırmaktadır (Fisslthaler ve ark., 2000). Diğer bir yandan bradikinin ve VEGF gibi farmakolojik faktörler de eNOS enzim aktivitesini arttırmaktadır. Hipoksi, yüksek plazma glukoz, okside LDL artışı gibi patofizyolojik faktörlerde eNOS aktivasyonunu azaltır. Bununla birlikte eNOS enziminin hücre membranındaki lokalizasyonunu sağlayan kaveola-1'de bu enzim aktivasyonunda görev alır (Sessa, 2004)

Endotelyal nitrik oksit sentaz enzimi üzerinde 5 spesifik fosforilasyon bölgeleri tanımlanmıştır. Bu fosforilasyon bölgelerini çeşitli aminoasit kalıntıları oluşturur. eNOS enzimin bu fosforilasyon bölgelerini uyaran birçok farmakolojik ve fizyolojik uyaranlar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda serin 1177 bölgesini uyaran 5 farklı uyaran gösterilmiştir. Diğer fosforilasyon bölgeleri olan S615, S116, S633 bölgelerinin fosforilasyonu hala araştırılmaktadır. Bununla beraber Serin 1114 ve özellikle Threonin 495 aminoasit kalıntısının fosforilenmesi eNOS enzim aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Matsushita ve ark., 2001; Sessa, 2004).

2.1.3 Eritrosit Aracılı Kontrol

Kan dokusu, plazma denilen sıvının içerisinde, minareller, proteinler, glikoz ve hormonların yanı sıra kanın şekilli elemanlarını (eritrositler,trombositler,lökositler) içeren karmaşık bir süspansiyondur. Organizmaların yaşamsal fonksiyonlarını sorunsuz sürdürebilmesi için vücut sıcaklığını, iç ortamın pH'ı ve elektrolit konsantrasyonunu fizyolojik sınırlar içinde ayarlanmasını sağlar. Ayrıca kan dokusu, akışkan bir yapıya sahiptir ve bu özelliğinden dolayı diğer tüm hücrelerden farklıdır. Kanın şekilli elemanlarından olan eritrositler %45'lik bir konsantrasyonla kanda en bol bulunan hücre tipidir. Bu yüksek konsantrasyon sebebiyle de, kanın reolojik davranışının

çoğunlukla eritrositler tarafından düzenlendiği düşünülmüştür. Eritrositlerin temel görevi akciğerler ve dokular arasında solunum gazlarını taşımaktır. Bir diğer yandan ise hücresel faaliyetler için gerekli olan besin maddelerini ilgili dokulara iletmekle görevlidirler.

Yapılan çalışmalar arttıkça eritrositlerin solunum gazlarını taşımasının yanı sıra, içerdiği enzimatik mekanizmalar sayesinde hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda rol aldığı gösterilmiştir. Fizyolojik mekanizmalar arasında, kan viskozitesinin ve kan akışkanlığının kontrolünün yanı sıra lokal kan akımının kontrolü yer almaktadır (Ellsworth ve ark., 1995a; Saldanha, 2016; Sprague ve ark., n.d.-b) Kan akımının lokal düzenlenmesinde ‘eritrosit aracılı kontrol’ literatürde en son tanımlanan mekanizmadır. Yapılan araştırmalara göre eritrositlerden NO ya da NO biyoaktivitesine sahip moleküller ve ATP salınımı bu mekanizmaya dayanmaktadır (Ellsworth ve ark., 1995a) Eritrositlerden salınan bu sinyal molekülleri hipoksi ve mekanik stres koşullarında aktive olup düz kasta gevşemeye ve kan akımında artışa neden olmaktadır. Bu moleküller özellikle hipoksik koşullarda salındığı için bu olay literatürde hipoksik vazodilatasyon olarak geçmektedir (Allen ve ark., 2009)

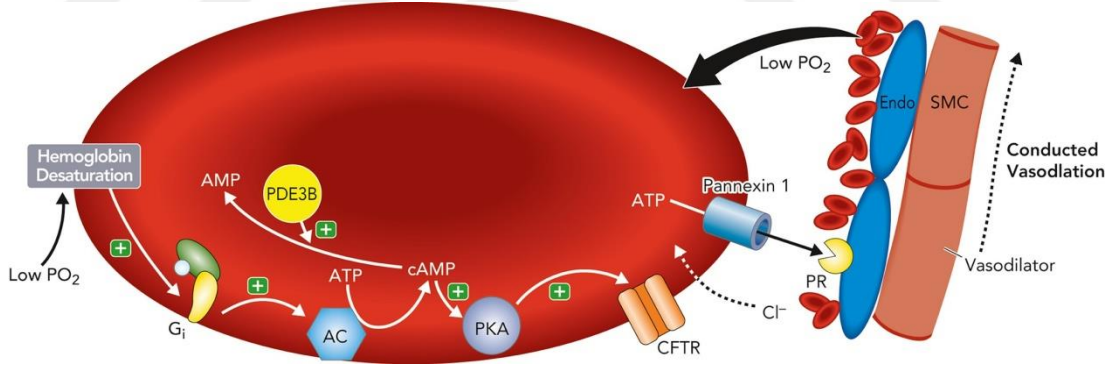
Eritrositlerden ATP Salınımı

Eritrositlerden salınan vazoaktif moleküller 2’ye ayrılır. Bunlar ATP ve NO’dur (Diesen ve ark., 2008; Jia ve ark., 1996; Kulandavelu ve ark., 2015). Bu moleküller arasından ilk keşfedilen mekanizma ise eritrositlerden ATP salınımıdır. Adenozin trifosfat, tüm yaşam formlarında bulunan önemli bir enerji molekülüdür. ATP'nin hücre içi konsantrasyonu 1 ila 10 uM'dir. 1992 yılında Forrester ve arkadaşları eritrositlerin kısa bir süre hipoksik/hiperkapnik ortama maruz kaldığında ATP salındığı bulunmuştur (Bergfeld & Forrester, 1992; Helms ve ark., 2018).

RBC'ler ATP havuzu görevi görür. RBC'lerden salınan ATP, hipoksi, mekanik deformasyon ve shear strese yanıt olarak periferik vasküler tonusun bir aracısı olarak kabul edilir. ATP, endotel hücreleri üzerindeki ilgili reseptörlerine bağlanarak birtakım gevşetici faktörlerin sentezi ve salınımı yoluyla vazodilatasyona neden olur. ATP'nin hücre içi konsantrasyonunu korumak için bu mekanizma, hem pozitif hem de negatif geri besleme düzenleyicileri tarafından modüle edilir. Eritrositlerin bu görevi doku

perfüzyonu için gerekli bir mekanizmadır (Wan ve ark., 2008; H. Zhang ve ark., 2018b). ATP etki mekanizmasını endotel hücreleri üzerindeki purinerjik P2Y reseptörlerine bağlanarak gösterir. P2Y reseptörleri, hücre içi çeşitli mekanizmaları düzenleyip, ikincil habercileri aktive eden G-q proteinlerine bağlı reseptölerdir. RBC'lerden salınan ATP, endotel hücreleri üzerindeki G-protein bağlı purinerjik P2Y reseptörüne bağlanır. P2Y reseptörü aktivasyonu ardından PLC aktivasyonu gerçekleşir. PLC aktivasyonu ise IP3 yapımını artırdıktan sonra endotel hücrelerinde endotelial nitrik oksit sentezi gerçekleşir ve sentezlenen NO düz kasa difüze olarak vazodilatasyona sebep olur (Ellsworth ve ark., 2016; Marginedas-Freixa ve ark., 2018; Racine & Dinunno, 2019).

ATP, hücre membranından geçemeyecek kadar büyük bir moleküldür. Yapılan araştırmalarla eritrositlerden salınan ATP'nin hücre membranından taşınmasıyla ilgili mekanizmalar arasında, kistik fibrozis gen klor kanalı (CFTR) ve voltaj bağımlı anyon kanalları (VDAC) ve gap junction proteini olan pannexin1 kanalının görev aldığı gösterilmiştir (Şekil 2.3) (Marginedas-Freixa ve ark., 2018).



Şekil 2. 1.Eritrositlerden ATP salınımı.

Eritrositlerin düşük oksijen, shear stres ve mekanik deformasyona maruz kalması sonucunda hemoglobin desatürasyonu ve Gi aktivasyonu ile sonuçlanır. Normal koşullarda glitolitik enzimler hücre membranındaki band 3 proteinine bağlıdır ve genel olarak inaktiftir. Parsiyel oksijen basıncı azalması, shear stres faktörleri bu enzimlerin aktifleşerek ATP salınımında rol oynadığı bilinmektedir. Hemoglobin-oksijen satürasyonun düşmesiyle hücre membranında bulunan inhibitör G proteinlerinin beta

subünitesi aktifleşir ve beta subünitesi adenilat siklazı aktifleştirir. AC ise ATP'den cAMP'yi oluşturur. cAMP deki bu artışlar, PKA'yı ve ardından CFTR'yi aktive eder. PKA ATP kanallarının açılıp hücre içinden hücre dışına ATP salınımına neden olur (Şekil 2.3). ATP salınımının bu mekanizmalara ek olarak eritrositlerin hücre membranında yer alan transmembran proteini olan pannexin 1 kanalları da rol oynamaktadır. Diğer bir heterotrimerik G proteinleri olan stimülatör G ptoteini adrenerjik reseptörlerin ve prostasiklin konsantrasyonlarına paralel bir şekilde hücrede cAMP artışı ile ilgili hücreden ATP salınımı gerçekleştiği gösterilmiştir (Bergfeld & Forrester, 1992; Helms ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2018b).

Eritrositlerden NO ve NO Biyoaktivitesine Sahip Moleküllerin Salınımı

Memeli vücunda bulunan önemli vazodilatör ajanlarından biri olan nitrik oksit, NOS enzimleri tarafından üretildiği bilinmektedir. Özellikle vasküler hemostazında önemli bir yeri olan endotelial nitrik oksit sentaz enziminin (Ellsworth ve ark., 1995b) yanı sıra, eritrositlerinde dolaşımdaki nitrik oksit havuzuna katkıda bulunduğu geçmişte yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Kleinbongard ve ark., 2006b). Eritrositlerden NO biyoaktivitesine sahip moleküllerin salınımında rol oynayan mekanizmalardan ilk keşfedileni eritrositlerin nitrit oksidi tüketici etkisi olmuştur. Vasküler işlevin düzenlenmesinde, eritrosit eNOS'unun tek katkısının, hemoglobinin dolaşımdaki NO'ı süpürmesi olduğu zannediliyordu. Bu mekanizmaya göre hemoglobinin oksihemoglobin'e dönüştüğü koşullarda dolaşımdaki nitrik oksit hızlıca tüketildiği bilinmekteydi (Ellsworth ve ark., 1995b; Sprague ve ark., 1996).

Eritrositler NO fizyolojisinde çok önemlidir. Çünkü eritrositler nitrik oksit'i 3 farklı şekilde metabolize eder:

Tüketici etkisi: Eritrositlerdeki nitrik oksit, oksihemoglobin (HbO₂) tarafından methemoglobin (metHb) ve nitrat'a dönüştürülerek hızla inaktive edilir. Nitrat daha sonra nitrit'e yıkılır (K. Chen & Popel, 2009; Han ve ark., 2002).

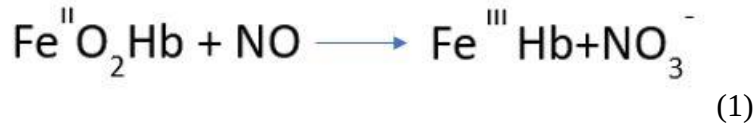
Koruyucu etkisi: Endotel hücrelerinden salınan nitrik oksit eritrosit aracılığıyla hemoglobin ile kompleks oluşturur. Bu olaya literatürde hipoksik vazodilatasyon denir (Kulandavelu ve ark., 2015b).

Oluşturucu etkide ise, deoksihemoglobin, nitrit redüktaz enzimi ile nitrit'i nitrik oksit'e dönüştürüp dolaşıma salar .Ayrıca eritrositlerde bulunan eNOS enzimi L-argininden NO oluşturarak damar düz kasında vazodilatasyona sebep olur (Simmonds ve ark., 2014).

Bu bilgilerin ışığında, son 10 yılda yapılan çalışmalarda kırmızı kan hücrelerinin nitrik oksidin tüketici veya koruyucu etkisinin beraberinde, dolaşıma nitrik oksit salarak kan reolojisine katkısı üstüne odaklanılmışlardır.

Nitrik Oksit Tüketici Etkisi

NO iki milisaniyelik intravasküler yarılanma ömrüne sahip, oldukça reaktif bir molekül olduğundan, uzun bir süre sadece otokrin ve lokal bir etki gösterdiği düşünülmüştür. NO, oksihemoglobin (oksiHb) ile son derece hızlı reaksiyona girerek, methemoglobin (metHb) ve nitrat (NO_3^-) metabolik son ürünler oluşturur. NO'nun NO_3^- 'e oksidasyonu, solunum yolu zehirlenmesine ve nitrozatif strese karşı koruyucudur, ancak patolojik koşullarda bu mekanizma NO üretimini azaltır. Bu nedenle, eritrositler başlangıçta bir NO kaynağı yerine NO tüketicisi olarak kabul edilmiştir (Han ve ark., 2002; Keszler ve ark., 2008).



Nitrik Oksit ve Koruyucu Etkisi

S-nitrosotiol Oluşumu ve Hipoksik Vazodilatasyon

Hemoglobin, Hb'nin NO'ya afinitesini düzenleyen iki allosterik konformasyonda bulunur. Eritrositler pulmoner arterlerden geçerken, Hb iki ila üç oksijen molekülünü bağlar ve R yapısı durumuna geçer (oksihemoglobin). Ayrıca eritrositler , kılcal damarlardan geçerken oksijen salar ve T yapısına geçerek, (deoksihemoglobin) konformasyonunu değiştirir. Bu konformasyonel değişim sırasında hemoglobin R durumunda iken (OksiHb), Hb'nin endotelden salınan NO'ı bağladığı keşfedildi. NO'nun Hb'ye bağlanması reaksiyonu R-durumunda 5.6 kat daha hızlı olurken, T

konformasyonunda ise NO salımının 9.6 kat arttığı araştırmacılar tarafından keşfedilmiştir (Kulandavelu ve ark., 2015b).

Stamler ve arkadaşları 1992 yılında hem endojen hem de eksojen nitrik oksit'in (NO) albümin gibi proteinlerdeki tiollerle reaksiyona girerek vazodilatatör aktiviteye sahip uzun ömürlü S-nitrozotioller (SNO'lar) oluşturduğunu kanıtlamışlardır (Stamler ve ark., 1992). S-Nitrosilasyon, nitrik oksit grubunun, S-nitrozotiol oluşturmak üzere herhangi bir proteinin sistein kalıntısına kovalent olarak bağlanmasıdır. Yapılan çalışmalara göre, oksijenin hemoglobindeki hem demirlerine bağlanması, nitrik oksidin sistein kalıntısı $\beta 93$ tortusuna bağlanmasını teşvik ederek S-nitrosohemoglobin oluşturur (HbSNO). S-nitrosohemoglobin, dokunun oksijen ihtiyacına göre nitrik oksit ve oksijen salınımı gerçekleştirir ve bu olaya literatürde hipoksik vazodilatasyon denir. Hipoksik vazodilatasyon mekanizmasının dokunun kan akışının düzenlenmesindeki rolü oldukça fazladır. Bu süreç Hb konformasyonuna bağlıdır. NO için tiol afinitesi R yapısında yüksek, T yapısında düşüktür. Bu hipotez, venöz ve arteriyel RBC'lerde farklı HbSNO konsantrasyonlarının gösterilmesiyle desteklenmiştir (Gladwin & Kim-Shapiro, 2008; Spencer ve ark., 2000).

Nitrik Oksit ve Oluşturu Etkisi

Nitrit İndirgenmesi

Literatürdeki çalışmalara baktığımızda, eritrositdeki Hb'nin sadece dokulara yeterli miktarda oksijen taşımak için bir araç olarak işlev görmediğini, aynı zamanda bir oksijen sensörü ve oksijene duyarlı nitrik oksit (NO) sinyal dönüştürücü olarak işlev görüp böylece vasküler tonu düzenlediğini göstermektedir.

NO, kan akışının, kan basıncının ve vasküler hemostazının merkezi düzenleyicisidir. NO, dolaşım sisteminde endotelial olarak eksprese edilen eNOS enzimi ve eritrositlerdeki eNOS enzimi tarafından üretilir. NO ayrıca oksijensiz hemoglobin de nitrit redüktaz enzimi aracılığıyla intravasküler nitritin (NO^-) indirgenmesiyle de üretilir. NO oluştuktan sonra, çözünür guanilat siklazın heme aktif bölgesine bağlanarak enzimi aktive eder ve GTP 'nin cGMP'ye dönüşümünü katalize eder (Gladwin & Kim-Shapiro, 2008; Spencer ve ark., 2000).

Eritrositlerde NOS Enzimi Aracılığıyla NO Sentezi

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda endotel hücrelerinden salınan nitrik oksitin kardiyovasküler sistemdeki önemi üzerine odaklanılmış olup, dolaşımdaki nitrik oksit kaynağının sadece endotel hücrelerinden kaynaklandığı bilinmekteydi. Eritrositler genel olarak oksijen iletiminin düzenlenmesi, nitrik oksitin dolaşımdan uzaklaştırılması ve çeşitli koşullar altında salınması yoluyla vasküler işlevi düzenler. Gelişmekte olan çalışmalarda NO metabolizması ve endotel hücrelerinin fonksiyonunun parakrin regülasyonunda kırmızı kan hücrelerinin karmaşık ve önemli rolüne ışık tutan veriler sağlanmaktadır. 2006 yılında ise araştırmacı Petra Kleinbongard'ın yaptığı çalışmada ilk kez eritrositlerden fonksiyonel bir eNOS enziminin olduğu kanıtlanmıştır (Kleinbongard ve ark., 2006c).

Literatüre bakıldığında kalp yetmezliği (Cortese-Krott ve ark., 2022), ateroskleroz endotel disfonksiyonu gibi patolojik durumlarda azalmış NO biyoaktivitesi görülmektedir (Budhiraja ve ark., 2004). Ayrıca, aneminin kalp yetmezliği ve miyokard enfarktüsünde prognozu kötüleştirdiğine dair çalışmalar mevcuttur (Wischmann ve ark., 2020). Verilerin sonucuna göre bu hastalarda endotel kaynaklı ve özellikle RBC kaynaklı NO sentezinde azalma meydana gelmektedir. Eritrositlerde eNOS enzimi hem hücre membranında bulunan kaveola adlı girintintiye yerleşmiş şekilde hem de sitoplazmada bulunmaktadır. RBC eNOS'unun enzimatik aktivitesi kontrol eden fosforilasyon bölgelerinin bulunması aktivitesinin hücre içi kalsiyum ve L-arginin konsantrasyonlarına bağımlılığı açısından endotelial eNOS'una benzer özelliklere sahiptir (Leo ve ark., 2020).

Eritrositlerde NOS ile İlgili Proteinler

Eritrosit kaynaklı eNOS, endotelial eNOS ile karşılaştırıldığında hem ortak hem de farklı düzenleyici mekanizmalara sahiptir. Eritrositler, Golgi kompleksi endoplazmik retikulum, çekirdek gibi normal hücre organellerinden yoksun oldukları için çeşitli eNOS düzenleyici mekanizmalardan yoksun görünmektedir. Eritrosit eNOS enziminin

hücre içindeki lokalizasyonunda ve aktivasyonunda görev alan çeşitli proteinler mevcuttur.

Kalmodulin: Önemli bir Ca^{+2} bağlayıcı protein olan kalmodulin, hücre içi Ca^{+2} seviyelerinin düzenlenmesinden sorumludur. Hücre içi artan Ca^{+2} konsantrasyonu, daha sonra spesifik kinazları indükleyen kalmodulini aktive eder. Kalmodülin, eNOS'un kalmodülin (CaM) bağlanma bölgesine bağlanarak enzim aktivasyonu sağlar ve eNOS aktifleşir (Leo ve ark., 2020; Özüyaman ve ark., 2008).

Hsp90 proteini: Hsp90, hücre döngüsü kontrolü, hücrenin hayatta kalması, hormon ve diğer sinyal yolları dahil olmak üzere birçok hücresel süreçte önemli bir rol oynayan, oldukça bol ve her hücrede bulunan bir moleküler şaperondur. Herhangi bir fizyolojik stres koşulunda %4-6'ya kadar önemli ölçüde artırılabilir. Eritrositlerin hücre içinde oluşan stres koşullarında Hsp90 proteinin koruyucu rolü oldukça önemlidir (Banumathy ve ark., 2003; Ghosh ve ark., 2018).

Kaveolin: Kaveola, endositoz, transsitoz, lipid homeostazı ve sinyal iletiminde anahtar rol oynayan 50-100 nm çapında hücre yüzeyi plazma zarı bağlantılı yapılardır. RBC'lerde caveolin-1 varlığı elisa yöntemiyle bulunmuştur fakat fonksiyonel önemi hala tam bilinmemektedir (Casem, 2016; Leo ve ark., 2020).

Eritrosit eNOS Enziminin Düzenlenmesi

Eritrositler, çekirdek ve hücre organellerinden yoksun oldukları için, endotelial eNOS enzim düzenlenmesinden farklı özellikleri mevcuttur. Eritrosit eNOS enziminin 2006 yılındaki keşfinin ardından bu zamana kadar yoğun bir şekilde araştırmacılar tarafından çalışılmaktadır.

RBC eNOS enzimi hücre içi kalsiyum artışlarıyla ve serin 1177 bölgesinde meydana gelen fosforilasyon ile aktifleşir. Ayrıca hücre içi L-arginin konsantrasyonları da bu enzimin düzenlenmesinde aktif rol oynar. Bunun yanı sıra hücre membran girintisi olan, sifingolipidler ve kolesterolden zengin olan caveola-1 eNOS enzim lokalizasyonunu belirleyerek eNOS enziminin aktivasyonunu belirler (Z. Chen ve ark., 2018; Troiano ve ark., 2021). 2010 yılında Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada mekanik stres'in eritrositlerde eNOS enzimi aktivasyonuna ve ardından NO salınımı ile sonuçlandığı

gösterilmiştir (Ulker ve ark., 2011b). Eritrosit eNOS enziminin farmakolojik uyaranları arasında da insülin ve asetilkolin yer almaktadır (Wilcox, 2005; Zhao ve ark., 2015)

Eritrosit eNOS enziminin aktivasyonunda görev alan mekanik ve farmakolojik uyaranlarının çeşitli patolojik durumlardan dolayı bozulması veya eksikliği, eNOS enziminin eşleşmemesi mevcudiyetini meydana getirmiştir. Yapılan çalışmalara baktığımızda hipoksi ve ROS, arginaz 1 enzim aktivitesi artırarak L-arginin eksikliğine yol açtığı, bunun sonucunda da eritrosit eNOS eksikliğinden ötürü endotel disfonksiyonu indüklediği kanıtlanmıştır (Kolluru ve ark., 2012; Yang ve ark., 2013; Zhuge ve ark., 2023). Yapılan başka bir çalışmada anemi hastalarında plazma nitrik oksit seviyelerinin düşük ve eritrosit sayısının az olmasının, eritrosit eNOS enziminin fonksiyonunda bozulmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada ise araştırmacılar RBC'lerdeki eNOS'un vasküler eNOS'tan bağımsız olarak kan basıncı homeostazına, doku perfüzyonuna ve sistemik dolaşımdaki NO biyoyararlanımına etkili bir şekilde katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (Cortese-Krott ve ark., 2012; Cortese-Krott & Kelm, 2014; Daiber & Münzel, 2020). Ayrıca kırmızı kan hücreleri, kardiyak iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Settergren ve ark., 2009). Ek olarak 2021 yılında laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada Pulmoner arteriyal hipertansiyon(PAH) hastalarında ROCK yolağının negatif düzenlemesi nedeniyle RBC eNOS aktivitesinin azaldığına dair ilk kanıtlar gösterilmiştir. PAH hastalığının ilerlemesinde artan ROCK aktivitesi göz önüne alındığında, ROCK inhibisyonu endotelial eNOS'a ek olarak RBC eNOS yoluyla NO biyoyararlanımını etkilediği gösterilmiştir (Basarici ve ark., 2020). Eritrosit eNOS enziminin, kan akımına ve vasküler tonusun düzenlenmesine katkısından ötürü ilerleyen zamanlarda yapılan çalışmalarla kardiyovasküler hastalıkların çözümüne ışık tutacaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalı laboratuvarlarında yapılan bu çalışmada 8-10 haftalık toplam 30 adet erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Ünitesinden temin edildi. Sıçanlar, $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ olan ve 12 saat gün ışığı - 12 saat karanlık periyodu uygulanan bir odada tutulup, Ad libitum ticari sıçan yemi tüketimine bırakıldılar. Tüm sıçanlar feda edilene kadar iki günde bir su tüketimleri ve haftada bir ağırlık ölçümleri yapıldı. Wistar Albino sıçanlarından elde edilen aort segmentleri organ banyosuna asılarak, Krebs veya eritrosit süspansiyonu içeren koşullarda ATP'ye cevaben gelişen damar yanıtları incelendi. Damar yanıtları damar banyosunda bulunan solüsyonunun özelliklerine göre aşağıda belirtilen 3 farklı koşulda değerlendirildi:

- 1.Sadece Krebs solüsyonu varlığında
- 2.Sağlıklı eritrosit süspansiyonu varlığında (%40 Hematokrit, Krebs Solüsyonu içinde)
- 3.Gebe eritrosit süspansiyonu varlığında (%40 Hematokrit, Krebs Solüsyonu içinde)

Bu koşullar altında deneyler, non-spesifik NOS inhibitörü (L-NAME), eNOS substratı (L-arjinin), Arjinaz inhibitörü (ABH) ve P_{2x} purinerjik reseptör antagonist PPADS varlığında tekrarlanmıştır.

3.1 Kan Örneklerinin Toplanması

Deneylerimizde, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine başvuran sağlıklı bireylerden ve sağlıklı gebelerden rutin tetkikler sırasında alınan kan örnekleri ile gerçekleştirildi. Araştırmaya katılan gönüllülere insan etik kurulunda yazılan maddeler ve aydınlanmış onam formu okutulup izin alındı. Araştırmaya katılan sağlıklı birey ve sağlıklı gebelerden yaklaşık 5 ml venöz kan örneği alındı.

3.2 Eritrosit Süspansiyonlarının Hazırlanması

Örnekler kan alımını takiben hemen değerlendirildi ve her örnek üzerindeki çalışmalar kan alımını izleyen altı saat içinde tamamlandı. Kan örneklerindeki lökositler polysucrose (6.0 g/dl) ve sodium diatrizoate (16.7 g/dl) içeren dansite gradiyenti (Histopaque 1119; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, ABD) kullanılarak uzaklaştırıldı. Buna göre, kan örneği, 50 ml plastik tüp içine konulmuş olan eşit hacimde dansite gradiyenti üzerine tabakalandırıldı, 700 g'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra dipteki eritrosit kitlesinin üzerinde kalan bölüm aspire edilip atıldı. Aspirasyonun ardından dipte çökmüş halde bulunan eritrosit paketi 3 defa Krebs solüsyonunda (NaCl 119 mM, KCl 4.7 mM, NaHCO₃ 24 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, MgSO₄·7H₂O 1.17 mM, CaCl₂ 2.5 mM ve glukoz 11.2 mM) yıkandı. Daha sonra hematokritleri %40 (organ banyosu deneyleri için) ve %0.1 (eNOS aktivitesinin ölçümleri için) olacak şekilde aynı solüsyonda resüspanse edildi. Örneklerden yapılan yayma preparatları boyanarak (Giemsa; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, ABD) ışık mikroskopu altında incelendi ve lökosit bulunmadığı teyit edildi.

3.3 Deney Protokolü

Toplam 30 adet 10-12 haftalık Wistar sıçanlar, bir grupta 15 tane hayvan olacak şekilde 2'li gruplara ayrıldı. Hayvanlar tiyopental sodyum (50 mg/kg, IP) anestezisi altında abdominal aortaları kesilerek kansızlaştırma yoluyla feda edildi. Hızlıca abdomenleri açıldı, torasik aortalar çevresindeki dokulardan uzaklaştırılarak çıkartıldı. İzole edilen damar buz üzerinde bekletilen soğuk Krebs Solüsyonu içeren behere konuldu mikrodiseksiyon için hazır hale getirildi. Daha sonra torasik aort segmentleri petri kabına iğneler yardımı ile sabitlendi ve sonraki aşama olan mikrodiseksiyona geçildi. Diseksiyon mikroskobu yardımıyla (OLYMPUS – SZ61) damar segmenti bağ ve yağ dokularından arındırıldı ve organ banyosuna asılacak şekilde 2,2-5 mm'lik halkalar şeklinde kesildi. Kesilen halkalar, organ banyosu hazırlanana kadar soğuk Krebs solüsyonu içinde bekletildi. Damarlar, %95 O₂ %5 CO₂ içeren gaz karışımı ile gazlandırılmış, pH:7.4, sıcaklığı 37° C olan, 10ml Krebs Solüsyonu bulunan organ banyosuna asıldı.

3.3.1 İzole Damarların Asılması ve Stabilizasyon Aşamaları

İzole edilmiş 2-2,5mm'lik sıçan torasik aorta segmentleri izometrik transdusera (FDT 1 A – 10 MAY) 'a bağlı gergin bir ipin ucunda ki üçgen şeklinde olan çelik tele dikkatlice asıldı. Damar lümenine zarar verilmemeye özen gösterildi. Daha sonra damar halkaları 1 gram istirahat gerimi altında 30 dk'da bir yıkanarak 60 dk dinlenme periyoduna bırakıldı. 1 saat stabilizasyonun ardından banyolardaki Krebs Solüsyonu değiştirildi, bazal değerler kaydedildi. Bir saatlik istirahat geriminin (dinlenme periyodunun) ardından damarlara ön-uyarılma safhası olan vitalizasyon aşaması uygulandı. Bu işlem için 20 mM Potasyum Klorür (KCl) içeren Krebs solüsyonunu uyguladıktan sonra, organ banyosundaki KCl içeren Krebs solüsyonu değiştirilip normal krebs solüsyonu koyuldu. 10^{-7} M konsantrasyonunda Phe [(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride, Sigma P6126, St. Louis, USA] eklendi. Vitalizasyon işleminden sonra damarlar Krebs ile yıkandı, 30 dakikalık ek dinlenme periyoduna geçildi. Dinlenme periyodundan sonra endotel sağlamlığına bakıldı.

3.3.2 Endotel Cevabı

Endotel cevabına geçilmeden önce banyolardaki krebs solüsyonu değiştirildi. Dinlenme periyodu bittikten sonra endotel tabakasının sağlamlığını kontrol etmek için organ banyosuna ilk olarak 10^{-6} M konsantrasyonunda Phe ilave edildi. Kasılma yanıtları kaydedildikten sonra 10^{-6} M konsantrasyonunda ACh (Acetylcholine chloride, Sigma A6625, St. Louis, USA) ilavesi yapıp gevşeme cevapları kaydedildi. Gevşeme cevaplarının yüzde olarak değerleri kaydedildi ve %60'ın altında gevşeme yapan damarlar deney protokolünden çıkarıldı. Endotel sağlamlığı kontrol edilmesinin ardından bir sonraki deney protokole geçildi.

3.3.3 Damar Banyosunda Uygulanan Deney Protokolleri

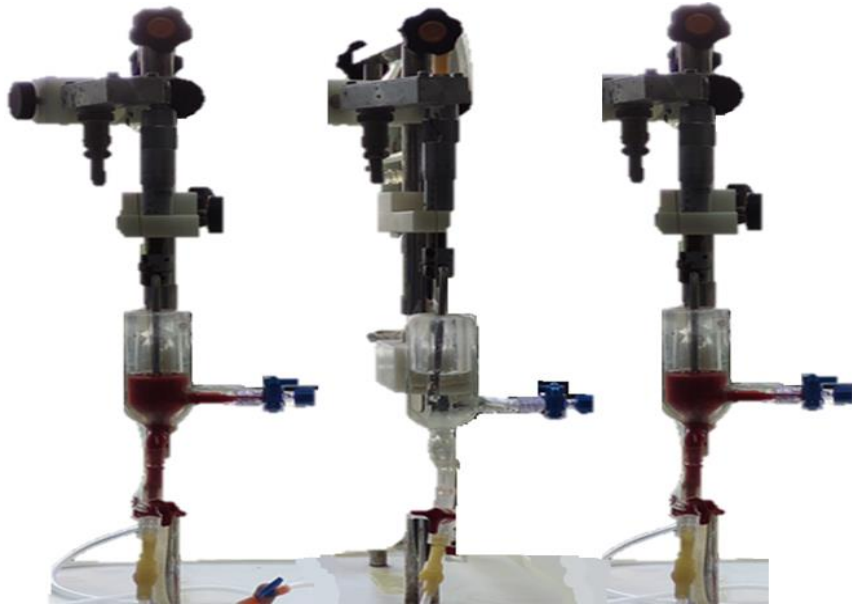
Aşama 1: Bu aşamada amaç damarların eritrosit varlığında ve yokluğunda bazal koşullarda ATP'ye verdikleri yanıtın incelenmesidir. Bu amaçla submaksimal dozda fenilefrin ile kasılan damarları içeren organ banyosuna 10^{-8} - 10^{-4} M ATP eklenecek ve ATP'nin oluşturacağı gevşeme yanıtları izlenecektir

L-arjinin varlığında ATP aracılı gevşeme yanıtlarının incelenmesi: Organ banyolarına, 10^{-3} M dozunda eNOS substratı L-arjinin (L-Arginine monohydrochloride Sigma, A5131, Ann Arbor, Michigan), konulup, 30 dk inkübasyonun ardından ATP aracılı gevşeme yanıtlarına bakıldı.

L-Name varlığında ATP aracılı gevşeme yanıtlarının incelenmesi: Organ banyolarına 10^{-4} M eNOS inhibitörü L-Name (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, Cayman, 80210, Ann Arbor, Michigan) konulup, 30 dk inkübasyonun ardından ATP aracılı gevşeme yanıtlarına bakıldı.

ABH varlığında ATP aracılı gevşeme yanıtlarının incelenmesi: Organ banyolarına, 10^{-4} M arjinaz-I inhibitörü olan ABH (2(S)-Amino-6-boronoheptanoic acid hydrochloride, 6-Borono-L-norleucine hydrochloride) konulup, 30 dk inkübasyonun ardından ATP aracılı gevşeme yanıtlarına bakıldı.

PPADS varlığında ATP aracılı gevşeme yanıtlarının incelenmesi: Organ banyolarına, 10^{-6} M P_{2x} purinerjik reseptör antogonisti PPADS (Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid, Sigma, P178, Ann Arbor, Michigan) koyulup, 30 dk inkübasyonun ardından ATP aracılı gevşeme yanıtlarına bakıldı.



Şekil 3. 1.Organ Banyoları.

3.4 Hücrede NO Oluşumunun Gösterilmesi

Eritrositlerde bazal koşullarda hücre içi NO konsantrasyonunun belirlenmesi için eritrositler NO'ya spesifik bir floresan boya olan 4-amino-5-methylamino- 2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF FM-DA; invitrogen, USA) ile yüklenildi ve ardından NO oluşumu akış sitometri yöntemiyle ölçüldü. Hücrelerin DAF-FM DA ile yüklenmesi için 20 µM DAF-FM DA eritrosit süspansiyonuna eklenildi ve 30 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından eritrosit süspansiyonları 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip hücreye girmeyen boya uzaklaştırıldı. Hepes Solüsyonu ile 2 kez yıkandıktan sonra tekrar aynı solüsyon içinde resüspanse edildi. 30 dakika boyanın hücre içinde esterifikasyonu için beklendikten sonra DAF-FM DA ile yüklenmiş eritrosit süspansiyonları ölçüme hazır hale geldi. Daha sonra tüplere ayrı ayrı L-name, suramin (Suramin sodium salt, Sigma, A2671, St. Louis, USA), PPADS, L-arginin ve nor-NOHA(N-ω-Hydroxy-L-norarginine acetate salt, Bachem,

F-3685, Bubendorf, Switzerland) koyularak 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardında yine her bir tüpe 10^{-4} M ATP koyulup, okunmaya hazır hale getirilmiştir. Daha sonrasında DAF-FM-DA floresansı 495 nm eksitasyon ve 515 nm emisyon dalga boyunlarında ölçüldü.

3.5 eNOS Fosforilasyonunun Gösterilmesi

eNOS'un Serin 1177 Fosforilasyon Düzeyi:

eNOS enzim aktivitesinin bir göstergesi olan enzimin serin 1177 bölgesinden fosforilasyon düzeyleri akış sitometri yöntemiyle incelendi. Eritrositler %45 hct ayarlandıktan sonra, fiksasyon işlemi öncesinde her bir tüpe L-arginin (30 dk inkübasyon), Suramin (30 dk inkübasyon), PPADS (30dk inkübasyon), ile yüklendi. İnkübasyonun ardından her bir tüpe 10^{-4} M ATP eklendi ve 30 dk'lık ATP inkübasyonunun ardından eritrosit süspansiyonundan 10 µL alınarak %0.05 dilüsyonda soğuk glutaraldehit içinde 10 dakika boyunca inkübe edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. İnkübasyonun ardından eritrosit süspansiyonlarının konulduğu tüpün

içine 5 ml PBS eklenerek 200 g'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atılacak ve geriye kalan eritrosit paketine %0.1'lik Triton X-100'den 0.5 ml eklenerek 10 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından eritrosit süspansiyonları tekrar 200 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve eritrosit paketi 0.5 ml HEPES solüsyonu ile resuspanse edildi. Daha sonra eritrositlerin primer antikor ile işaretlenme basamağına geçildi. Bu amaçla her bir örneğin içine serin-1177 bölgesinden fosforlanmış eNOS proteinine karşı geliştirilmiş ve tavşandan izole edilmiş primer antikorlar (Cell Signaling, Boston, USA) eklendi ve eritrositler ile 20 dakika oda ısısında inkübasyonu sağlandı. İnkübasyon periyodunun ardından örnekler 2 ml PBS eklendi ve 200 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Son olarak sekonder antikor ile işaretleme basamağı gerçekleştirildi. Bunun için her bir örnek oda ısısında FITC-konjuge sekonder antikor (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) ile 20 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından örnekler yıkanacak ve akış sitometri analizine geçildi.

3.6 Hücre içi Arginaz I Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Arginaz aktivitesi fotometrik yöntemle, ticari kit kullanılarak ölçüldü (Abcam, ab180877, USA). Bu yöntem ile ilk basamak olarak Standart, Substrat Enzim Karışımı, Developer Enzim, Dönüştürücü Enzim ve oxiRed Prob ekipmanları hazır hale getirildi. Daha sonra Standart eğri hazırlandı. Deproteinizasyon adımı yapıp, hazırlanan örnekler duplike edildi. Standartlar (50 µL), Örnekler (40 µL) ve Background (40 µL) karışımları plate'e koyuldu. Her bir numune ve pozitif kontrol için 10 µL substrat karışımı hazırlandı. Background kontrol karışımı hazırlanarak kuyucuklara koyuldu ve 37°C'de 20 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından Arginaz Reaksiyon mix'i hazırlanarak 96'lık well plate kuyucuklarına koyuldu. Hazırlanan karışım 37°C'de mikropate plaka okuyucusunda 30 dakika süreyle kinetik modda 570 nm absorbans'da ölçüldü. Değerler bir arginin standart eğrisi ile karşılaştırıldı.

3.7 Verilerin Değerlendirilmesi

Deneyisel çalışmada elde edilen veriler GraphPad 8.0 programında değerlendirildi. Bütün sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Ardaşık ölçümlerle elde edilen ajan dozlarındaki kasılma-gevşeme cevapları, tekrarlayan ölçümlerin 2 yönlü varyans analizi

(two-way repeated measures Anova) ile ölçüldü, post-hoc olarak ise Tukey testleri uygulandı. Verilerin normal dağılıma uyup uymadığı kontrol edildikten sonra belirli konsantrasyonların gevşeme yanıtlarında Bağımsız örneklem T testi kullanıldı. Hücre içi NO oluşumu ve fosforile eNOS ölçümü ise Tek yönlü varyans analizi (One Way Anova) kullanıldı. P değerinin 0.05'den küçük ve eşit olan değerler ise istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



4. BULGULAR

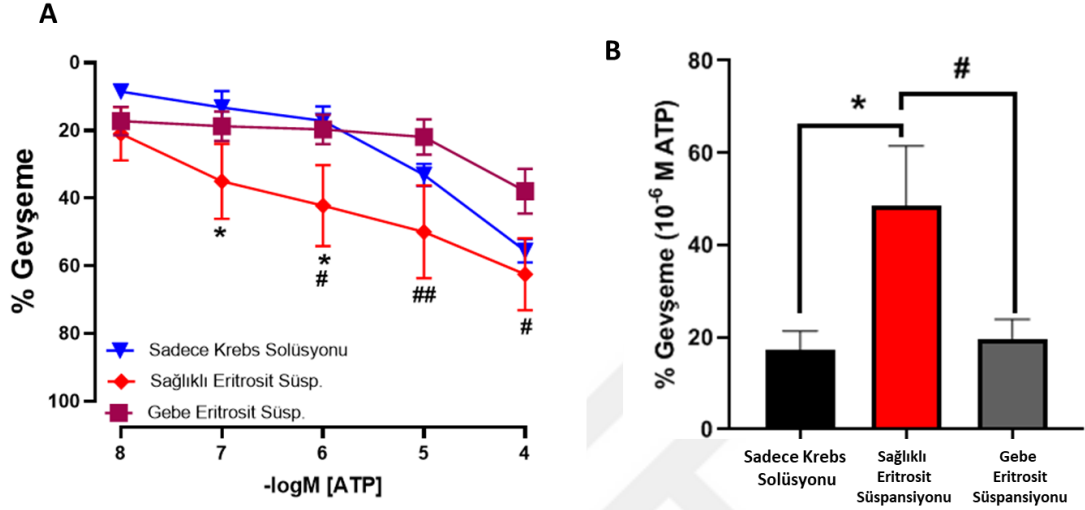
Deneyssel araştırmamızda Ekim 2020 – Kasım 2022 tarihleri arasında Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine başvuran Gebe hastalarının kayıtlı bilgileri veri olarak kullanıldı. Ayrıca çalışmamıza sağlıklı bireylerde eşlik etti. Gebe grubu yaş ortalaması 30.42 ± 1.76 , Sağlıklı kadın grubunun yaş ortalaması 28.08 ± 1.35 idi. Gebe grubu boy ortalaması 165.30 ± 1.99 , Sağlıklı kadın grubunun boy ortalaması 162.10 ± 2.02 idi. Gebelerin kilo ortalaması (70.83 ± 2.92), Sağlıklı kadın grubundan (59.50 ± 1.98) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.05$). Gebelerin (27.35 ± 1.20), VKİ (kg/m^2) ortalaması, Sağlıklı kadın grubundan (22.66 ± 0.67) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Gebe grubu Gravida ortalaması 2.33 ± 0.38 Sağlıklı kadın grubunun Gravida ortalaması 1.75 ± 0.45 idi. Gebe grubu Parite ortalaması 0.92 ± 0.29 ve Sağlıklı kadın grubunun Parite ortalaması 1.33 ± 0.28 idi. Gebe grubu Abortus ortalaması 0.42 ± 0.26 ve Sağlıklı kadın grubunun Abortus ortalaması 0.08 ± 0.08 idi. Gebelerin (34.75 ± 0.79), Gebelik haftası ortalaması, Sağlıklı kadın grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.001$, $p < 0,01$). Gebe grubu sistolik kan basıncı ortalaması 106.70 ± 3.10 ve Sağlıklı kadın grubunun sistolik kan basıncı ortalaması 106.30 ± 3.85 idi. Gebe grubu diyastolik kan basıncı ortalaması 70.42 ± 2.08 ve Sağlıklı kadın grubunun diyastolik kan basıncı ortalaması 70.42 ± 2.42 idi. Gebelerin BUN ortalaması (8.25 ± 0.69), ve Sağlıklı kadın grubunun (13.25 ± 1.18) BUN ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p < 0,01$). Gebelerin (0.62 ± 0.03), kreatinin ortalaması, sağlıklı kadın grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.001$). Gebe grubu ALT ortalaması 14.83 ± 2.45 ve Sağlıklı kadın grubunun ALT ortalaması 13.42 ± 2.20 idi. Gebe grubu AST ortalaması 14.75 ± 1.76 ve Sağlıklı kadın grubunun AST ortalaması 14.33 ± 1.19 idi. Gebe grubu Hemoglobin ortalaması 11.14 ± 0.33 ve Sağlıklı kadın grubunun Hemoglobin ortalaması 11.93 ± 0.26 idi. Son olarak Gebe grubunun idrardaki protein oranı 0.17 ± 0.11 idi.

Tablo 4.1:Grupların Klinik Özelliklerinin Karşılaştırılması

	Sağlıklı (n=12)	3. Trimester Gebe (n=12)
Yaş (yıl)	28,08±1,35	30,42±1,76
Boy (cm)	162,10±2,02	165,30±1,99
Kilo (kg)	59,50±1,98	70,83±2,92*
VKİ (kg/m²)	22,66±0,67	25,92±0,99*
Gravida	1,75±0,45	2,33±0,36
Parite	1,33±0,28	0,92±0,29
Abortus	0,08±0,08	0,42±0,26
Küretaj	0,33±0,26	-
Gebelik Haftası	-	34,75±0,79***
Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	106,30±3,85	106,70±3,10
Diastolik Kan Basıncı (mmHg)	70,42±2,42	70,42±2,08
BUN (mg/dL)	13,25±1,18	8,25±0,69**
Kreatinin (mg/dL)	0,81±0,03	0,62±0,03***
ALT (U/L)	13,42±2,20	14,83±2,45
AST (U/L)	14,33±1,19	14,75±1,76
Hemoglobin (g/dL)	11,93±0,26	11,14±0,33
Trombosit (10³/μL)	270,00±16,30	246,00±19,87
İdrarda Protein	-	0,17±0,11

Dipnot: n: Grupların insan sayıları. Veriler ortalama±S.E.M olarak verildi, One-way ANOVA ve post-hoc test olarak Tukey testi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.1 ATP Aracılı Vasküler Gevşeme Yanıtları

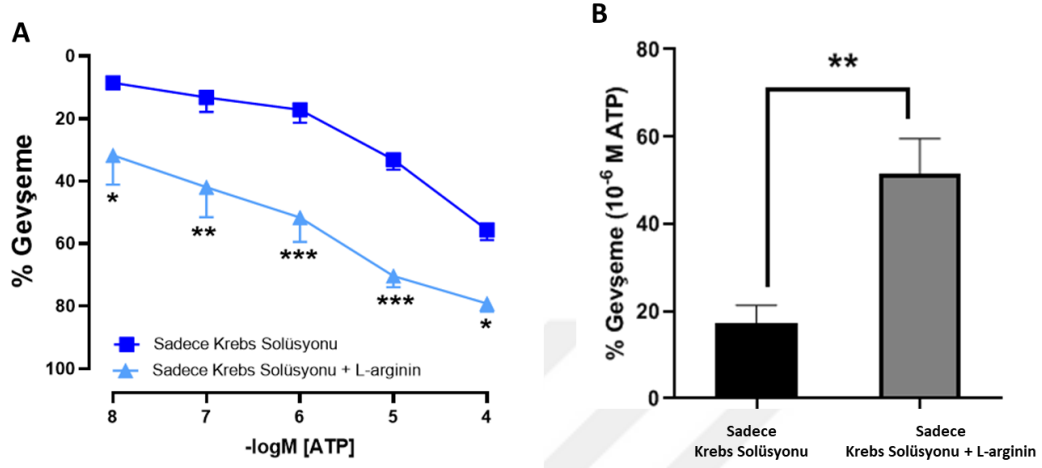


Şekil 4. 1. ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. A. Kümülatif olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) ATP'ye verilen doz-yanıt eğrisi. B. 10^{-6} M ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. (Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonunun, Sadece Krebs Solüsyonundan farkı *: $p<0.05$; Gebe Eritrosit Süspansiyonunun Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonundan farkı #: $p<0.05$ ve ##: $p<0.01$).

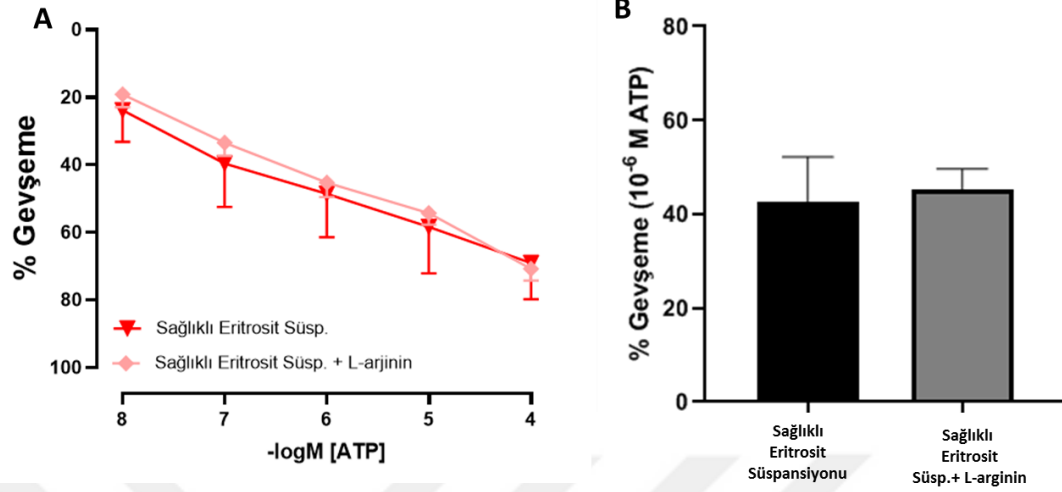
Bu deney prosedüründe torasik aorta segmentleri izole edilip organ banyosuna asılmış ve Krebs Solüsyonu, Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu ve Gebe Eritrosit Süspansiyonu varlığında ATP gevşeme yanıtlarına bakılmıştır. Buna göre Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu bulunan organ banyolarındaki aort segmentlerinin ATP aracılı gevşeme yanıtları, Sadece Krebs Solüsyonu bulunan koşullara göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Yine Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu bulunan organ banyolarındaki aort segmentlerinin ATP aracılı gevşeme yanıtları ise Gebe eritrosit Süspansiyonu bulunan damar segmentlerinin ATP aracılı gevşeme yanıtlarından anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$).

Diğer bir yandan gebe eritrosit süspansiyonu bulunan organ banyolarındaki aort segmentlerinin ATP aracılı gevşeme yanıtları, ise sadece krebs solüsyonu bulunan koşullara göre oluşan ATP aracılı gevşeme yanıtlarında anlamlı fark gözlemlenmemiştir.

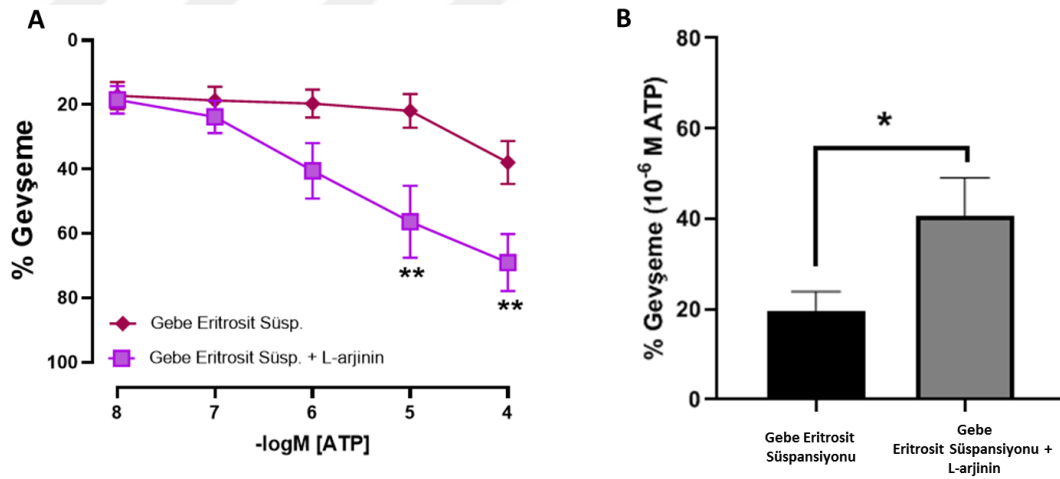
4.1.2 NOS Substratı L-arjinin varlığında ATP aracılı Vasküler Gevşeme Yanıtları



Şekil 4. 2. Sadece Krebs solüsyonu varlığında organ banyosuna NOS substratı L-arjinin eklenmesiyle ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları A.Kümülatif olarak ($10^{-8} - 10^{-4} M$) ATP'ye verilen doz-yanıt eğrisi. B. $10^{-6} M$ ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. (Sadece Krebs solüsyonu+ L-arjinin'in, Sadece Krebs Solüsyonundan farkı *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$).



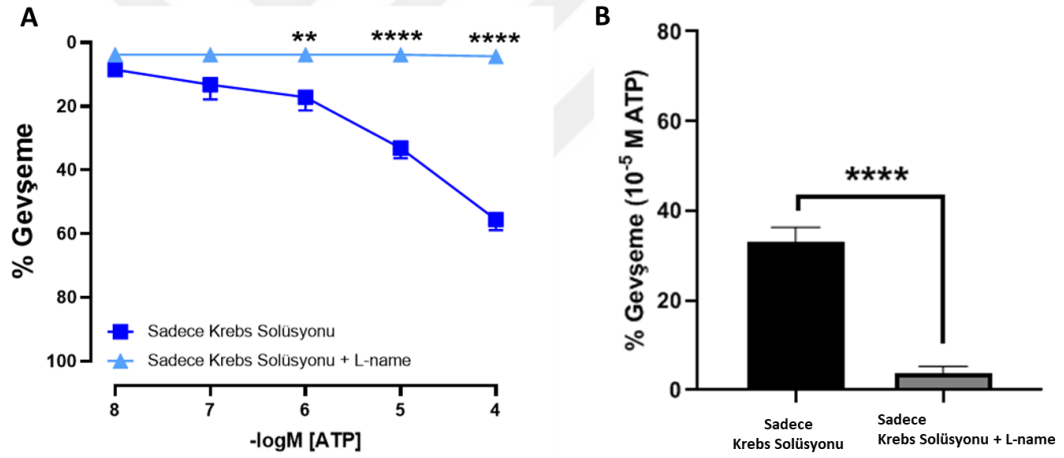
Şekil 4. 3. Sağlıklı Eritrosit varlığında organ banyosuna NOS substratı L-arjinin eklenmesiyle ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. A. Kümülatif olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) verilen ATP'nin doz-yanıt eğrisi. B. 10^{-6} M ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları.



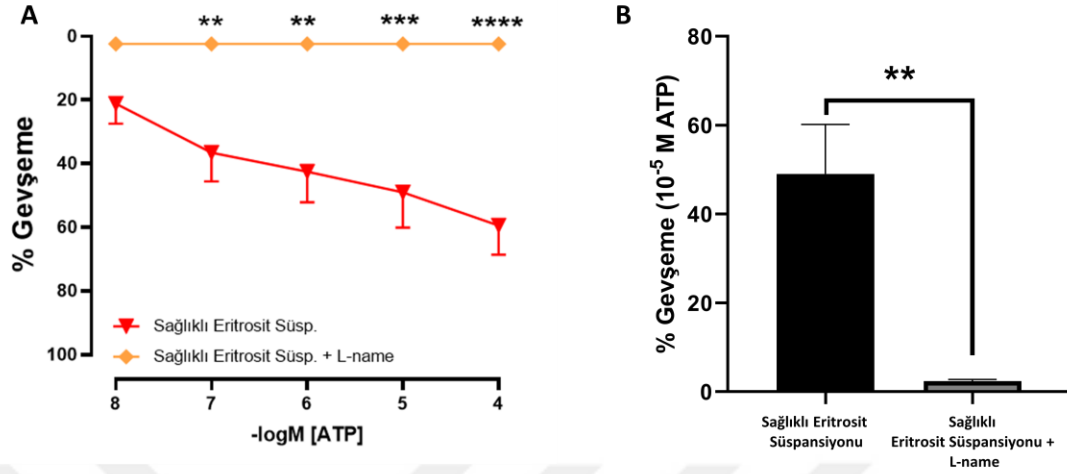
Şekil 4. 4. Gebe Eritrosit varlığında organ banyosuna NOS substratı L-arjinin eklenmesiyle ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. A. Kümülatif olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) verilen ATP'nin doz-yanıt eğrisi. B. 10^{-6} M ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. (Gebe Eritrosit Süspansiyonu + L-Arjininin, Gebe Eritrosit Süspansiyonundan farkı *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$).

Projede yer alan bir diğer prosedür olan ve NOS substratı L-arginin varlığında ATP aracılı gevşeme yanıtları Krebs Solüsyonu, Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu, Gebe Eritrosit Süspansiyonu gruplarında incelenmiştir. Krebs Solüsyonu, Gebe Eritrosit Süspansiyonu içeren organ banyolarındaki aort segmentlerinin ATP'ye cevaben oluşturduğu gevşeme yanıtları L-arginin varlığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterirken, ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$) Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu varlığında L-arginin eklenmesi gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak bir değişikliğe neden olmamıştır.

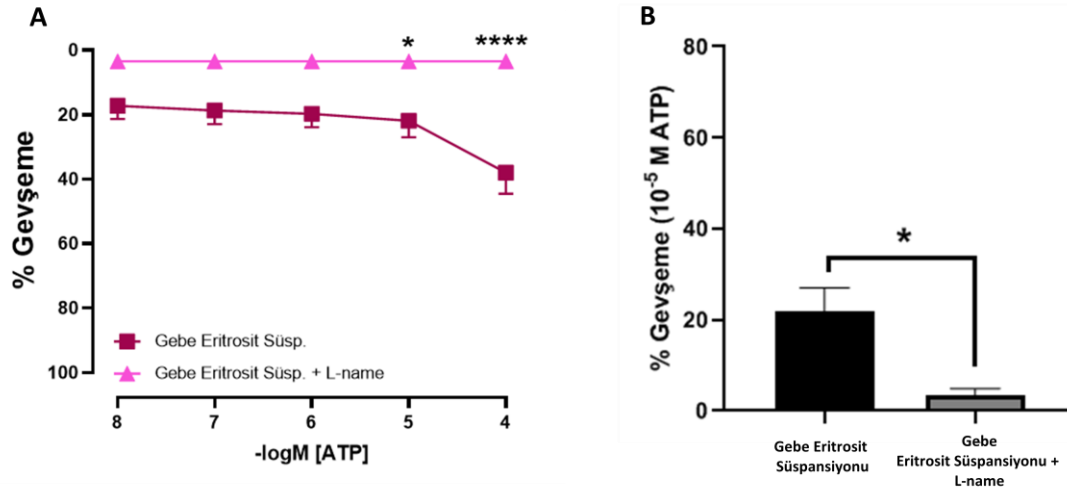
4.1.3 NOS inhibitörü L-name varlığında ATP aracılı Vasküler Gevşeme Yanıtları



Şekil 4. 5. Sadece Krebs Solüsyonu varlığında organ banyosuna NOS inhibitörü L-name eklenmesiyle ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları A. Kümülatif olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) verilen ATP'nin doz-yanıt eğrisi. B. 10^{-5} M ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. (Krebs Solüsyonu + L-name'in, Krebs Solüsyonundan farkı **: $p<0.01$ ****: $p<0.0001$).



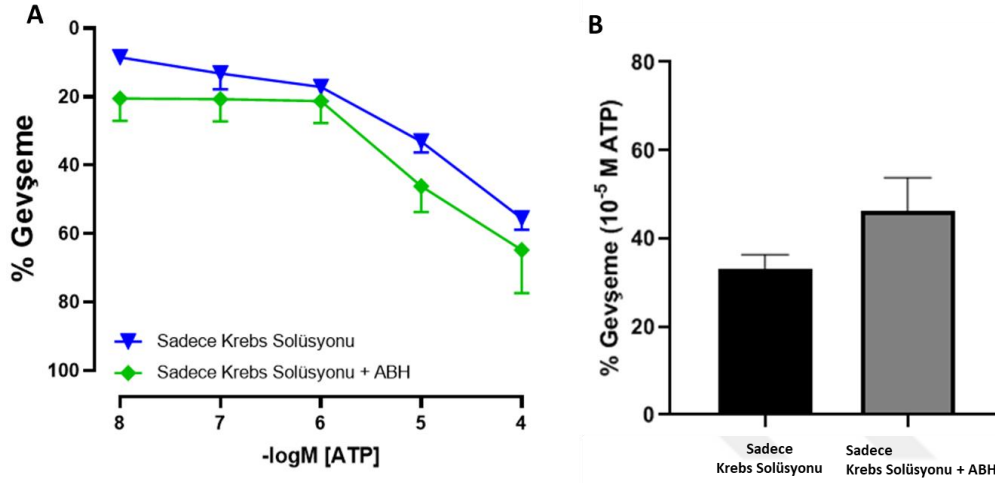
Şekil 4. 6. Sağlıklı Eritrosit varlığında organ banyosuna NOS inhibitörü L-name eklenmesiyle ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları A. Kümülatif olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) verilen ATP'nin doz-yanıt eğrisi. B. 10^{-5} M ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları (Sağlıklı Eritrosit + L-name'in Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonundan farkı **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, ****: $p<0.0001$).



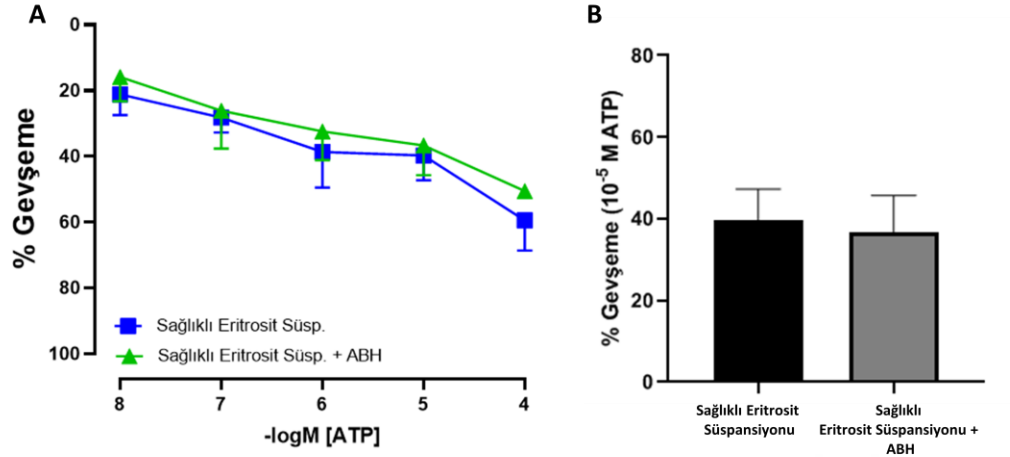
Şekil 4. 7. Gebe eritrosit varlığında organ banyosuna NOS inhibitörü L-name eklenmesiyle ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları A. Kümülatif olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) verilen ATP'nin doz-yanıt eğrisi. B. 10^{-5} M ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. (Gebe Eritrosit Süspansiyonu + L-name'in, Gebe Eritrosit Süspansiyonundan farkı. (*: $p<0.05$, ****: $p<0.0001$).

NOS inhibitörü L-name'in varlığında ATP aracılı gevşeme yanıtları krebs solüsyonu, sağlıklı eritrosit süspansiyonu ve gebe eritrosit süspansiyonu gruplarında incelenmiştir. Tüm gruplarda L-name varlığında, organ banyolarındaki aort segmentlerinin ATP'ye cevaben oluşturduğu gevşeme yanıtları inhibe olmuştur ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$).

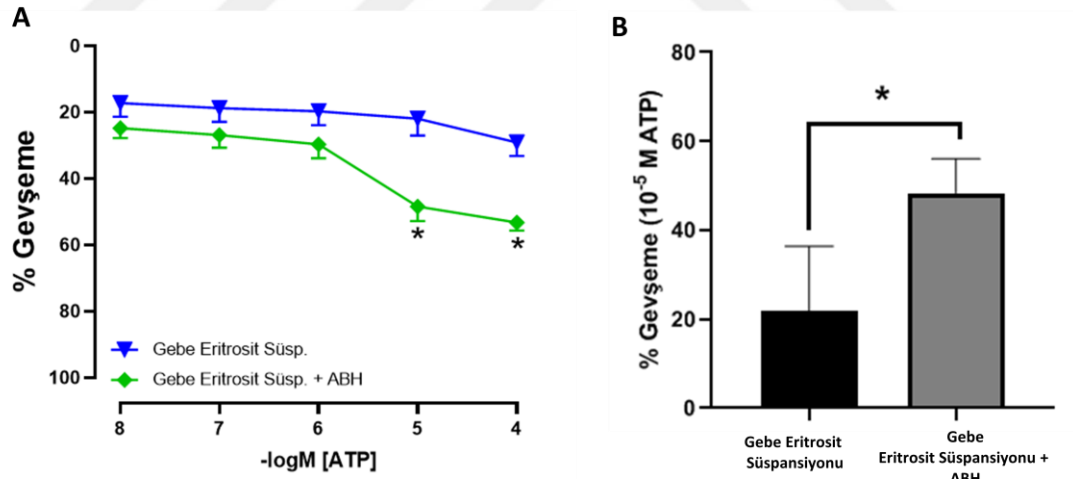
4.1.4 Arjinaz İnhibitörü ABH varlığında ATP aracılı Vasküler Gevşeme Yanıtları



Şekil 4. 8. Sadece Krebs Solüsyonu varlığında organ banyosuna Arjinaz inhibitörü ABH eklenmesiyle ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. A. Kümülatif olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) verilen ATP'nin doz-yanıt eğrisi. B. 10^{-5} M ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları.



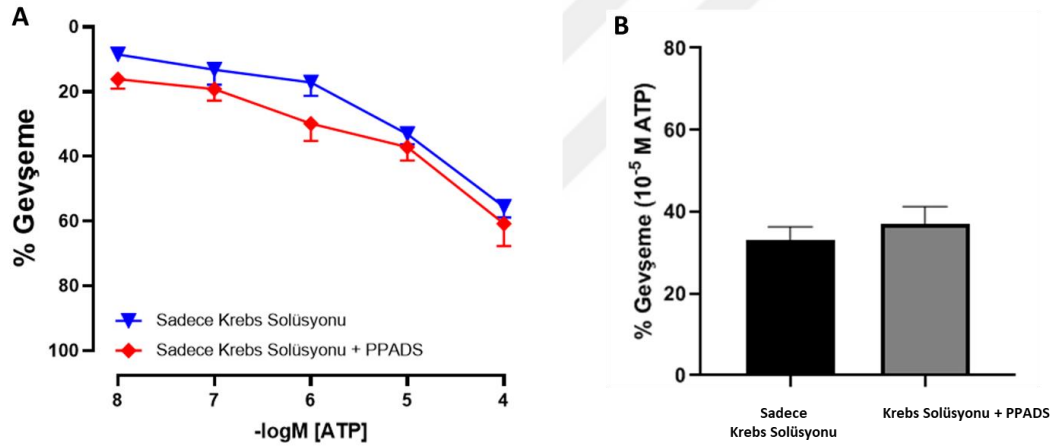
Şekil 4. 9. Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu varlığında organ banyosuna Arginaz inhibitörü ABH eklenmesiyle ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. A. Kümülatif olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) verilen ATP'nin doz-yanıt eğrisi. B. 10^{-5} M ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları.



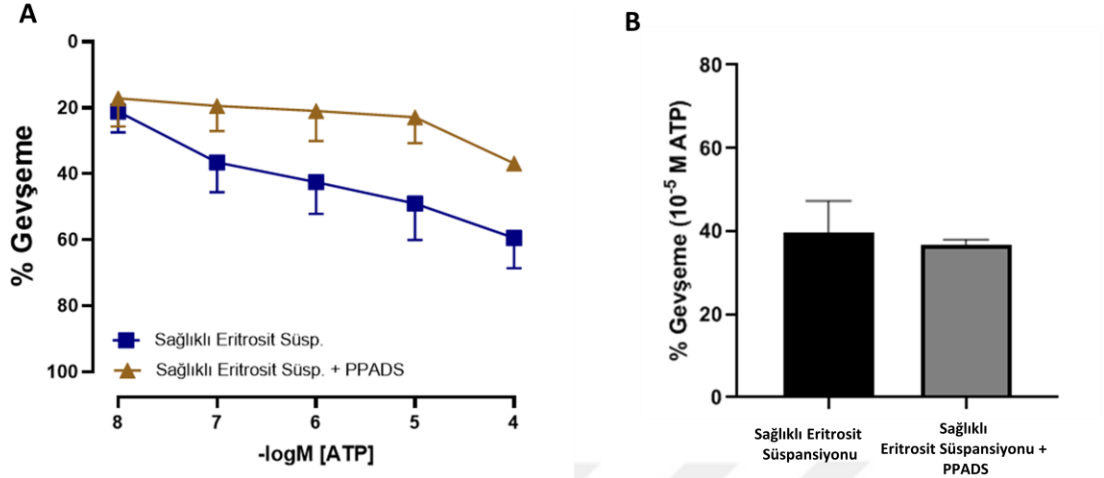
Şekil 4. 10. Gebe Eritrosit Süspansiyonu varlığında organ banyosuna Arginaz inhibitörü ABH eklenmesiyle ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. A. Kümülatif olarak (10^{-8} – 10^{-4} M) verilen ATP'nin doz-yanıt eğrisi. B. 10^{-5} M ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. (Gebe Eritrosit Süspansiyonu + ABH 'ın , Gebe Eritrosit Süspansiyonundan farkı *: $p < 0.05$).

Arginaz inhibitörü ABH'nin varlığında ATP aracılı gevşeme yanıtları Krebs Solüsyonu, Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu ve Gebe Eritrosit Süspansiyonu gruplarında incelenmiştir. Gebe eritrosit Süspansiyonu içeren organ banyolarındaki aort segmentlerinin ATP'ye cevaben oluşturduğu gevşeme yanıtları ABH varlığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterirken ($p<0.05$), Krebs Solüsyonu ve Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu içeren organ banyolarındaki aort segmentlerinin ATP aracılı gevşeme yanıtında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

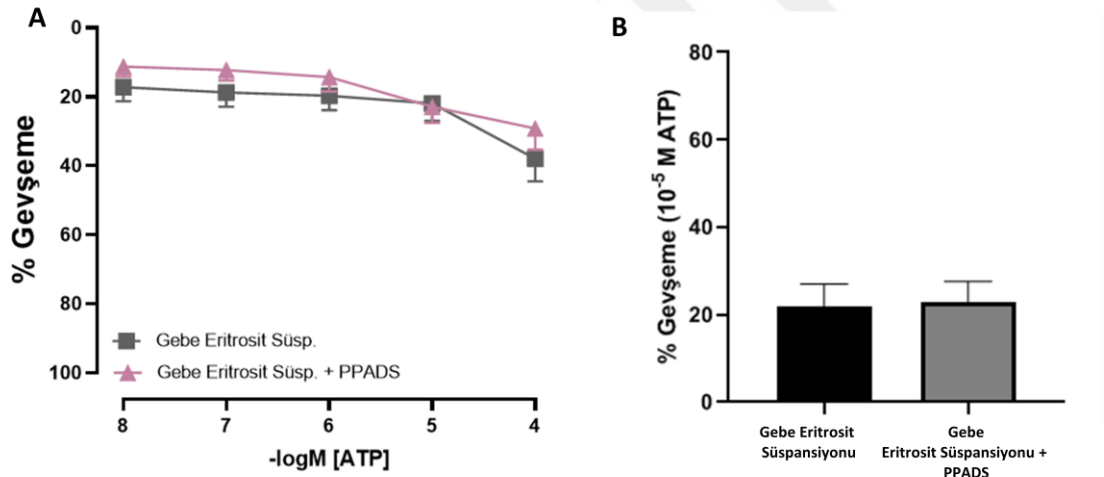
4.1.5 P_{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti PPADS varlığında ATP aracılı Vasküler Gevşeme Yanıtları



Şekil 4. 11. Sadece Krebs Solüsyonu varlığında organ banyosuna P_{2x} purinerjik reseptör antagonisti PPADS eklenmesiyle ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. A. Kümülatif olarak ($10^{-8} - 10^{-4} M$) verilen ATP'nin doz-yanıt eğrisi. B. $10^{-5} M$ ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları.



Şekil 4. 12. Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu varlığında organ banyosuna P_{2x} purinerjik reseptör antagonisti PPADS eklenmesiyle ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. A. Kümülatif olarak (10⁻⁸ – 10⁻⁴ M) verilen ATP'nin doz-yanıt eğrisi. B. 10⁻⁵ M ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları.

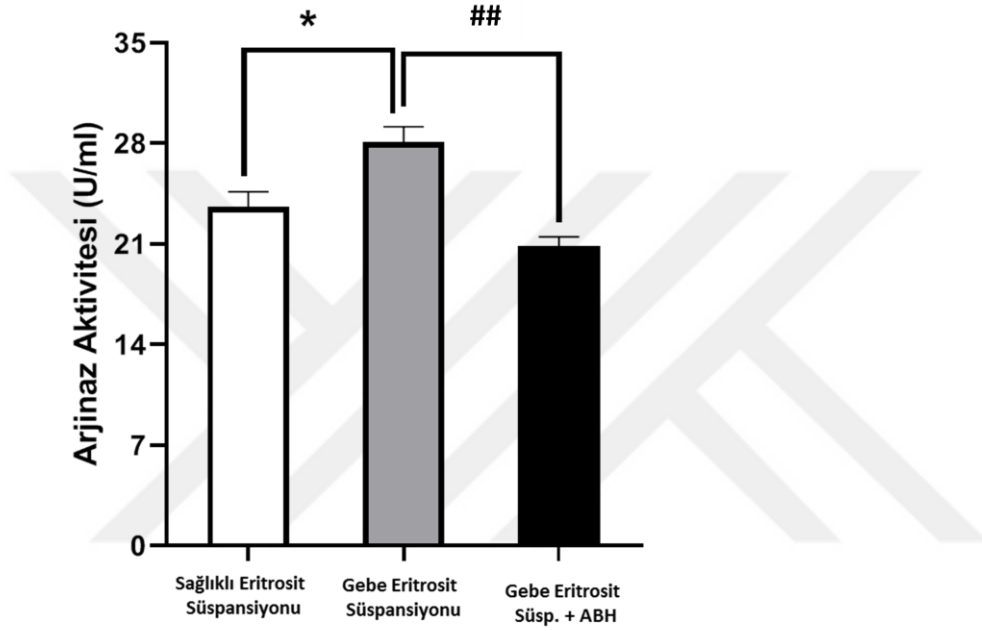


Şekil 4. 13. Gebe Eritrosit Süspansiyonu varlığında organ banyosuna P_{2x} purinerjik reseptör antagonisti PPADS eklenmesiyle ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları. A. Kümülatif olarak (10⁻⁸ – 10⁻⁴ M) verilen ATP'nin doz-yanıt eğrisi. B. 10⁻⁵ M ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtları.

Projeye eklediğimiz ek prosedür olan P_{2x} purinerjik reseptör antagonisti PPADS varlığında ATP aracılı gevşeme yanıtları Krebs Solüsyonu, Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu ve Gebe Eritrosit Süspansiyonu gruplarında incelenmiştir. Krebs

Solüsyonu, Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu ve Gebe Eritrosit Süspansiyonu içeren organ banyolarındaki aort segmentlerinin PPDAS varlığında ATP'ye cevaben oluşan gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmamıştır.

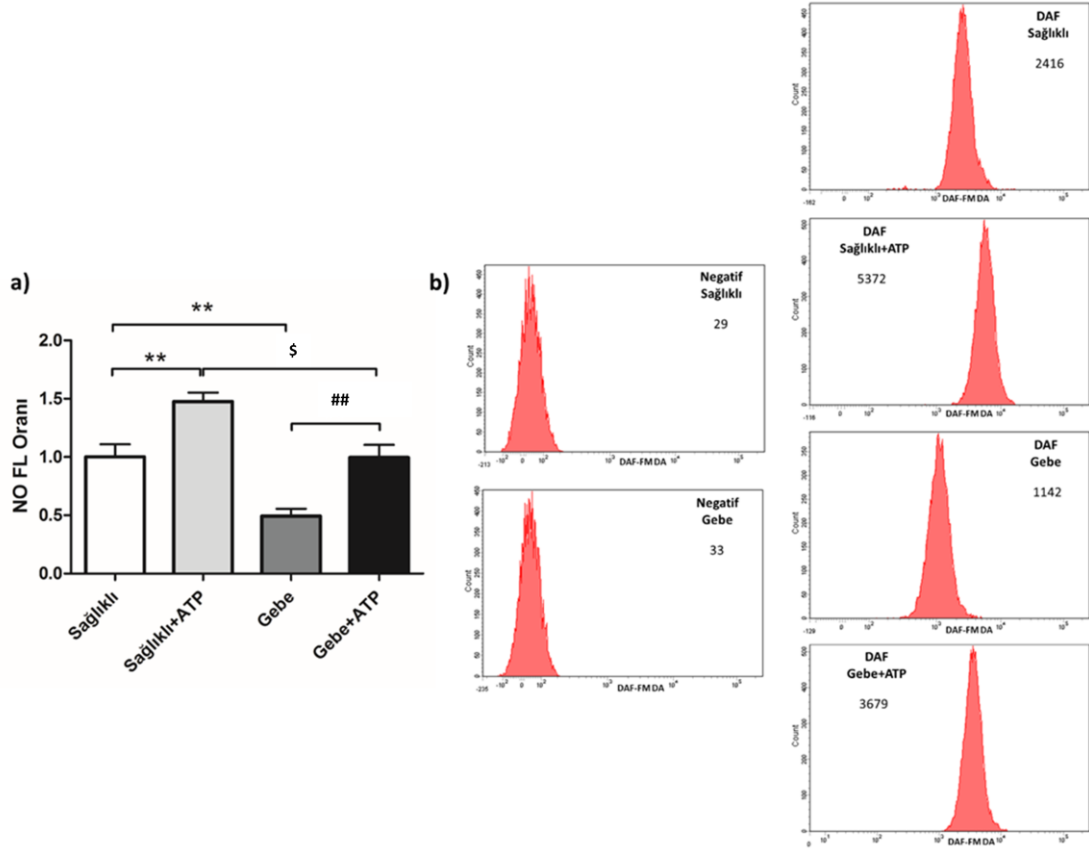
4.1.6 Hücre içi Arjinaz Aktivitesinin Ölçümü



Şekil 4. 14. Gebe ve Sağlıklı Bireylerden elde edilen eritrositlerin Hücre içi Arjinaz aktivitesi. (Gebe Eritrosit Süspansiyonunun, Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonundan farkı; *: $p<0.05$, Gebe Eritrosit Süspansiyonu + ABH'nin Gebe Eritrosit Süspansiyonundan farkı; ##: $p<0.01$).

Bu deney prosedüründe Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu, Gebe Eritrosit Süspansiyonu ve Gebe Eritrosit Süspansiyonu + ABH gruplarında hücre içi arjinaz aktivitesi incelenmiştir. Gebe Eritrosit Süspansiyonunun hücre içi arjinaz aktivitesi, Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonunun hücre içi arjinaz aktivitesinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ($p<0.05$) Ayrıca Arginaz inhibitörü ABH ile muamele edilmiş Gebe Eritrosit Süspansiyonunun hücre içi arjinaz aktivitesi ise Gebe Eritrosit Süspansiyonunun hücre içi arjinaz aktivitesinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. ($p<0.01$)

4.2 Hücrede NO Oluşumunun Gösterilmesi



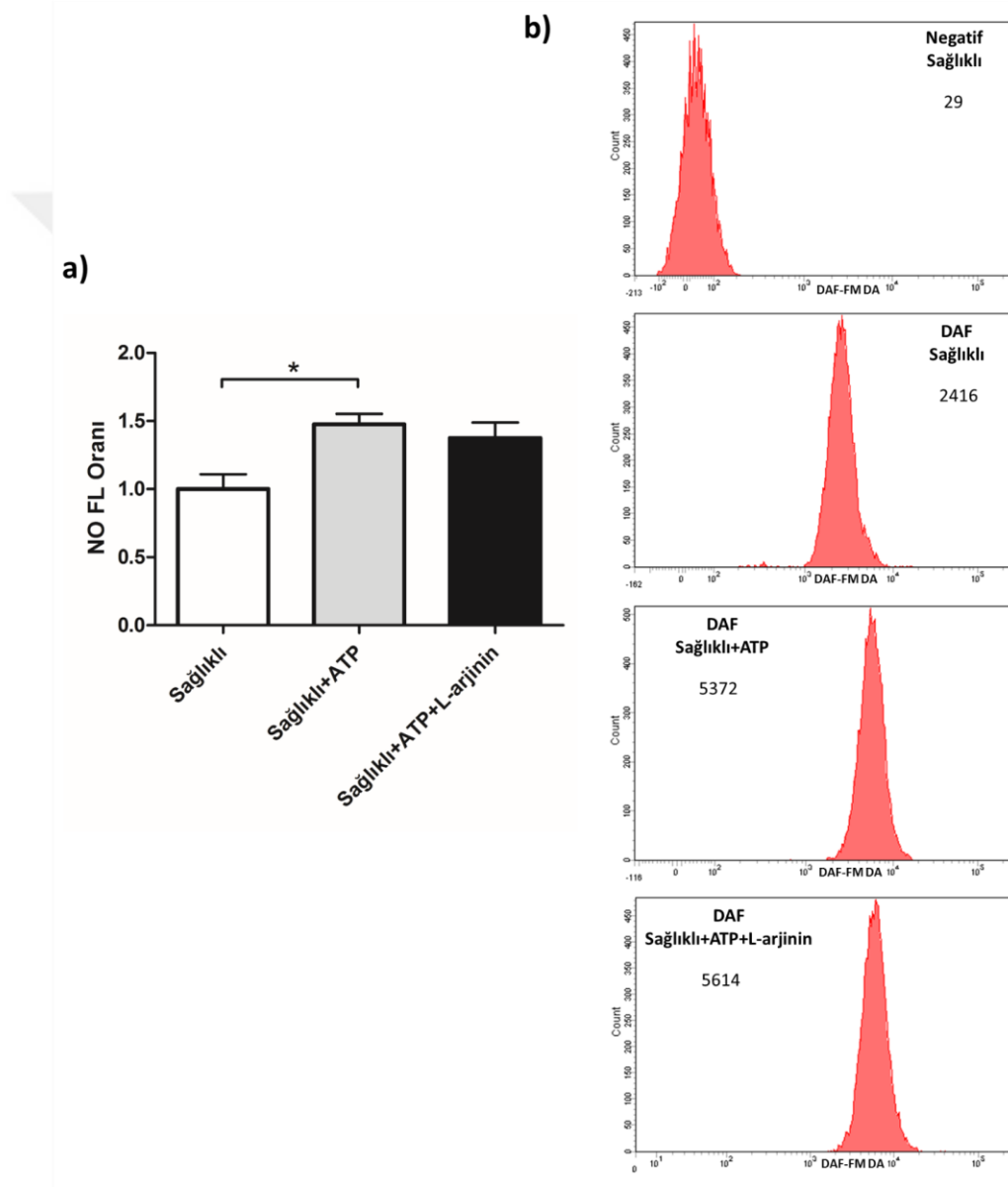
Şekil 4. 15. A. Sağlıklı ve Gebe bireylerinden elde edilen eritrositlere ATP eklenmesinin hücre içi NO oluşumuna etkisi. B. Akış Sitometresi sonuçları. (Gebe grubunun, Sağlıklı grubundan farkı **: $p < 0.01$, Sağlıklı + ATP grubunun, Sağlıklı grubundan farkı **: $p < 0.01$, Sağlıklı + ATP grubunun, Gebe + ATP grubundan farkı \$: $p < 0.05$, Gebe + ATP grubunun, Gebe grubundan farkı ## $p < 0.01$).

Bu deney prosedüründe Sağlıklı bireylerden ve Gebe bireylerden elde edilen eritrosit süspansiyonlarına Ekstrasellüler ATP eklenmesinin hücre içi NO oluşuma etkisi gözlemlendi. Buna göre, Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerdeki NO ışıma oranının, Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerdeki hücre içi NO ışıma oranına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0.01$). Yine, Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlere 10^{-4} M ATP eklenmesiyle oluşan NO ışıma oranın

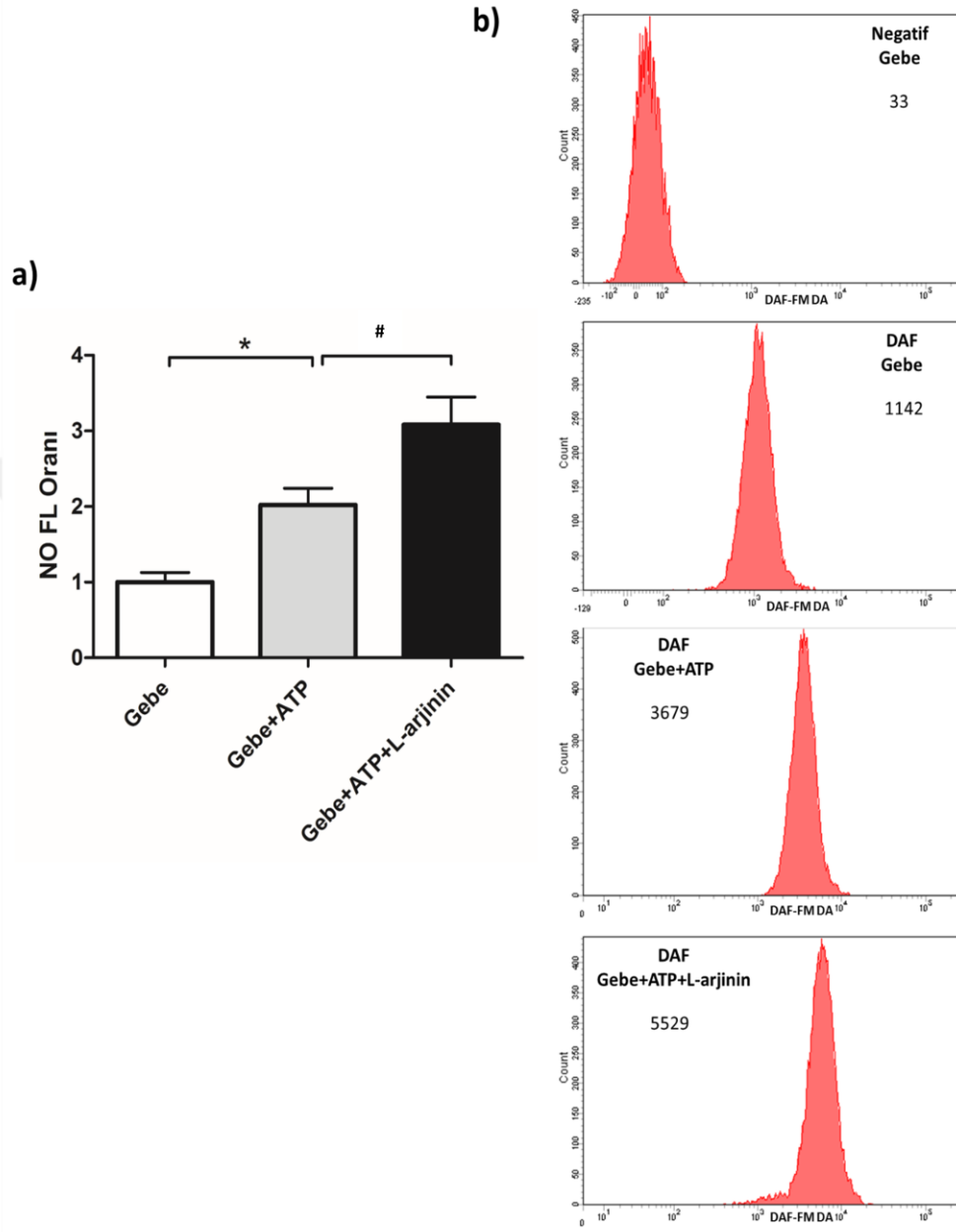
Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerdeki NO ışıma oranına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Gebe bireylerden elde edilen eritrositlere 10^{-4} M ATP eklenmesiyle oluşan NO ışıma oranının, Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlere 10^{-4} M ATP eklenmesiyle oluşan NO ışıma oranına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Son olarak Gebe bireylerden elde edilen eritrositlere 10^{-4} M ATP eklenmesiyle oluşan NO ışıma oranının, Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerdeki NO ışıma oranına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$).



4.2.1 Eritrositlerde ATP ile Uyarılan NO Oluşumuna NOS Substratı L-arjininin Etkisi



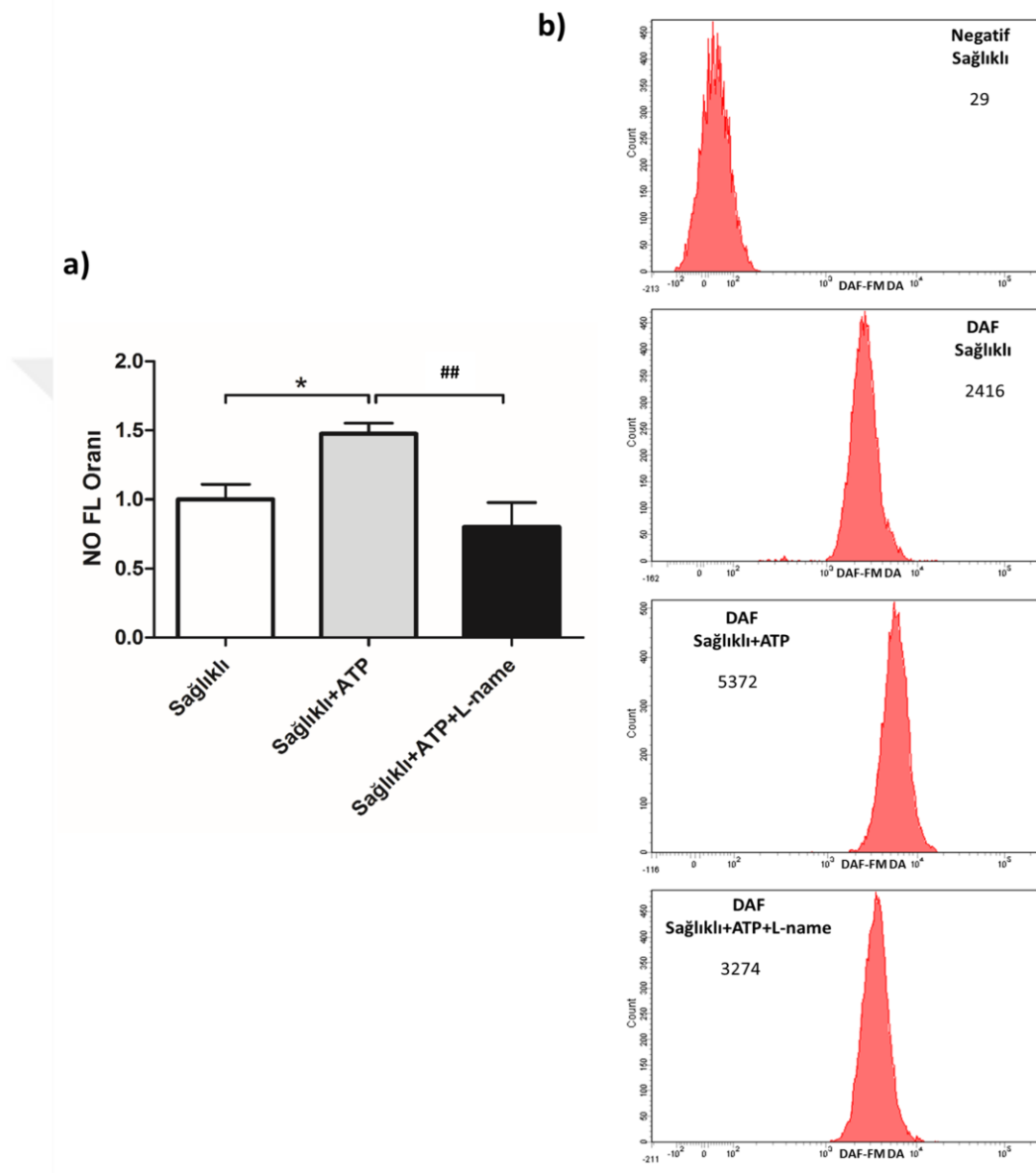
Şekil 4. 16. A. Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerde ATP ile uyarılan NO oluşumuna NOS substratı L-arjininin etkisi B. Akış Sitometresi sonuçları. (Sağlıklı+ATP grubunun, Sağlıklı grubundan farkı: *: $p<0.05$).



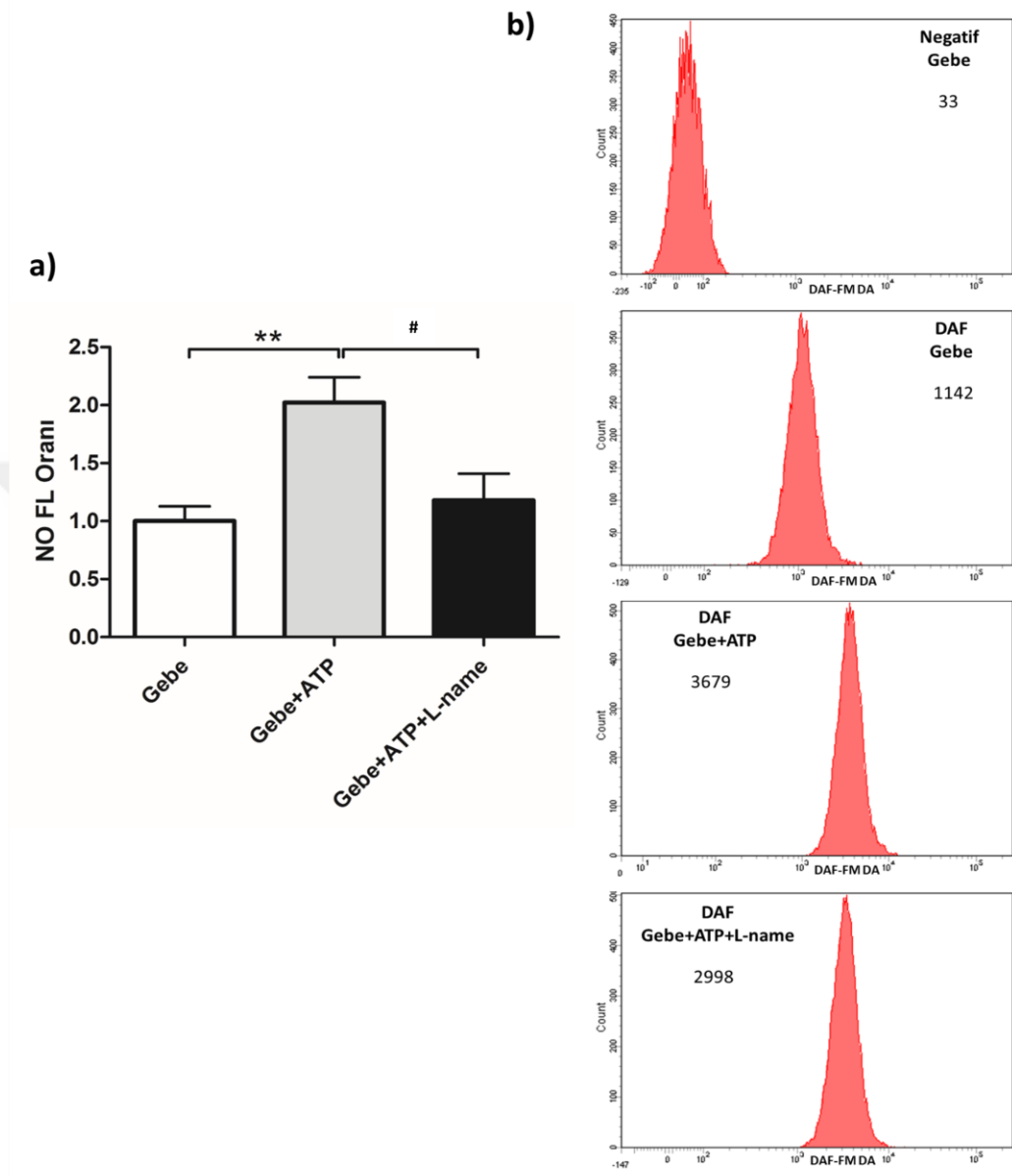
Şekil 4. 17. A. Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerde ATP ile uyarılan NO oluşumuna NOS substratı L-arjininin etkisi B. Akış Sitometresi sonuçları (Gebe+ATP grubunun, Gebe grubundan farkı *: $p<0.05$, Gebe + ATP + L-arjinin grubunun, Gebe + ATP grubundan farkı #: $p<0.05$).

Bu deney prosedüründe Sağlıklı bireylerden ve Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerde ekstrasellüler ATP ile uyarılan NO oluşumuna NOS substratı L-arjininin etkisine bakıldı. İlk olarak Gebe ve Sağlıklı bireylerden alınan eritrositlerin ekstrasellüler ATP ile uyarılması hücre içi NO ışıma oranını istatistiksel olarak anlamlı derecede artırmıştır($p<0.05$). Diğer bir yandan Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerde ekstrasellüler ATP ile uyarılan hücre içi NO ışıma oranı NOS substratı L-arjinin eklenmesiyle istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gözlemlenirken ($p<0.05$), Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerde ekstrasellüler ATP ile uyarılan hücre içi NO ışıma oranına NOS substratı L-arjinin eklenmesi istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır.

4.2.2 Eritrositlerde ATP ile Uyarılan NO Oluşumuna NOS inhibitörü L-NAME'in Etkisi



Şekil 4. 18 A. Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerde ATP ile uyarılan NO oluşumuna NOS inhibitörü L-NAME'in etkisi B. Akış Sitometresi sonuçları (Sağlıklı+ATP grubunun, Sağlıklı grubundan farkı: *: $p<0.05$, Sağlıklı + ATP + L-Name grubunun, Sağlıklı + ATP grubundan farkı: ## $p<0.01$).

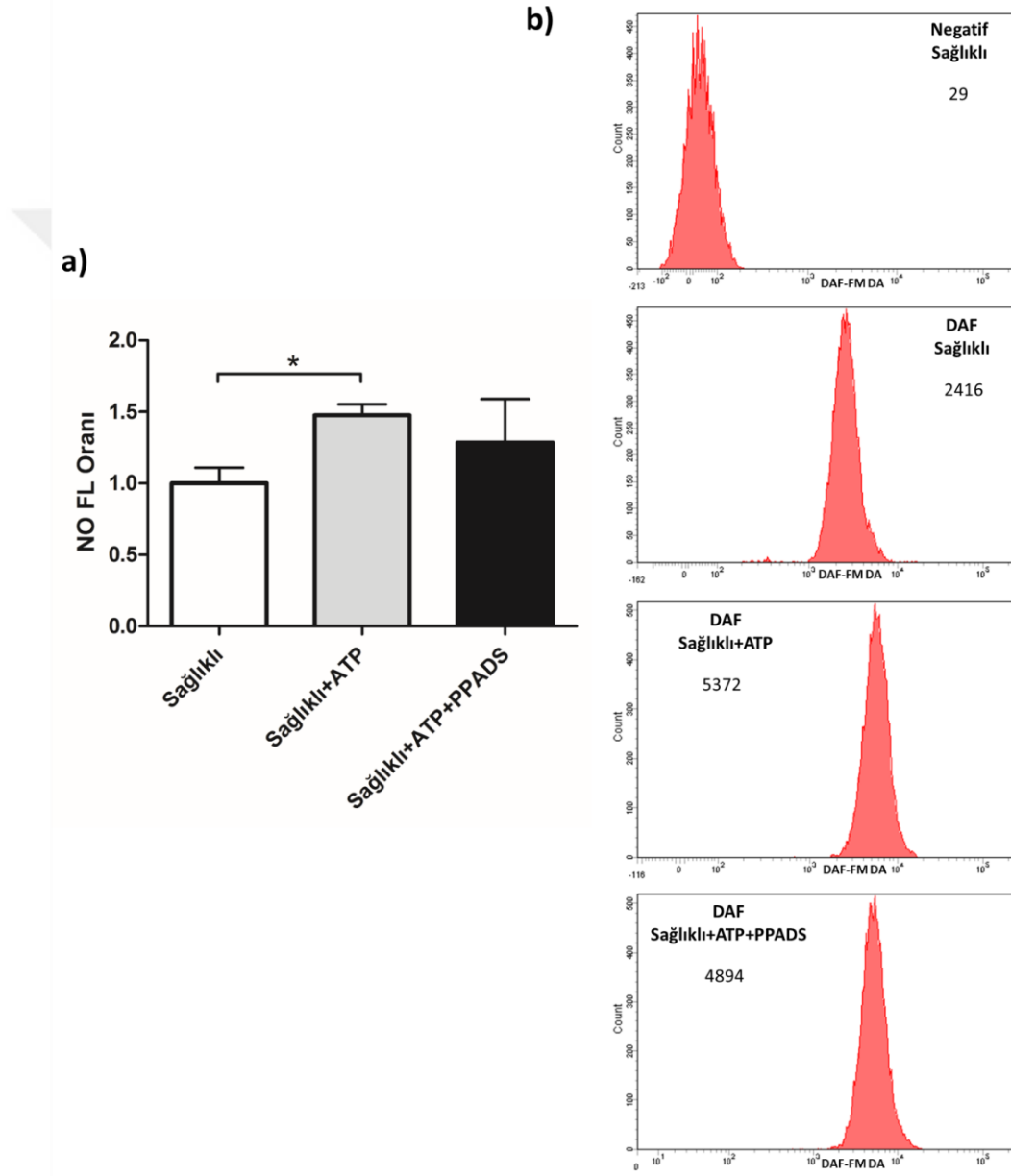


Şekil 4. 19. A. Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerde ATP ile uyarılan NO oluşumuna NOS inhibitörü L-Name'in etkisi B. Akış Sitometresi sonuçları (Gebe+ATP grubunun, Gebe grubundan farkı: ** $p<0.01$, Gebe + ATP + L-arjinin grubunun, Gebe + ATP grubundan farkı #: $p<0.05$).

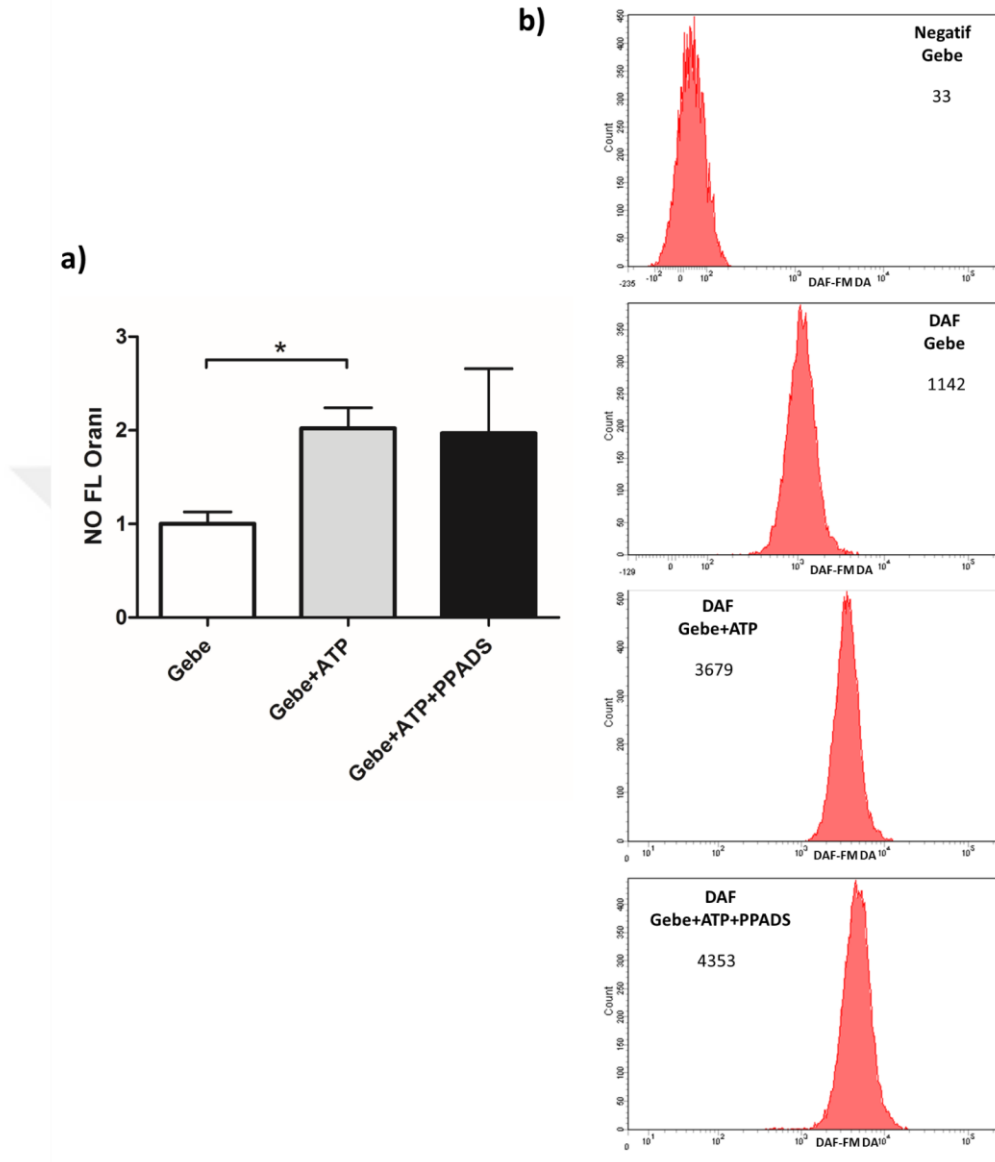
Bu deney prosedüründe Sağlıklı bireylerden ve Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerde ekstrasellüler ATP ile uyarılan NO oluşumuna NOS inhibitörü L-Name'in etkisine bakıldı. Gebe ve Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerde ekstrasellüler

ATP ile uyarılan hücre içi NO ışıma oranı NOS inhibitörü L-Name eklenmesiyle inhibe olmuştur ($p<0.05$, $p<0.01$)

4.2.3 Eritrositlerde ATP ile Uyarılan NO Oluşumuna P_{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti PPDAS'nin Etkisi



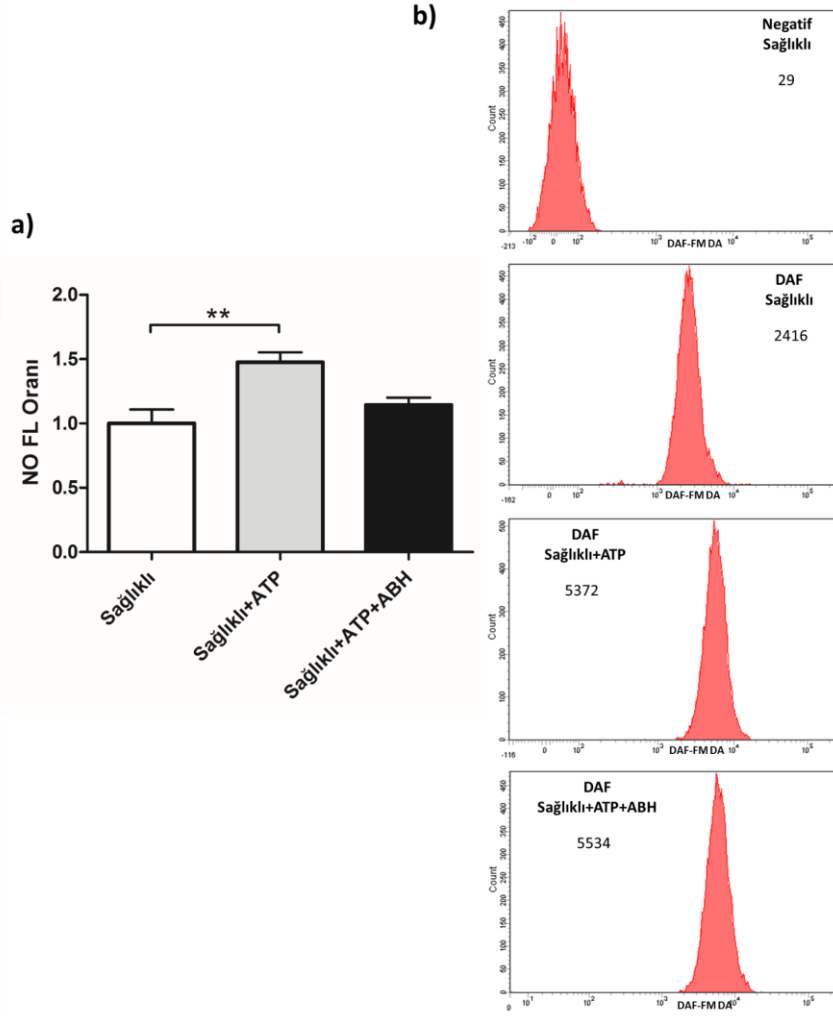
Şekil 4. 20. A. Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerde ATP ile uyarılan NO oluşumuna P_{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti PPDAS'nin etkisi B. Akış Sitometresi sonuçları. (Sağlıklı+ATP grubunun, Sağlıklı grubundan farkı: *: $p<0.05$).



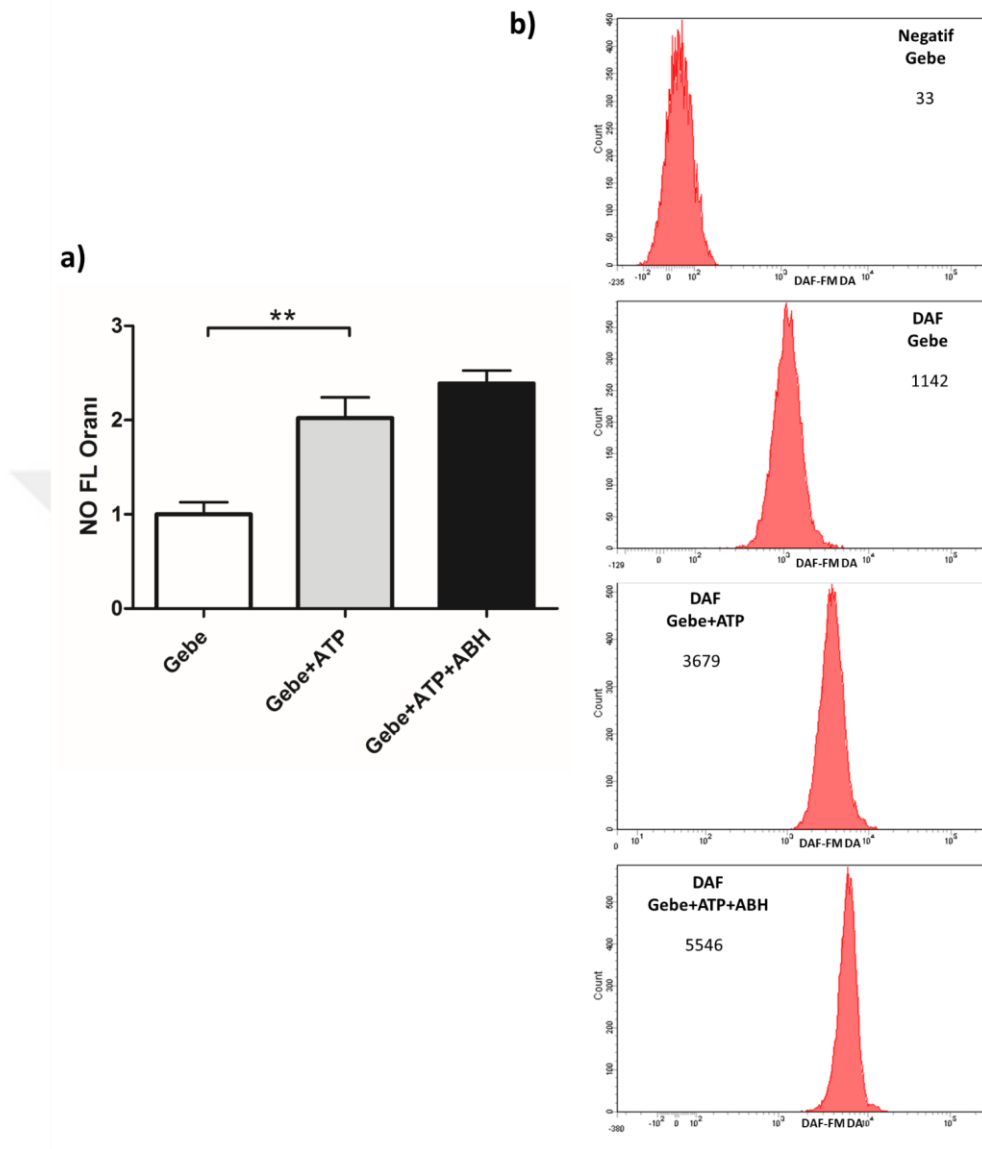
Şekil 4. 21. A. Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerde ATP ile uyarılan NO oluşumuna P_{2x} Purinerjik Reseptör Antagonisti PPDAS'nın etkisi B. Akış Sitometresi sonuçları. (Gebe +ATP grubunun, Gebe grubundan farkı: *: $p<0.05$).

Bu deney prosedüründe Sağlıklı bireylerden ve Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerde ekstrasellüler ATP ile uyarılan NO oluşumuna P_{2x} purinerjik reseptör antagonisti PPDAS'nın etkisine bakıldı. Gebe ve Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerde ekstrasellüler ATP ile uyarılan hücre içi NO ışıma oranı P_{2x} purinerjik reseptör antagonisti PPDAS eklenmesiyle, istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir.

4.2.4 Eritrositlerde ATP ile Uyarılan NO Oluşumuna Arginaz-1 İnhibitörü ABH'nin Etkisi



Şekil 4.22. A. Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerde ATP ile uyarılan NO oluşumuna Arginaz İnhibitörü ABH'nin Etkisi B. Akış Sitometresi sonuçları.

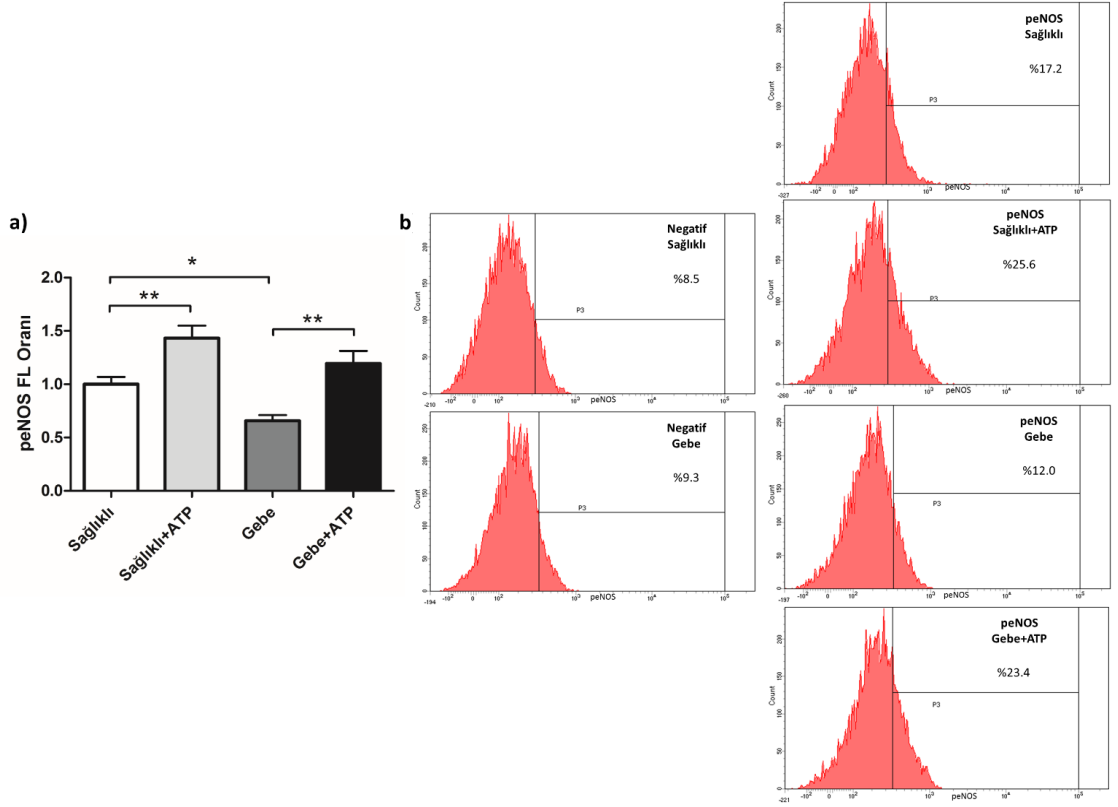


Şekil 4. 23. A. Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerde ATP ile uyarılan NO oluşumuna Arginaz-1 İnhibitörü ABH'nin Etkisi B. Akış Sitometresi sonuçları.

Bu deney prosedüründe Sağlıklı bireylerden ve Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerde ekstrasellüler ATP ile uyarılan NO oluşumuna Arginaz-1 İnhibitörü ABH'nin Etkisi bakıldı. Gebe ve Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerde

ekstrasellüler ATP ile uyarılan hücre içi NO ışıma oranı Arginaz-1 İnhibitörü ABH'ın eklenmesiyle, istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir.

4.3 Eritrosit eNOS enziminin Serin 1177 bölgesinin Fosforilasyon Düzeyinin Gösterilmesi

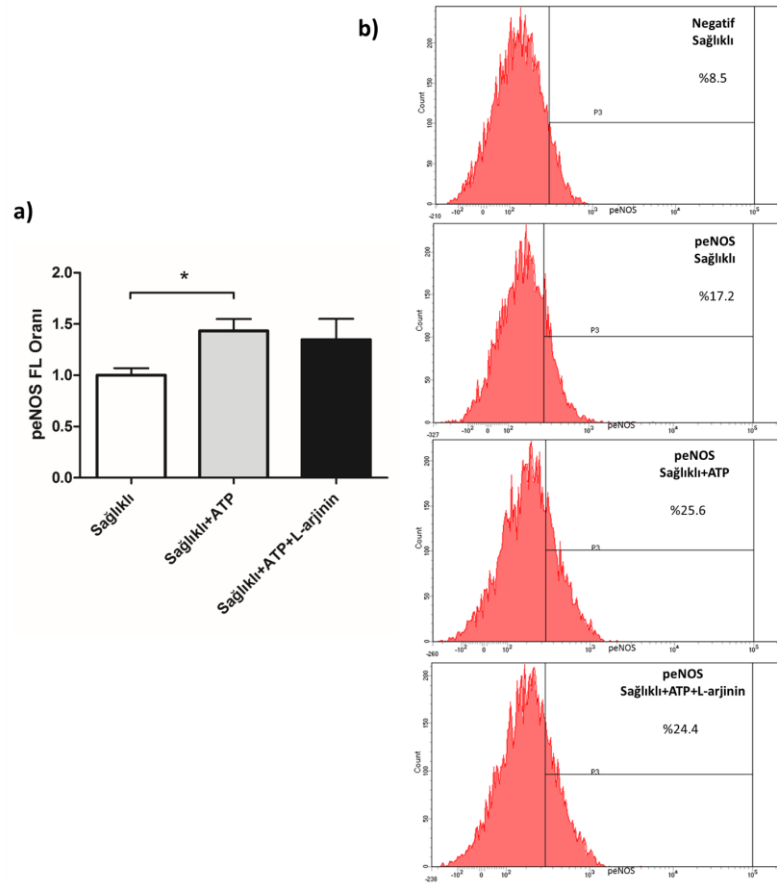


Şekil 4. 24. A. Sağlıklı ve Gebe bireylerinden el de edilen eritrositlere ATP eklenmesinin serin 1177 bölgesinin fosforilasyonuna etkisi.. B. Akış Sitometresi sonuçları. (Gebe grubunun, Sağlıklı grubundan farkı *: $p<0.05$, Sağlıklı + ATP grubunun, Sağlıklı grubundan farkı **: $p<0.01$, Gebe + ATP grubunun, Gebe grubundan farkı ## $p<0.01$).

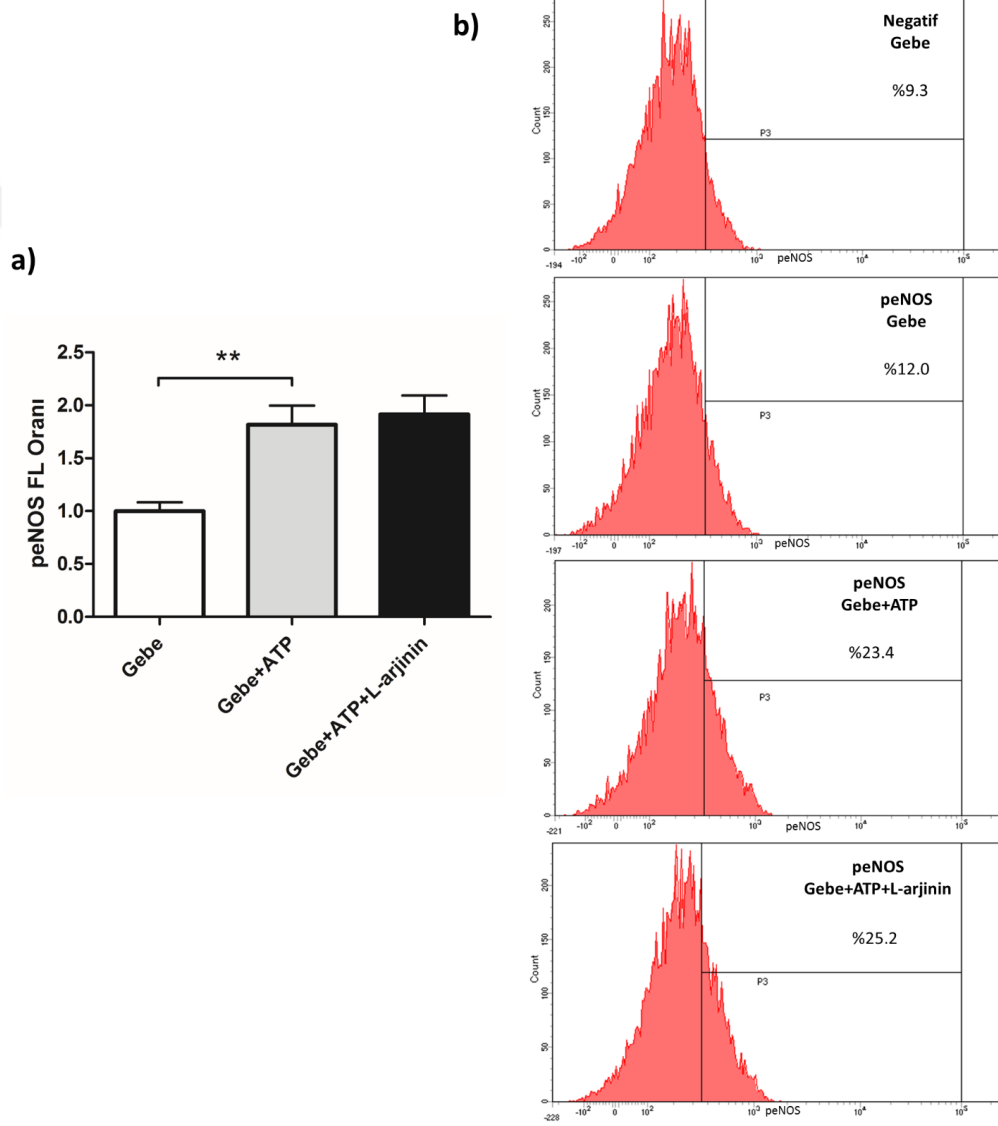
Sağlıklı ve Gebe bireylerden elde edilen eritrosit süspansiyonlarına Ekstrasellüler ATP eklenmesinin, eritrosit eNOS enziminin serin 1177 bölgesinin fosforilasyonuna etkisi gözlemlendi. Buna göre, Gebe grubunun eritrositlerinde bulunan peNOS enzim bölgesinin ışıma oranı, Sağlıklı grubunun eritrositlerinde bulunan peNOS enzim

bölgesinin ışıma oranına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlere 10^{-4} M ATP ile eklenmesiyle oluşan peNOS enzim bölgesinin ışıma oranı Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerin peNOS enzim bölgesinin ışıma oranına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Son olarak Gebe bireylerden elde edilen eritrositlere 10^{-4} M ATP eklenmesiyle oluşan peNOS enzim bölgesinin ışıma oranı, Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerin peNOS enzim bölgesinin ışıma oranına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur($p<0.01$).

4.3.1 Eritrosit eNOS enziminin Serin 1177 Fosforilasyon düzeyine NOS Substratı L-arjininin Etkisi



Şekil 4. 25. A. Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerde ATP ile uyarılan serin 1177 bölgesinin fosforilasyonuna NOS substratı L-arjininin etkisi B. Akış Sitometresi sonuçları (Sağlıklı+ATP grubunun, Sağlıklı grubundan farkı: *: $p<0.05$).

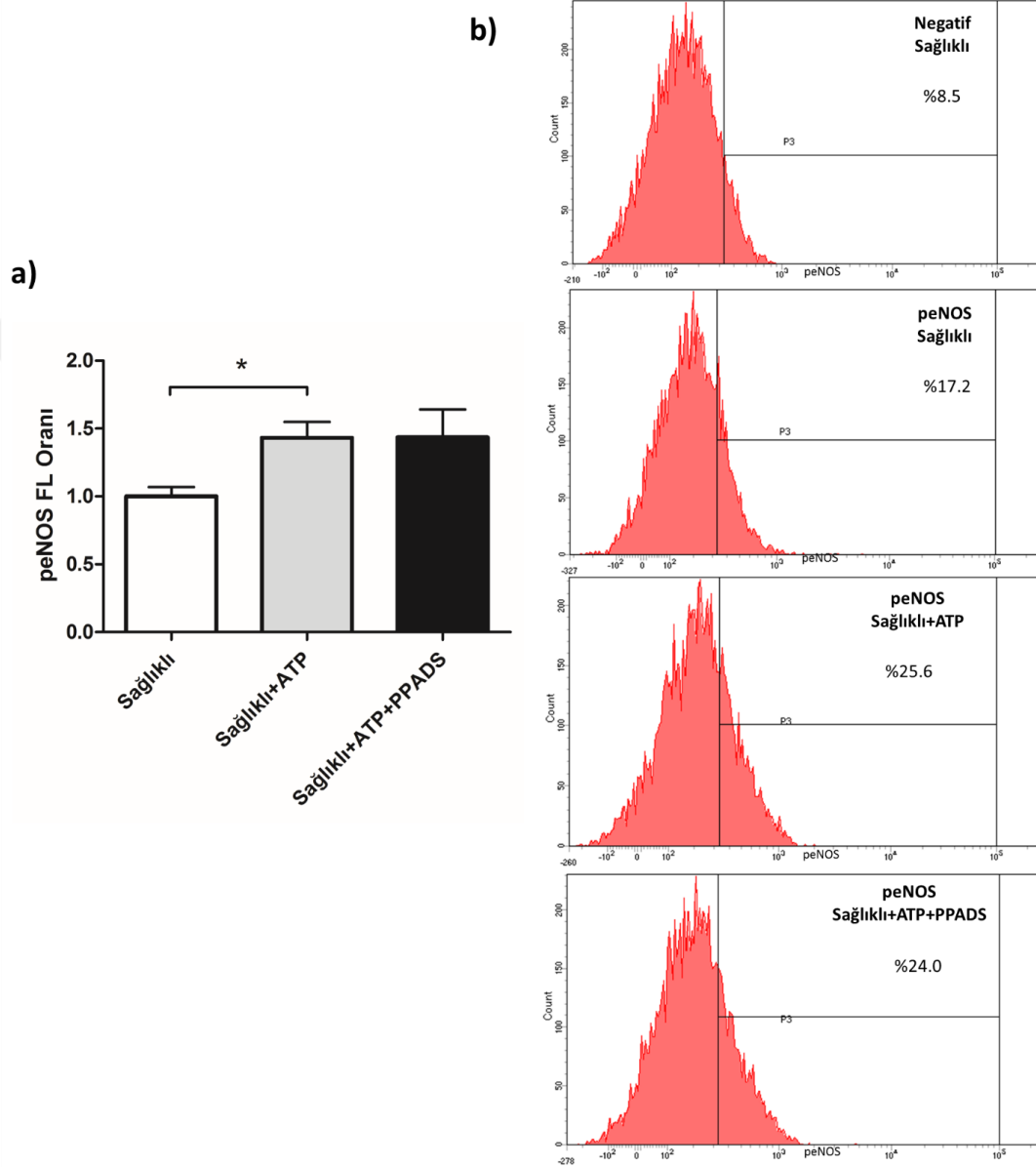


Şekil 4. 26. A.Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerde ATP ile uyarılan serin 1177 bölgesinin fosforilasyonuna NOS substratı L-arjininin etkisi B. Akış Sitometresi sonuçları . (Gebe+ATP grubunun, Gebe grubundan farkı: *: $p<0.05$).

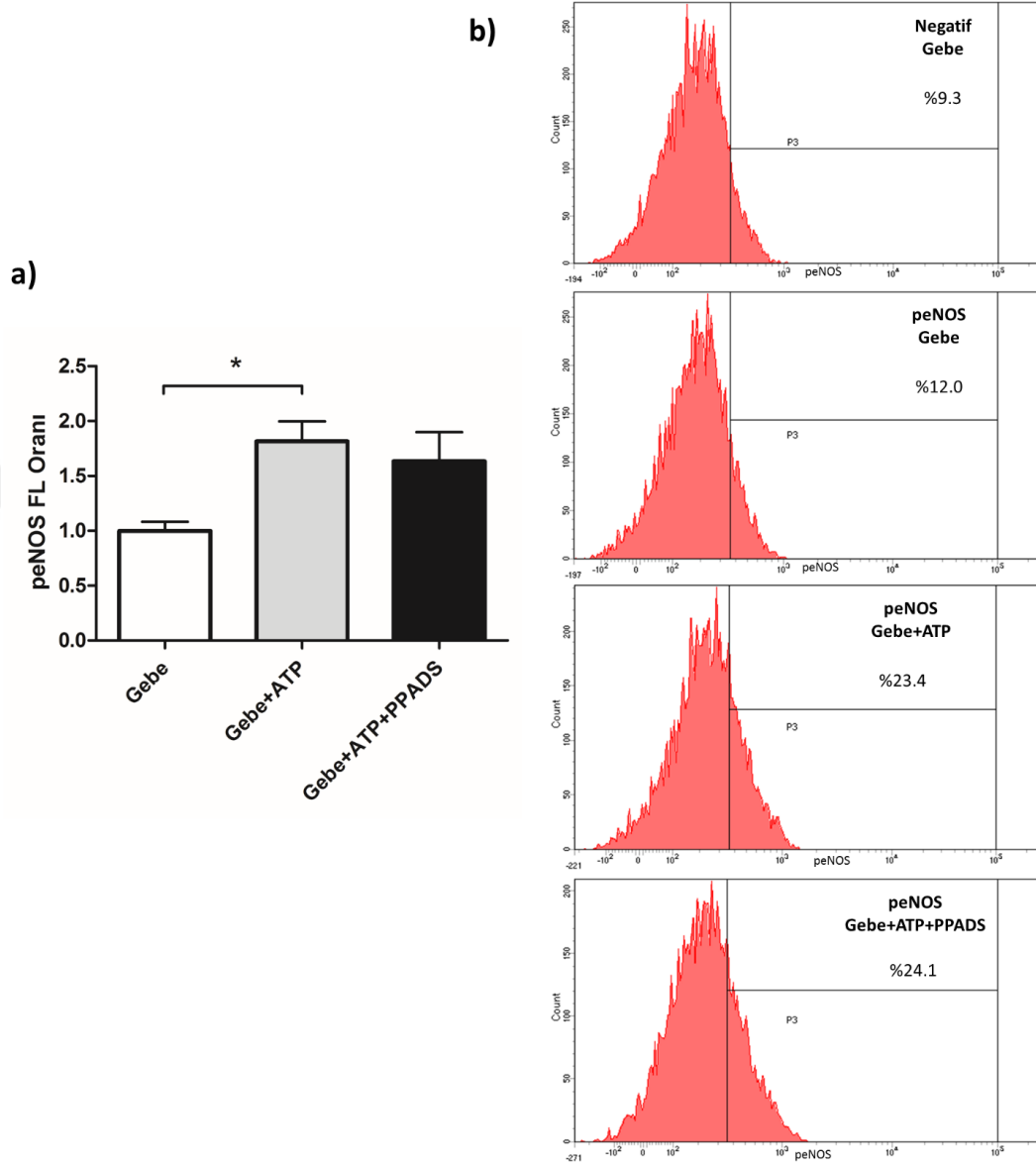
Sağlıklı ve Gebe bireylerden elde edilen eritrosit süspansiyonlarına Ekstrasellüler ATP ile uyarılan eritrosit eNOS enziminin serin 1177 bölgesinin fosforilasyonuna NOS substratı L-arjininin etkisine bakıldı. Gebe ve Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerin ekstrasellüler ATP ile uyarılan peNOS enzim bölgesinin ışıma oranı NOS substratı L-arjininin eklenmesi, istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermemiştir.



4.3.2 Eritrosit eNOS enziminin Serin 1177 Fosforilasyon düzeyine P_{2x} purinerjik reseptör antagonisti PPDAS'nin Etkisi



Şekil 4. 27. A.Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerde ATP ile uyarılan serin 1177 bölgesinin fosforilasyonuna P_{2x} purinerjik reseptör antagonisti PPDAS'nin Etkisi B. Akış Sitometresi sonuçları . (Sağlıklı+ATP grubunun, Sağlıklı grubundan farkı: *: p<0.05).



Şekil 4. 14. A.Gebe bireylerden elde edilen eritrositlerde ATP ile uyarılan serin 1177 bölgesinin fosforilasyonuna P_{2x} purinerjik reseptör antagonisti PPDAS'nin Etkisi B. Akış Sitometresi sonuçları . (Gebe+ATP grubunun, Gebe grubundan farkı: *: $p<0.05$).

Sağlıklı ve Gebe bireylerden elde edilen eritrosit süspansiyonlarına Ekstrasellüler ATP ile uyarılan eritrosit eNOS enziminin serin 1177 bölgesinin fosforilasyonuna P_{2x} purinerjik reseptör antagonisti PPDAS'nin etkisine bakıldı. Gebe ve Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerin ekstrasellüler ATP ile uyarılan peNOS enzim bölgesinin ışıma

oranı P_{2x} purinerjik reseptör antagonisti PPDAS'nin eklenmesiyle, istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermemiştir.



5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları, ekstraselüler ATP'nin endotel hücrelerinin yanında eritrositlerde de eNOS enzimini aktive ederek intraselüler NO üretimini arttırdığını, eritrositlerden salınan NO'nun ise torasik aort segmentlerinde gelişen ATP aracılı vazodilatasyon yanıtına katkı sağladığını ilk defa kanıtlamıştır. Eritrosit süspansiyonlarının varlığında ve yokluğunda ATP'nin neden olduğu bu vazodilatasyon yanıtı P2X reseptörlerinden bağımsız şekilde gerçekleşmektedir. İlginç olarak, sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerin aksine; gebelerden elde edilen eritrositlerin ATP aracılı vazodilatasyon yanıtında rol almadığı gözlenmiştir. Gebe eritrositlerinin bulunduğu ortamda damar banyolarına NOS substratı ya da arjinaz inhibitörü eklenmesi, ATP'ye cevaben oluşan vazodilatasyon yanıtına eritrositlerin katkısını önemli düzeyde arttırmıştır. Öte yandan çalışmamızın sonuçları, gebe bireylerden elde edilen eritrositlerde bazal ve ATP ile uyarılmış eNOS aktivitesinin ve intraselüler NO konsantrasyonunun, sağlıklı gönüllü eritrositlerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğunu göstermiştir. Bu hücrelerde NOS substratı L-arjinini parçalayan ve eNOS aktivitesinin düşmesine neden olan arjinaz enziminin aktivitesi ise, sağlıklı gönüllü eritrositlerine kıyasla anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Önemli olarak, gebe eritrositlerinde L-arjinin replasmanı ve arjinaz inhibisyonu ATP aracılı eNOS aktivasyonunu ve intraselüler NO oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır.

ATP, hücrenin primer enerji kaynağı olmasının yanı sıra önemli bir nörotransmitter ve ekstraselüler sinyal molekülüdür. Ekstraselüler ATP, damar düz kas tonüsünün düzenlenmesi, immün ve inflamatuvar yanıtların oluşturulması ve endokrin ve ekzokrin sekresyon gibi pekçok fizyolojik ve patolojik süreçte etkin rol oynar. Eritrositlerde ise, glikolitik mekanizmalarla üretilen milimolar düzeylerde ATP bulunmaktadır. Eritrositler ürettikleri ATP'nin bir kısmını hipoksi ve mekanik stres etkisiyle plazmaya salmaktadır. Eritrositlerden çıkan ATP, endotel hücre membranında bulunan purinerjik reseptörlerine bağlanır ve bu hücrelerde eNOS enzimini aktive eder. Aktive olan eNOS enzimi tarafından üretilen NO ise damar düz kas hücrelerine ulaşarak vazodilatasyona neden

olarak doku perfüzyonunu arttırır (Kirby ve ark., 2012; Misiti ve ark., 2022; Racine & Dinunno, 2019a; H. Zhang ve ark., 2018b; Z. Zhou, 2021). Öte yandan, eritrositler dolaşım sisteminde hem kendilerinden salınan (endojen) hem de vasküler sistemin diğer hücreleri tarafından salınan (eksojen) ATP'ye sürekli maruz kalmaktadır.

Eritrositler ise, hem yapısal hem de NO üretim kapasitesi bakımından endotel hücrelerindeki benzer, aktif eNOS enzimi içerir (Kleinbongard ve ark., 2006a). Eritrosit eNOS enziminin fizyolojik ve patofizyolojik mekanizmalarda önemli roller üstlendiği kanıtlanmıştır: Bunlar arasında fizyolojik açıdan kan basıncının ve kan akımının düzenlenmesi (Cortese-Krott ve ark., 2022b; Leo ve ark., 2021b; Racine & Dinunno, 2019a; Ulker ve ark., 2013b) yer alırken; patolojik açıdan hipertansiyon ile Tip 2 diyabet ve preeklampsiye bağlı kardiyovasküler komplikasyon gelişimi yer alır (Mahdi ve ark., 2020; McCann Haworth ve ark., 2021; Settergren ve ark., 2009). Önemli olarak, eritrosit eNOS enzimi bulunmayan ancak, endotel hücrelerinde normal eNOS ifadesi olan transgenik farelerde hipertansiyon ve endotel disfonksiyonu geliştiği gösterilmiştir (Leo ve ark., 2021b; Zhuge, McCann Haworth, ve ark., 2023). Anemi koşullarında ise, eritrositlerin plazma NO havuzuna katkısının azaldığı, bunu kompanse etmek üzere endotel eNOS aktivitesinin arttığı belirtilmiştir (Wischmann ve ark., 2020). Laboratuvarımızda yapılan çeşitli araştırmalarda ise, eritrosit eNOS enziminin endotel hücrelerindeki eşleniği gibi kayma gerilimi ve ATP'nin etkisi altında aktive olduğu ve eritrositler tarafından üretilen NO'nun mezenterik arteriyollerde vazodilatasyona neden olduğu gösterilmiştir (Ulker ve ark., 2009, 2010, 2011a, 2013a, 2018). ATP'nin endotel hücrelerinde bulunan purinerjik reseptörlerine bağlanarak NO üretimini arttırdığı ve bu şekilde vazodilatasyona neden olduğu iyi bilinmektedir (Sprague ve ark., 1996). Oysa, eritrositlerdeki eNOS aktivitesinin de ATP ile uyarıldığı ve eritrosit NO üretiminin arttığı gösterilmiş olmasına rağmen (Ulker ve ark., 2018) bu enzimin ATP aracılı vazodilatasyon yanıtında fonksiyonel bir öneme sahip olup olmadığı bu araştırmaya kadar hiç çalışılmamıştır.

Bu nedenle araştırmamızda eritrositlerin ATP aracılı vazodilatasyon yanıtına katkısını incelemek amacıyla torasik aorta segmentlerinin ATP'ye cevaben oluşturduğu vazodilatasyon yanıtı 3 farklı koşulda incelenmiştir:

- 1) Krebs Solüsyonu varlığında
- 2) Sağlıklı gönüllülerden elde edilen eritrosit süspansiyonu varlığında (%40 hematokrit, Krebs Solüsyonu içinde)
- 3) Gebelerden elde edilen eritrosit süspansiyonu varlığında (%40 hematokrit, Krebs Solüsyonu içinde)

Sonuçlar değerlendirilirken, Krebs Solüsyonu varlığında ATP'ye cevaben gelişen vazodilatasyon yanıtının sadece endotel eNOS enziminin ürettiği NO etkisiyle oluştuğu; eritrosit süspansiyonlarının varlığında gerçekleşen aort gevşeme yanıtlarının ise hem endotel, hem de eritrosit eNOS enzimleri tarafından üretilen toplam NO etkisi ile oluştuğu kabul edilmiştir. Dolayısıyla eritrosit içeren (Sağlıklı ve Gebe Eritrosit Süspansiyonları) ve içermeyen (sadece Krebs Solüsyonu) koşullarda meydana gelen gevşeme yanıtları arasındaki farkın sadece eritrosit eNOS enzimi tarafından üretilen NO aracılığıyla geliştiği düşünülmüştür.

Çalışmanın ilk verileri olan ATP doz-yanıt eğrisi incelendiğinde, Krebs Solüsyonuna kıyasla Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonun bulunduğu ortamda oluşan gevşeme yanıtı, 10^{-7} ve 10^{-6} M ATP dozlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (Şekil 4.1a, b). Özellikle 10^{-6} M ATP uyarısına cevaben oluşan vazodilatasyon yanıtındaki fark iki kattan fazladır (Şekil 4.1b). Öte taraftan, yüksek dozlarda iki grup arasındaki fark azalmakta, 10^{-4} M ATP varlığında ise ortadan kalkmaktadır. Literatürde eritrosit eNOS enziminin ATP aracılı gevşeme yanıtlarına etkisinin olup olmadığı daha önce hiç çalışılmamıştır. Bu nedenle, bulgularımız eritrosit eNOS enzimi tarafından üretilen NO'nun endotel kaynaklı NO ile birlikte ATP aracılı vazodilatasyon yanıtına aracılık ettiğini ilk defa göstermektedir.

İlginç olarak, gebe eritrosit süspansiyonunun bulunduğu ortamda meydana gelen gevşeme yanıtı ise Krebs Solüsyonundan farksızdır. Bu sonuç, aort segmentlerinde ATP'ye cevaben gelişen vazodilatasyon yanıtında gebe eritrositlerinin rol almadığını göstermektedir. Sağlıklı ve gebe eritrosit süspansiyonları kıyaslandığında ise, ATP'nin 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M dozlarında oluşturduğu gevşeme yanıtları, sağlıklı eritrosit süspansiyonuna kıyasla gebe eritrosit süspansiyonunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür. Bu sonuç ise, gebelik koşullarında eritrositlerde ATP'ye cevaben

Üretilen NO miktarının düşük olduğunu ya da oluşan NO'nun ekstraselüler olarak yıkımı nedeniyle NO biyoyararlanımının azaldığını düşündürmektedir. Nitekim, NO probu DAF-FM kullanılarak gerçekleştirilen NO lmleri, eritrosit içi NO konsantrasyonunun, gebelerde sağlıklı gönüllülere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğunu göstermiştir (ekil 4.15). ATP ile uyarım ise, her iki grupta hücre içi NO oluşumunu anlamlı düzeyde arttırsa da, bu koşullarda da eritrosit içi NO konsantrasyonu gebelerde, gebe olmayan bireylere kıyasla daha düşük izlenmiştir (ekil 4.15). Diğer taraftan, eNOS aktivitesinin bir göstergesi olan eNOS enziminin serin-1177 bölgesinden fosforilasyonu da hücre içi NO seviyeleriyle benzer sonuçlar vermiştir. Buna göre, bazal eritrosit eNOS fosforilasyon düzeyi gebe bireylerde gebe olmayan gönüllülere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür. ATP ile uyarım ise, her iki grupta eritrosit eNOS fosforilasyonunu arttırsa da uyarılmış enzim aktivitesi gebelerde sağlıklı gönüllülere kıyasla anlamlı olarak düşüktür (ekil 4.24). Bu bulgular, gebelik sırasında hematopoez ya da sonraki süreçlerde olarak eritrosit eNOS enzim ekspresyonu ve/veya aktivitesinde azalmaya neden olan bazı değişikliklerin olduğunu düşündürmektedir. Gebeliğin eritrosit eNOS enzim aktivitesi ve hücre içi NO düzeyine etkisini araştıran ve bulgularımızla kıyaslayabileceğimiz daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, endotel hücrelerindeki eNOS enzim aktivitesinin, gebe bireylerde gebe olmayan bireylere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Gebelik koşullarında genel olarak maternal sistemik damarlarda eNOS aktivitesi ve NO retiminde artış meydana gelirken, bunun özellikle uterus damarlarında daha da belirgin olduğuna dair kanıtlar vardır. Uterus damarlarındaki bu istisnai vazodilatasyon artıının gebelik boyunca büyüyen fetüsün gelişimi için gerekli olan besin ve oksijeni sağlamak için gerekli olduğu bilinmektedir(Boeldt ve ark., 2011; Boeldt & Bird, 2017; Nelson ve ark., 2000). Bu çalışmanın bulguları ile literatür verileri sentezlendiğinde, gebelik sürecince endotel hücrelerinde bulunan eNOS enzimi ile eritrosit eNOS enziminin zıt mekanizmalarla düzenlendiği ortaya çıkmaktadır. Bu zıt düzenlenme mekanizmaları, gebelik süreci ilerledikçe gelişen hipotansiyona yatkınlığı sınırlamak amacıyla bir adaptasyon mekanizması olarak oluşuyor olabilir. Nitekim, 2020 yılında yayınlanan kapsamlı bir araştırmada anemi koşullarında eritrosit ve endotel eNOS enzimlerinin farklı ve zıt şekilde düzenlenmesinin önemi vurgulanmıştır. Bu çalışmada, anemi

koşullarında eritrosit eNOS enzim aktivitesinin ve NO salınımının azaldığı ve bu durumu kompanse etmek için ise endotel eNOS aktivitesinin anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir. Bu kompensasyonu geliştiremeyen anemik farelerde ise akut koroner sendrom görülme sıklığının anlamlı düzeyde arttığı bildirilmiştir (Wischmann ve ark., 2020). Sonuç olarak, endotel hücreleri ve eritrositlerde bulunan eNOS enzimleri fonksiyon ve NO üretim kapasiteleri açısından benzer olsa da, hücrelerin maruz kaldığı koşullar değiştikçe farklı adaptasyon süreçlerine girme olasılığı söz konusudur.

Öte yandan, gelişmekte olan fetüsün ve annenin ihtiyaçlarını karşılamak için maternal dolaşım sisteminde önemli değişiklikler meydana gelir. Eritropoietin ve eritrosit üretimi artsa da; hemoglobin ve hematokrit değeri hipervolemi nedeniyle üçüncü trimester boyunca giderek azalır. Eritrosit ömrü ise, yüksek eritropoietin seviyelerine yanıt olarak 'acil hematopoez' sebebiyle kısalır. Bu sırada dolaşımda retikülosit sayısı artarken, dolaşıma salınan eritrositlerde de bazı değişiklikler gözlenir. Gebelik süresince dolaşımda bulunan genç eritrosit popülasyonunda ve ortalama eritrosit hacminde (MCV) sürekli olarak artış gözlenir (Chandra ve ark., 2012; Vega-Sánchez ve ark., 2020). Eritrosit popülasyonunda ve morfolojisinde gözlenen bu değişime paralel olarak eritrositlerin mekanik özelliklerinde de bozukluklar saptanmıştır. Bu çalışmalarda gebelerden elde edilen eritrositlerin deformabilitesinin gebe olmayan bireylere göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Chandra ve ark., 2012; Schauf ve ark., 2002). Bu farkın, gebelik boyunca eritrosit morfolojisi ve içeriğindeki değişimden kaynaklandığı düşünülmektedir. Marijke ve arkadaşları, eritrosit yaşlanma süresince genç eritrositte eNOS aktivitesinin ve NO üretiminin yaşlı eritrositlere göre daha düşük olduğunu göstermiştir (Bizjak ve ark., 2015). Bu sonuç bizim bulgularımızı desteklemekle birlikte, gebelik ilerledikçe artan hematopoez nedeniyle kanda genç eritrosit popülasyonunun artışı, bizim çalışmamızda gebe bireylerin eritrositlerinde eNOS aktivitesinin ve intrasellüler NO konsantrasyonunun sağlıklı kontrollere kıyasla daha düşük olarak bulunmasının nedenlerinden biri olarak gösterilebilir.

Çalışmamızda, aorta segmentlerinde gözlenen ATP aracılı vazodilatasyon yanıtında eNOS enziminin rolünü doğrulamak amacıyla yukarıda bahsedilen deneyler non-spesifik NOS inhibitörü L-NAME varlığında tekrarlanmıştır. L-NAME, bütün koşullarda

ATP'nin neden olduğu vazodilatasyon yanıtını ortadan kaldırmıştır. (Şekil 4.5,4.6,4.7). Bu sonuç, ATP'nin torasik aorta segmentlerinde neden olduğu vazodilatasyon yanıtında eNOS enziminin rol aldığını göstermektedir. Öte yandan, eNOS enzim inhibisyonunun eritrositlerde ATP aracılı NO oluşumuna etkisini incelemek amacıyla, eritrosit süspansiyonları non-spesifik NOS inhibitörü L-name ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda eritrositlerde intraselüler NO seviyeleri akış sitometrik metodla ölçülmüştür. Sonuçlarımız, NOS inhibisyonunun, eritrositlerde ATP uyarısıyla gerçekleşen NO üretimindeki artışı engellediğini göstermiştir. Bu sonuçlar, ATP'nin eritrosit eNOS enzimi üzerinden NO üretimini arttırdığını doğrulamaktadır (Şekil 4.18,4.19)

Önemli olarak, eritrosit eNOS enziminin aktivitesi, enzimin substratı olan L-arjinin ve kofaktörü olan BH₄'ün hücre içi konsantrasyonları ile yakından ilişkilidir (Z. Zhou ve ark., 2018). Özellikle, substrat eksikliğinin gözleendiği durumlarda eritrositlerde eşleşmemiş eNOS enzimi (uncoupled eNOS) oluşur. Hücrede l-arjinin eksikliğinin en önemli nedeni, L-arjinini L-ornitine parçalayan arjinaz enziminin aktivitesinde meydana gelen artıştır. Arjinaz aktivitesinin arttığı koşullarda substratı ile eşleşemeyen eritrosit eNOS enzimi, NO yerine O₂⁻ üretir. Üretilen O₂⁻ ise, plazmada bulunan NO ile reaksiyona girerek NO'nun hızlıca peroksinitrite yıkılmasına neden olur. Peroksinitrit, eritrositlerde BH₄'ün yıkılmasına neden olurken, endotel hücrelerinde ise arjinaz aktivasyonuna ve eşleşmemiş eNOS oluşumuna aracılık eder. Böylece, vasküler sistemde hem NO yıkımı, hem de eNOS aktivitesinde azalma ile karakterize bir kısır döngü oluşur. Özellikle Diabetes Mellitus, preeklampsi ve Covid-19'un kardiyovasküler komplikasyonları üzerine yapılan çalışmalarda, bu koşullarda eritrosit arjinaz aktivitesinin arttığı ve eNOS enziminin NO yerine O₂⁻ ürettiği gösterilmiştir. Bu mekanizmanın da endotel hücrelerinde arjinaz aktivasyonunu arttırarak endotel disfonksiyonu gelişmesine neden olduğu bildirilmiştir (Mahdi ve ark., 2022; McCann Haworth ve ark., 2021; Z. Zhou ve ark., 2018). Bu çalışmalarda, hastalardan elde edilen eritrositler sağlıklı sıçanlardan izole edilen aorta segmentleriyle 18 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından eritrositlerden temizlenen damar segmentlerinin sadece Krebs Solüsyonu varlığında asetilkolin aracılı gevşeme yanıtları incelenmiştir. Sonuç olarak, hastalardan elde edilen eritrositler ile gece boyu inkübe olan damar segmentlerinde asetilkolin aracılı gevşeme yanıtlarının bozulduğu gösterilmiştir.

Eritrositler ile damar segmentlerinin inkübasyonu l-arjinin, arjinaz inhibitörü veya ROS süpürücüsü varlığında tekrarlandığında ise, endotel fonksiyonlarının korunduğu bildirilmiştir (Mahdi ve ark., 2020, 2022; Settergren ve ark., 2009; Yang ve ark., 2018; Z. Zhou ve ark., 2018). Bu çalışmalarda vasküler gevşeme yanıtları sadece Krebs Solüsyonu varlığında gerçekleştirilmiştir. Farklı olarak, bizim çalışmamızda vasküler yanıtlar incelenirken ortamda hem sadece Krebs Solüsyonu, hem de sağlıklı birey ve gebelerden elde edilen eritrositlerle oluşturulan eritrosit süspansiyonları vardır. Böylelikle diğer çalışmalardan farklı olarak ATP aracılı vazodilatasyona eritrositlerin akut etkisi incelenebilmiştir.

Intraselüler L-arjinin konsantrasyonunun eNOS enzim aktivitesindeki önemli rolünden yola çıkarak, araştırmamız kapsamında ATP aracılı gevşeme yanıtları 10^{-3} M l-arjinin varlığında tekrarlanmıştır. Damar banyosunda Krebs Solüsyonu ve Gebe Eritrosit Süspansiyonunun bulunduğu koşullarda ortama L-arjinin eklenmesi, ATP aracılı gevşeme yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır. Oysa, damar banyosunda Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu bulunan koşullarda, ortama L-arjinin eklenmesi gevşeme yanıtlarında bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4). Shin ve ark.,adaşları eNOS enziminin optimum fonksiyonu için 50–100 μ M l-arjinin gerektiğini ve endotel hücrelerinin ise düşük intraselüler L-arjinin konsantrasyonlarından dolayı ekstraselüler L-arjinine bağımlı olduğunu belirtmiştir (Shin ve ark., 2011). Diğer taraftan, eritrositlerin sitoplazmasında yaklaşık 200 μ M L-arjinin bulunur. Bu değer eritrosit eNOS aktivitesi için yeterlidir. Çalışmamızda, sağlıklı eritrosit süspansiyonunun bulunduğu damar banyolarında ortama L-arjinin eklenmesinin fazladan bir gevşeme yanıtına neden olmaması, sağlıklı eritrositlerin yüksek düzeyde L-arjinin içermesiyle açıklanabilir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, sağlıklı bireylerden elde edilen eritrosit süspansiyonlarına 10^{-3} M L-arjinin eklenmesi, hücre içi NO ve fosforile eNOS düzeylerine de anlamlı bir etkiye bulunmamıştır (Şekil 4.16 ve 4.25). Oysa gebelerden elde edilen eritrositlere L-arjinin eklenmesi hem intraselüler NO, hem de fosforile eNOS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artışa neden olmuştur (Şekil 4.17, 4.26).

Üre döngüsünün anahtar enzimi olan arginaz, L-arjinin yıkımı için NOS enzimi ile yarış halindedir (Bratt ve ark., n.d.; Özüyaman ve ark., 2008b; Rath ve ark., 2014). Sonuçlarımız, arjinaz inhibisyonunun, damar banyosunda Krebs Solüsyonu ve Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu bulunan koşullarda ATP aracılı vazodilatasyona etkili olmadığını göstermektedir (Şekil 4.8, 4.9). Bunun aksine, ortamda Gebe Eritrosit Süspansiyonu bulunduğu koşullarda ise, arjinaz inhibisyonu ATP aracılı vazodilatasyonda (10^{-5} ve 10^{-4} M ATP dozlarında) istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur (Şekil 4.10). Araştırma kapsamında sağlıklı sıçanlardan elde edilen aorta segmentleri kullanıldığı için damar banyosunda Krebs Solüsyonu bulunduğu koşullarda arjinaz inhibisyonunun fazladan bir gevşeme yanıtına neden olmaması beklentiyle uyumludur. Benzer şekilde, ortamda Sağlıklı Eritrosit Süspansiyonu bulunduğu koşullarda da arjinaz inhibisyonu gevşeme yanıtına anlamlı bir etkide bulunmamıştır. Sağlıklı birey ve Sağlıklı gebelerden elde edilen eritrositlerde yapılan arjinaz aktivitesi ölçümleri de arjinaz aktivitesinin Gebe Eritrositlerinde Sağlıklı bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu göstermiştir. (Şekil 4.14) Bu sonuçlar, gebelerden elde edilen eritrositlerin yüksek arjinaz aktivitesi ve düşük NO üretim kapasitesi nedeniyle ATP aracılı vazodilatasyon yanıtına katkı sağlamadığını düşündürmektedir.

Eritrositlerde ve endotel hücrelerinde arjinaz enzim aktivitesini uyaran en önemli iki faktör hipoksi ve ROS artışıdır. Gebelik ise, artan bazal oksijen tüketimi ile sonuçlanan dinamik değişiklikler ile karakterizedir (Ademuyiwa ve ark., 2007). Gebeliğin başlarında, plasenta hipoksik bir ortama sahiptir ancak olgunlaştıkça ve vaskülarizasyonu geliştikçe oksijen açısından zengin bir ortama dönüşürken içerdiği bol miktarda mitokondri de ROS üretir. Her ne kadar antioksidan enzim sayısı ve aktivitesindeki artış oksidatif stresi dengelemeye çalışsa da, gebelik sırasında serum ROS düzeyi kontrol koşullarına göre anlamlı düzeyde yüksektir (Ademuyiwa ve ark., 2007; Marín ve ark., 2020). Preeklampsi hastalarında ise ROS artışı daha dramatik şekilde gözlenmekle birlikte hastalığın patogenezinde önemli yer tutar (Chiarello ve ark., 2020). Eritrositlerde ise, gebelik koşullarında kontrol koşullarına kıyasla glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin daha yüksek; süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ise daha düşük olduğu bulunmuştur (Marín ve ark., 2020) Diğer taraftan, oksitlenebilen ve ROS üreten tiyoller ile lipidlerin oksidasyonu ile oluşan lipid peroksidasyon ürünleri de

gebe bireylerden elde edilen eritrosit lizatlarında kontrol koşullarına kıyasla daha yüksektir. Bu artışın özellikle ikinci trimestrden itibaren dikkat çekici olduğu vurgulanmıştır (Uotila ve ark., 1993). Çalışmamızda, eritrosit içi ROS seviyeleri ölçülmemiş olması araştırmanın eksik yönlerinden biridir. Ancak bunun dışında bu çalışmanın sonuçları, gebelik koşullarında eritrositlerde arjinaz aktivitesinde artış ve eNOS aktivitesi ile NO üretim kapasitesinde ise düşüş olduğunu göstererek eritrositlerin gebelikte gözlenen oksidatif stres artışına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

ATP, hücresel etkilerini hücre membranında yerleşmiş purinerjik reseptörler üzerinden gösterir. Bu reseptörlerin iyonotropik P2X ve metabotropik P2Y olmak üzere 2 adet subtipi bulunmaktadır (Burnstock, 1976, 2001). Bu reseptör subtiplerinin kullandığı hücre içi yollar da farklılık gösterir. P2X reseptörleri, iyon kanalları olarak hücreye başlıca Ca^{+2} girişine neden olurken; P2Y reseptörleri G-protein bağlı reseptörlerdir ve etkilerini ikincil mesajcılar aracılığı ile gösterirler. Hücre tipine göre ATP etkilerine aracılık eden purinerjik reseptör subtipleri değişiklik göstermekle birlikte, bugüne kadar eritrositlerde purinerjik reseptörler arasında P2X1, P2X4, P2X7 ve P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y13'ün varlığı gösterilmiştir (Hoffman ve ark., 2004; Wang ve ark., 2005). İnsan eritrositlerinde yapılan az sayıda çalışmada ise, özellikle P2X1, P2X7, P2Y1 ve P2Y2 reseptörlerinin diğerlerine göre daha yüksek seviyede ifade edildiği belirtilmektedir (Sluyter ve ark., 2004; Tanneur ve ark., 2006). İnsan eritrositlerinde en fazla çalışılan purinerjik reseptör subtipi olan P2X7'nin eritrositlerde ATP aracılı EET salınımı, hücre yüzeyine fosfotidilserin ekspozisyonu ve hücre içine Na^{+2} alımının artışına neden olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Çalışmamızda purinerjik reseptörlerin inhibisyonu amacıyla genel purinerjik reseptör inhibitörü olan Suraminin kullanılması planlanmıştır. Ancak çalışmalarımızda, Suramin uygulanan damar segmentlerinde ATP'den bağımsız gevşeme yanıtları izlenmiştir. Bu durum literatürde Suraminin reseptör bağımsız etkileri şeklinde açıklanmaktadır. Bu nedenle araştırmamızın devamında bir diğer purinerjik reseptör antagonisti PPADS kullanılmıştır. PPADS, P2X reseptörlerine yüksek afinite gösteren bir purinerjik reseptör antagonisti olarak geçmektedir (Ziganshin ve ark., 1994). Deneylerimizin sonuçları, P2X reseptör inhibisyonunun Krebs Solüsyonu ve Gebe Eritrosit Süspansiyonu varlığında ATP aracılı gevşeme yanıtlarına anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermiştir (Şekil 4.11,4.13). Bu sonuçlar, ATP'nin aorta endotel

hücrelerindeki etkisinin P2X reseptörlerinden bağımsız olduğunu göstermektedir. Nitekim, daha önce aort segmentlerinde yapılan çalışmalar da ATP'nin neden olduğu vazodilatasyona P2Y reseptörlerinin aracılık ettiğini göstermiştir (Chinellato ve ark., 1992). Sağlıklı eritrosit süspansiyonunun bulunduğu koşullarda ise, P2X inhibisyonu ATP aracılı vazodilatasyon yanıtında azalma eğilimine neden olsa da; bu etki istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.12). Bu sonuçlar, ATP'nin eritrositler varlığında aorta segmentlerinde oluşturduğu vazodilatasyon yanıtına P2X reseptörlerinin anlamlı bir katkısının olmadığını, bu etkinin P2Y reseptörleri aracılığı ile olabileceğini göstermektedir. Damar gevşeme yanıtları ile uyumlu olarak, eritrositlerde ATP aracılı NO artışı, P2X reseptör antagonisti varlığında azalma eğiliminde olsa da; bu etki istatistikel olarak anlamlı bulunmamıştır. (Şekil 4.20,4.21,4.27,4.28)

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları, ATP aracılı vazodilatasyon yanıtında endotel kaynaklı NO ile birlikte eritrosit eNOS enzimi tarafından üretilen NO'nun da rol aldığını ilk defa göstermiştir. Bulgularımızın, kan akımının lokal kontrolünde önemli bir yeri olan ATP aracılı vazodilatasyon mekanizmasına eritrosit penceresinden yeni bir katkı sağlayacağını umuyoruz. Öte yandan çalışmamız, eritrosit eNOS enzim aktivitesinin gebelik koşullarında kontrol koşullarından farklı şekilde düzenlendiğini ortaya koymuştur. Buna göre, gebelik süresince eritrosit arjinaz aktivitesinde artış olurken, eNOS aktivitesinde ve NO üretim kapasitesinde düşüş gözlenmektedir. Gebelik koşullarında, endotel hücrelerinde bulunan eNOS enziminin aksine eritrosit eNOS enzim aktivitesinde düşüş olması, eritrosit eNOS aktivitesindeki azalmanın gebelik koşullarında total NO seviyesinin ve hipotansiyona yatkınlığın sınırlandırılmasında önemli bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan, gebelik koşullarında eritrosit arjinaz aktivitesinde gözlenen artış, gebeliğe bağlı oksidatif stres artışına da katkı sağlıyor olabilir. Bu yönüyle bulgularımızın, eritrosit eNOS enziminin bazal koşullarda ve gebelik koşullarında fizyolojik önemi açısından temel bilgilere katkı sağlayacağını umuyoruz.

7. KAYNAKLAR

- Ademuyiwa, O., Odusoga, O. L., Adebawo, O. O., & Ugbaja, R. N. (2007). Endogenous antioxidant defences in plasma and erythrocytes of pregnant women during different trimesters of pregnancy. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 86(10), 1175–1180. <https://doi.org/10.1080/00016340701515357>
- Allen, B. W., Stamler, J. S., & Piantadosi, C. A. (2009). Hemoglobin, nitric oxide and molecular mechanisms of hypoxic vasodilation. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 15, Issue 10, pp. 452–460). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.08.002>
- Banumathy, G., Singh, V., Pavithra, S. R., & Tatu, U. (2003). Heat shock protein 90 function is essential for Plasmodium falciparum growth in human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18336–18345. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211309200>
- Basarici, I., Özen, N., Kilavuz, E., Kisak, F., Basrali, F., Yaras, N., Koksoy, S., Celik, M. L., & Ulker, P. (2020). Concealed role of red blood cells in pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: Decreased red blood cell nitric oxide generation and effect of Rho-Kinase inhibitor fasudil. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 76(4), 535–548. <https://doi.org/10.3233/CH-200892>
- Bátori, R., Bécsi, B., Nagy, D., Kónya, Z., Hegedüs, C., Bordán, Z., Verin, A., Lontay, B., & Erdődi, F. (2017). Interplay of myosin phosphatase and protein phosphatase-2A in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and nitric oxide production. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep44698>
- Bergfeld, G. R., & Forrester, T. (1992). Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovascular Research*, 26(1), 40–47. <https://doi.org/10.1093/cvr/26.1.40>
- Bian, K., & Murad, F. (2003). Introduction 3. The generation of NO 3.1. Enzymatic Synthesis of NO 3.1.1. Nitric Oxide Synthase 3.1.2. NOS Function Regulation & NOS-2 Selective Inhibition 3.2. NOS-independent NO generation 3.2.1. Nitric

oxide and the Nobel Prize 3.2.2. Organic nitrates. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 8).

Bizjak, D. A., Brinkmann, C., Bloch, W., & Grau, M. (2015). Increase in red blood cell-nitric oxide synthase dependent nitric oxide production during red blood cell aging in health and disease: A study on age dependent changes of rheologic and enzymatic properties in red blood cells. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125206>

Boeldt, D. S., & Bird, I. M. (2017). Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 232, Issue 1, pp. R27–R44). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0340>

Boeldt, D. S., Yi, F. X., & Bird, I. M. (2011). eNOS activation and NO function: Pregnancy adaptive programming of capacitative entry responses alters nitric oxide (NO) output in vascular endothelium-new insights into eNOS regulation through adaptive cell signaling. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 210, Issue 3, pp. 243–258). <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0053>

Bouallegue, A., Daou, G. B., & Srivastava, A. K. (2007). Endothelin-1-Induced Signaling Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. In *Current Vascular Pharmacology* (Vol. 5).

Bratt, J. M., Zeki, A. A., Last, J. A., & Kenyon, N. J. (n.d.). Competitive metabolism of L-arginine: arginase as a therapeutic target in asthma ☆. In *Journal of Biomedical Research*, 2011, 25 (Issue 5).

Bredt, D. S. (2003). Nitric oxide signaling specificity - The heart of the problem. In *Journal of Cell Science* (Vol. 116, Issue 1, pp. 9–15). <https://doi.org/10.1242/jcs.00183>

Budhiraja, R., Tuder, R. M., & Hassoun, P. M. (2004). Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. In *Circulation* (Vol. 109, Issue 2, pp. 159–165). <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000102381.57477.50>

- Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *Journal of Theoretical Biology*, 62(2), 491–503. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(76\)90133-8](https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90133-8)
- Burnstock, G. (2001). Endothelial function View project Diabetic autonomic neuropathy View project. In *Article in Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. <https://www.researchgate.net/publication/12246187>
- Carlström, M. (2021). Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health. In *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 17, Issue 9, pp. 575–590). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00429-z>
- Casem. (2016). Chapter 5 - Membranes and Membrane Transport. In *Case Studies in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801394-6/00005-1>
- Cau, S. B. A., Carneiro, F. S., & Tostes, R. C. (2012). Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: Therapeutic opportunities. In *Frontiers in Physiology: Vol. 3 JUN*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00218>
- Chandra, S., Tripathi, A. K., Mishra, S., Amzarul, M., & Vaish, A. K. (2012). Physiological changes in hematological parameters during pregnancy. In *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion* (Vol. 28, Issue 3, pp. 144–146). <https://doi.org/10.1007/s12288-012-0175-6>
- Chen, K., & Popel, A. S. (2009). Nitric oxide production pathways in erythrocytes and plasma. In *Biorheology* (Vol. 46, Issue 2, pp. 107–119). <https://doi.org/10.3233/BIR-2009-0531>
- Chen, Z., Oliveira, S. D. S., Zimnicka, A. M., Jiang, Y., Sharma, T., Chen, S., Lazarov, O., Bonini, M. G., Haus, J. M., & Minshall, R. D. (2018). Reciprocal regulation of eNOS and caveolin-1 functions in endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 29(10), 1190–1202. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0049>
- Chiarello, D. I., Abad, C., Rojas, D., Toledo, F., Vázquez, C. M., Mate, A., Sobrevia, L., & Marín, R. (2020). Oxidative stress: Normal pregnancy versus preeclampsia. In

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease (Vol. 1866, Issue 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.005>

Chinellato, A., Ragazzi, E., Pandolfo, L., Frolidi, G., Caparrotta, L., & Fassina, G. (1992). PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ATP RECEPTORS MEDIATING VASODILATION ON ISOLATED RABBIT AORTA. In *Gen. Pharmac* (Vol. 23, Issue 5).

Clifford, P. S. (2011). Local control of blood flow. *Advances in Physiology Education*.

Coleman, H. A., Tare, M., & Parkinson, H. C. (2004). ENDOTHELIAL POTASSIUM CHANNELS, ENDOTHELIUM-DEPENDENT HYPERPOLARIZATION AND THE REGULATION OF VASCULAR TONE IN HEALTH AND DISEASE. In *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (Vol. 31). <http://www.apps.org.au>

Cortese-Krott, M. M., & Kelm, M. (2014). Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocrine function? In *Redox Biology* (Vol. 2, Issue 1, pp. 251–258). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.027>

Cortese-Krott, M. M., Rodriguez-Mateos, A., Sansone, R., Kuhnle, G. G. C., Thasian-Sivarajah, S., Krenz, T., Horn, P., Krisp, C., Wolters, D., Heiß, C., Kröncke, K. D., Hogg, N., Feelisch, M., & Kelm, M. (2012). Human red blood cells at work: Identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood*, 120(20), 4229–4237. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-442277>

Cortese-Krott, M. M., Suvorava, T., Leo, F., Heuser, S. K., LoBue, A., Li, J., Becher, S., Schneckmann, R., Srivastava, T., Erkens, R., Wolff, G., Schmitt, J. P., Grandoch, M., Lundberg, J. O., Pernow, J., Isakson, B. E., Weitzberg, E., & Kelm, M. (2022a). Red blood cell eNOS is cardioprotective in acute myocardial infarction. *Redox Biology*, 54. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102370>

Daiber, A., & Münzel, T. (2020). Interplay of the red blood cell and vascular endothelial nitric oxide synthase system to combat cardiac complications of anemia. In *Basic*

Research in Cardiology (Vol. 115, Issue 4). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00395-020-0801-7>

Danylovykh, G. v., Bohach, T. v., & Danylovykh, Y. v. (2018). The biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Nitric oxide formation features and its functional role in mitochondria. In *Ukrainian Biochemical Journal* (Vol. 90, Issue 1, pp. 3–24). Palladin Institute of Biochemistry of the NASU. <https://doi.org/10.15407/ubj90.01.003>

Davis, M. J., & Sikes, P. J. (1990). Myogenic responses of isolated arterioles: Test for a rate-sensitive mechanism. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 259(6 28-6). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.6.h1890>

del Pozo, R., Hernandez Gonzalez, I., & Escribano-Subias, P. (2017). The prostacyclin pathway in pulmonary arterial hypertension: a clinical review. In *Expert Review of Respiratory Medicine* (Vol. 11, Issue 6, pp. 491–503). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17476348.2017.1317599>

Diesen, D. L., Hess, D. T., & Stamler, J. S. (2008). Hypoxic vasodilation by red blood cells: Evidence for an s-nitrosothiol-based signal. *Circulation Research*, 103(5), 545–553. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.176867>

Donald, J. A., Forgan, L. G., & Cameron, M. S. (2015). The evolution of nitric oxide signalling in vertebrate blood vessels. In *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* (Vol. 185, Issue 2, pp. 153–171). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00360-014-0877-1>

Dudzinski, D. M., Igarashi, J., Greif, D., & Michel, T. (2006). The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 46, pp. 235–276). <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121844>

Dufour, S. P., Patel, R. P., Brandon, A., Teng, X., Pearson, J., Barker, H., Ali, L., Yuen, A. H. Y., Smolenski, R. T., & González-Alonso, J. (2010). Erythrocyte-dependent regulation of human skeletal muscle blood flow: Role of varied oxyhemoglobin and

- exercise on nitrite, S-nitrosohemoglobin, and ATP. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 299(6).
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00389.2010>
- Duncker D, B. R. (2008). Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiological Reviews*.
- Edwards, G., Félétou, M., & Weston, A. H. (2010). Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: A synopsis. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 459, Issue 6, pp. 863–879).
<https://doi.org/10.1007/s00424-010-0817-1>
- Edwards, T. M., & Rickard, N. S. (2007). New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 31, Issue 3, pp. 413–425).
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.11.001>
- Eligini, S., Porro, B., Lualdi, A., Squellerio, I., Veglia, F., Chiorino, E., Crisci, M., Garlaschè, A., Giovannardi, M., Werba, J. P., Tremoli, E., & Cavalca, V. (2013). Nitric Oxide Synthetic Pathway in Red Blood Cells Is Impaired in Coronary Artery Disease. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066945>
- Ellsworth, M. L., Ellis, C. G., & Sprague, R. S. (2016). Role of erythrocyte-released ATP in the regulation of microvascular oxygen supply in skeletal muscle. In *Acta Physiologica* (Vol. 216, Issue 3, pp. 265–276). <https://doi.org/10.1111/apha.12596>
- Ellsworth, M. L., Forrester, T., Ellis, C. G., & Dietrich, H. H. (1995a). The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 269(6), 38-6).
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.6.h2155>
- Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Hermann, C., Busse, R., & Fleming, I. (2000). Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiologica Scandinavica*, 168(1), 81–88.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2000.00627.x>

- Fleming, I., & Busse, R. (2001). Vascular cytochrome P450 in the regulation of renal function and vascular tone: EDHF, superoxide anions and blood pressure. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 16(7), 1309–1311. <https://doi.org/10.1093/ndt/16.7.1309>
- Fleming, I., & Busse, R. (2003). *invited review Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00323>
- Förstermann, U., & Münzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. In *Circulation* (Vol. 113, Issue 13, pp. 1708–1714). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532>
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. In *European Heart Journal* (Vol. 33, Issue 7). <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Fronek, K., We ZWEIFACH, B., & Zweifach, B. W. (n.d.). *Microvascular pressure distribution in skeletal muscle and the effect of vasodilation*. www.physiology.org/journal/ajplegacy
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. v. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. In *Nature* (Vol. 288). <https://www.nature.com/articles/288373a0>
- Ghosh, A., Garee, G., Sweeny, E. A., Nakamura, Y., & Stuehr, D. J. (2018). Hsp90 chaperones hemoglobin maturation in erythroid and nonerythroid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(6), E1117–E1126. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717993115>
- Gillman, M. A. (2018). Mini-Review: A Brief History of Nitrous Oxide (N₂O) Use in Neuropsychiatry. *Current Drug Research Reviews*, 11(1), 12–20. <https://doi.org/10.2174/1874473711666181008163107>

- Gladwin, M. T. (2006). ROLE OF THE RED BLOOD CELL IN NITRIC OXIDE HOMEOSTASIS AND HYPOXIC VASODILATION. *Hypoxia and Exercise*.
- Gladwin, M. T., Crawford, J. H., & Patel, R. P. (2004). The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: Role in blood flow regulation. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 36, Issue 6, pp. 707–717). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.032>
- Gladwin, M. T., & Kim-Shapiro, D. B. (2008). The functional nitrite reductase activity of the heme-globins. *Blood*, 112(7), 2636–2647. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-115261>
- Goodwill, A. G., Dick, G. M., Kiel, A. M., & Tune, J. D. (2017). Regulation of coronary blood flow. *Comprehensive Physiology*, 7(2), 321–382. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160016>
- Han, T. H., Hyduke, D. R., Vaughn, M. W., Fukuto, J. M., & Liao, J. C. (2002). Nitric oxide reaction with red blood cells and hemoglobin under heterogeneous conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7763–7768. <https://doi.org/10.1073/pnas.122118299>
- Helms, C. C., Gladwin, M. T., & Kim-Shapiro, D. B. (2018). Erythrocytes and vascular function: Oxygen and nitric oxide. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 9, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00125>
- Hester, R. L., & Hammer, L. W. (2002). *invited review Venular-arteriolar communication in the regulation of blood flow*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu>
- Hoffman, J. F., Dodson, A., Wickrema, A., & Dib-Hajj, S. D. (2004). Tetrodotoxin-sensitive Na⁺ channels and muscarinic and purinergic receptors identified in human erythroid progenitor cells and red blood cell ghosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33), 12370–12374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404228101>

- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide (endothelium-dependent relaxation/vascular smooth muscle/cyclic GMP)* (Vol. 84).
- Ignarro, L. J., Napoli, C., & Loscalzo, J. (2002). *Nitric Oxide Donors and Cardiovascular Agents Modulating the Bioactivity of Nitric Oxide An Overview Reviews*. <http://www.circresaha.org>
- Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Stamler, J. S., Jiao, T., Collado, A., & Pernow, J. (1996). S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control Erythrocytes from patients with ST-elevation myocardial infarction induce cardioprotection through the purinergic P2Y₁₃ receptor and nitric oxide signaling. In *Nature* (Vol. 380). <https://www.nature.com/articles/380221a0>
- Kagan, V. E., Freisleben, H.-J., Tsuchiya, M., Forte, T., Packer, L. ; C. J., Gilbert, H. F., Serbinova, E. A., Packer, L., & Scita, G. (1993). Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 330, Issue 6).
- Keszler, A., Piknova, B., Schechter, A. N., & Hogg, N. (2008). The reaction between nitrite and oxyhemoglobin: A mechanistic study. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9615–9622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705630200>
- Kirby, B. S., Crecelius, A. R., Voyles, W. F., & Dinunno, F. A. (2012). *Clinical/Translational Research Impaired Skeletal Muscle Blood Flow Control With Advancing Age in Humans Attenuated ATP Release and Local Vasodilation During Erythrocyte Deoxygenation*. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112>
- Kirby, B. S., Schwarzbaum, P. J., Lazarowski, E. R., Dinunno, F. A., & McMahon, T. J. (2015). Liberation of ATP secondary to hemolysis is not mutually exclusive of regulated export. In *Blood* (Vol. 125, Issue 11, pp. 1844–1845). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-609610>

- Kleinbongard, P., Schulz, R., Rassaf, T., Lauer, T., Dejam, A., Jax, T., Kumara, I., Gharini, P., Kabanova, S., Özüyaman, B., Schnürch, H. G., Gödecke, A., Weber, A. A., Robenek, M., Robenek, H., Bloch, W., Rösen, P., & Kelm, M. (2006a). Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*, 107(7), 2943–2951. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-3992>
- Kolluru, G. K., Bir, S. C., & Kevil, C. G. (2012). Endothelial dysfunction and diabetes: Effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. In *International Journal of Vascular Medicine* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/918267>
- Kulandavelu, S., Balkan, W., & Hare, J. M. (2015a). Regulation of oxygen delivery to the body via hypoxic vasodilation. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 112, Issue 20, pp. 6254–6255). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506523112>
- Lankhorst, S., Danser, A. H. J., & van den Meiracker, A. H. (2016). Endothelin-1 and antiangiogenesis. *REVIEWS 14 Th International Conference on Endothelin Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 310, 230–234. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00373.2015.-Antiangio>
- Laughlin, M. H., McAllister, R. M., Jasperse, J. L., Crader, S. E., Williams, D. A., & Huxley, V. H. (1996). Endothelium-mediated control of the coronary circulation. Exercise training-induced vascular adaptations. In *Sports Medicine* (Vol. 22, Issue 4, pp. 228–250). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.2165/00007256-199622040-00003>
- Lavallée, M., Takamura, M., Parent, R., & Thorin, E. (2001). Crosstalk Between Endothelin and Nitric Oxide in the Control of Vascular Tone. In *Heart Failure Reviews* (Vol. 6).
- Leo, F., Hutzler, B., Ruddiman, C. A., Isakson, B. E., & Cortese-Krott, M. M. (2020). Cellular microdomains for nitric oxide signaling in endothelium and red blood cells. In *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* (Vol. 96, pp. 44–53). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.01.002>

- Leo, F., Suvorava, T., Heuser, S. K., Li, J., Lobue, A., Barbarino, F., Piragine, E., Schneckmann, R., Hutzler, B., Good, M. E., Fernandez, B. O., Vornholz, L., Rogers, S., Doctor, A., Grandoch, M., Stegbauer, J., Weitzberg, E., Feelisch, M., Lundberg, J. O., ... Cortese-Krott, M. M. (2021a). Red Blood Cell and Endothelial eNOS Independently Regulate Circulating Nitric Oxide Metabolites and Blood Pressure. *Circulation*, 870–889. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049606>
- Levine, A. B., Punihale, D., & Levine, T. B. (2012). Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology (Switzerland)*, 122(1), 55–68. <https://doi.org/10.1159/000338150>
- Lim To, W. K., Kumar, P., & Marshall, J. M. (2015). Hypoxia is an effective stimulus for vesicular release of ATP from human umbilical vein endothelial cells. *Placenta*, 36(7), 759–766. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.04.005>
- Liu, V. W. T., & Huang, P. L. (2008). Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. In *Cardiovascular Research* (Vol. 77, Issue 1, pp. 19–29). <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.06.024>
- Loscalzo, J., & Welch, G. (1995). *Progress in Cardiovascular Diseases Nitric Oxide and Its Role in the Cardiovascular System*.
- Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L., & Snyder, S. H. (n.d.). *Nitric Oxide: A Physiologic Messenger*. https://doi.org/10.7326/0003-4819-120-3-199402010-00009?url_ver=Z39.88-2003&rfr_d=or:rd:crossref.org&rfr_dat=cr_pub
- Luiking, Y. C., Engelen, M. P. K. J., & Deutz, N. E. P. (2010). Regulation of nitric oxide production in health and disease. In *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* (Vol. 13, Issue 1, pp. 97–104). <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328332f99d>
- Mahdi, A., Collado, A., Tengbom, J., Jiao, T., Wodaje, T., Johansson, N., Farnebo, F., Färnert, A., Yang, J., Lundberg, J. O., Zhou, Z., & Pernow, J. (2022). Erythrocytes

- Induce Vascular Dysfunction in COVID-19. *JACC: Basic to Translational Science*, 7(3), 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2021.12.003>
- Mahdi, A., Cortese-Krott, M. M., Kelm, M., Li, N., & Pernow, J. (2021). Novel perspectives on redox signaling in red blood cells and platelets in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 168, 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.020>
- Mahdi, A., Tengbom, J., Alvarsson, M., Wernly, B., Zhou, Z., & Pernow, J. (2020). Red Blood Cell Peroxynitrite Causes Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus via Arginase. *Cells*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071712>
- Majed, B. H., & Khalil, R. A. (2012). Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 540–582. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004770>
- Marginedas-Freixa, I., Alvarez, C. L., Moras, M., Leal Denis, M. F., Hattab, C., Halle, F., Bihel, F., Mouro-Chanteloup, I., Lefevre, S. D., le Van Kim, C., Schwarzbaum, P. J., & Ostuni, M. A. (2018). Human erythrocytes release ATP by a novel pathway involving VDAC oligomerization independent of pannexin-1. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29885-7>
- Marín, R., Chiarello, D. I., Abad, C., Rojas, D., Toledo, F., & Sobrevia, L. (2020). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in early-onset and late-onset preeclampsia. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1866, Issue 12). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165961>
- Matin, J., & Angeles Rodri, M. (1997). *Role of Vascular Nitric Oxide in Physiological and Pathological Conditions* (Vol. 75, Issue 2).
- Matsushita, H., Chang, E., Glassford, A. J., Cooke, J. P., Chiu, C. P., & Tsao, P. S. (2001). eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization. *Circulation Research*, 89(9), 793–798. <https://doi.org/10.1161/hh2101.098443>

- McCann Haworth, S. M., Zhuge, Z., Nihlén, C., von Rosen, M. F., Weitzberg, E., Lundberg, J. O., Krmar, R. T., Nasiell, J., & Carlström, M. (2021). Red blood cells from patients with pre-eclampsia induce endothelial dysfunction. *Journal of Hypertension*, 39(8), 1628–1641. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002834>
- Melikian, N., Seddon, M. D., Casadei, B., Chowienczyk, P. J., & Shah, A. M. (2009). Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. In *Trends in Cardiovascular Medicine* (Vol. 19, Issue 8, pp. 256–262). <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2010.02.007>
- Misiti, F., Carelli-Alinovi, C., & Rodio, A. (2022). ATP release from erythrocytes: A role of adenosine. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 80(2), 61–71. <https://doi.org/10.3233/CH-221379>
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., & Vane, J. R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. In *Geophys. J. R. astr. Soc* (Vol. 263).
- Moncada, S., & Higgs, E. A. (2006). The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 147, Issue SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706458>
- Nelson, S. H., Steinsland, O. S., Wang, Y., Yallampalli, C., Dong, Y. L., & Sanchez, J. M. (2000). Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circulation Research*, 87(5), 406–411. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.5.406>
- Özüyaman, B., Grau, M., Kelm, M., Merx, M. W., & Kleinbongard, P. (2008a). RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 14, Issue 7, pp. 314–322). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.05.002>
- Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., & Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. In *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* (Vol. 23, Issue 2, pp. 75–93). <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.04.007>

- Racine, M. L., & Dinunno, F. A. (2019a). Reduced deformability contributes to impaired deoxygenation-induced ATP release from red blood cells of older adult humans. *Journal of Physiology*, 597(17), 4503–4519. <https://doi.org/10.1113/JP278338>
- Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I., & Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
- Saldanha, C. (2016). Physiological role of erythrocyte nitric oxide. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 64(4), 517–520. <https://doi.org/10.3233/CH-168028>
- Sandow, S. L. (2004). FACTORS, FICTION AND ENDOTHELIUM-DERIVED HYPERPOLARIZING FACTOR. In *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (Vol. 31). <http://www.apps.org.au>
- Sandow, S. L., Senadheera, S., Grayson, T. H., Welsh, D. G., & Murphy, T. v. (2012). Calcium and endothelium-mediated vasodilator signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 740, 811–831. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_36
- Sartori, C., & Scherrer, U. (1999). Insulin, nitric oxide and the sympathetic nervous system: at the crossroads of metabolic and cardiovascular regulation. In *Journal of Hypertension* (Vol. 17). 1517±1525 & Lippincott Williams & Wilkins.
- Sautebin, L. (2000). Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. In *Fitoterapia* (Vol. 71, Issue SUPPL. 1). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00181-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00181-7)
- Schauf, B., Lang, U., Stute, P., Schneider, S., Dietz, K., Aydeniz, B., & Wallwiener, D. (2002). REDUCED RED BLOOD CELL DEFORMABILITY, AN INDICATOR FOR HIGH FETAL OR MATERNAL RISK, IS FOUND IN PREECLAMPSIA AND IUGR. In *www.dekker.com HYPERTENSION IN PREGNANCY* (Vol. 21, Issue 2). www.dekker.com

- Secomb, T. W. (2008). Theoretical models for regulation of blood flow. *Microcirculation*, 15(8), 765–775. <https://doi.org/10.1080/10739680802350112>
- Sessa, W. C. (2004). eNos at a glance. In *Journal of Cell Science* (Vol. 117, Issue 12, pp. 2427–2429). <https://doi.org/10.1242/jcs.01165>
- Settergren, M., Böhm, F., Malmström, R. E., Channon, K. M., & Pernow, J. (2009). L-Arginine and tetrahydrobiopterin protects against ischemia/reperfusion-induced endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 204(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.08.034>
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., & Parvathy, S. S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. In *Inflammopharmacology* (Vol. 15, Issue 6, pp. 252–259). <https://doi.org/10.1007/s10787-007-0013-x>
- Shin, S., Mohan, S., & Fung, H. L. (2011). Intracellular l-arginine concentration does not determine NO production in endothelial cells: Implications on the “ l-arginine paradox.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(4), 660–663. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.112>
- Simmonds, M. J., Detterich, J. A., & Connes, P. (2014). Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology*, 51(2–3), 121–134. <https://doi.org/10.3233/BIR-140653>
- Sluyter, R., Shemon, A. N., Barden, J. A., & Wiley, J. S. (2004). Extracellular ATP increases cation fluxes in human erythrocytes by activation of the P2X 7 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44749–44755. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405631200>
- Spencer, N. Y., Zeng, H., Patel, R. P., & Hogg, N. (2000). Reaction of S-nitrosoglutathione with the heme group of deoxyhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36562–36567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005347200>

- Sprague, R. S., Ellsworth, M. L., Stephenson, A. H., & Lonigro, A. J. (1996). ATP: The red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 271(6 40-6). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.271.6.h2717>
- Sprague, R. S., Hanson, M. S., Achilleus, D., Bowles, E. A., Stephenson, A. H., Sridharan, M., Adderley, S., & Ellsworth, M. L. (n.d.-a). *Rabbit Erythrocytes Release ATP and Dilate Skeletal Muscle Arterioles in the Presence of Reduced Oxygen Tension*.
- Stamler, J. S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D. I., Keaney, J., Vita, J., Singeli, D., Valerit, C. R., & Loscalzo, J. (1992). Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin (S-nitrosoalbumin/endothelium-derived relaxing factor). In *Biochemistry* (Vol. 89).
- Stamler J.S. (1997). Blood Flow Regulation by S-Nitrosohemoglobin in the Physiological Oxygen Gradient. *Science*.
- Stanek, A., Gadowska-Cicha, A., Gawron, K., Wielkoszycki, T., Adamek, B., Cielar, G., Wiczowski, A., & Siero, A. (2008). Role of Nitric Oxide in Physiology and Pathology of the Gastrointestinal Tract. In *Reviews in Medicinal Chemistry* (Vol. 8).
- Stricker, N. L., Christopherson, K. S., Yi, B. A., Schatz, P. J., Raab, R. W., Dawes, G., Bassett, D. E., Bredt, D. S., & Li, M. (1997). PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. In *Nature Biotechnology* (Vol. 15). Altmetric Metrics. <https://www.nature.com/articles/nbt0497-336>
- Taguchi, K., Matsumoto, T., Kamata, K., & Kobayashi, T. (2012). Akt/eNOS pathway activation in endothelium-dependent relaxation is preserved in aortas from female, but not from male, type 2 diabetic mice. *Pharmacological Research*, 65(1), 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.08.009>
- Tanneur, V., Duranton, C., Brand, V. B., Sandu, C. D., Akkaya, C., Kasinathan, R. S., Gachet, C., Sluyter, R., Barden, J. A., Wiley, J. S., Lang, F., & Huber, S. M.

- (2006). Purinoceptors are involved in the induction of an osmolyte permeability in malaria-infected and oxidized human erythrocytes. *The FASEB Journal*, 20(1), 133–135. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3371fje>
- Troiano, J. A., Potje, S. R., Graton, M. E., Gonçalves, E. T., Tostes, R. C., & Antoniali, C. (2021). Caveolin-1/Endothelial Nitric Oxide Synthase Interaction Is Reduced in Arteries From Pregnant Spontaneously Hypertensive Rats. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.760237>
- Ulker, P., Gunduz, F., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2013a). Nitric oxide generated by red blood cells following exposure to shear stress dilates isolated small mesenteric arteries under hypoxic conditions. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 54(4), 357–369. <https://doi.org/10.3233/CH-2012-1618>
- Ulker, P., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2010). Nitric oxide generation in red blood cells induced by mechanical stress. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 45(2–4), 169–175. <https://doi.org/10.3233/CH-2010-1293>
- Ulker, P., Özen, N., Abdullayeva, G., Köksoy, S., Yaraş, N., & Basrali, F. (2018). Extracellular ATP activates eNOS and increases intracellular NO generation in Red Blood Cells. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 68(1), 89–101. <https://doi.org/10.3233/CH-170326>
- Ulker, P., Sati, L., Celik-Ozenci, C., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2009). Mechanical stimulation of nitric oxide synthesizing mechanisms in erythrocytes. *Biorheology*, 46(2), 121–132. <https://doi.org/10.3233/BIR-2009-0532>
- Ulker, P., Yaras, N., Yalcin, O., Celik-Ozenci, C., Johnson, P. C., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2011a). Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 24(4), 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.03.003>
- Uotila, J. T., Tuimala, R. J., Aarnio, T. M., & Py Y K K, A. (1993). Findings on lipid peroxidation and antioxidant function in hypertensive complications of pregnancy. In *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* (Vol. 100).

- Vega-Sánchez, R., Tolentino-Dolores, M. C., Cerezo-Rodríguez, B., Chehaibar-Besil, G., & Flores-Quijano, M. E. (2020). Erythropoiesis and red cell indices undergo adjustments during pregnancy in response to maternal body size but not inflammation. *Nutrients*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/nu12040975>
- Wallace, J. L. (2018). *Nitric oxide in the gastrointestinal tract: opportunities for drug development Correspondence Dr.* <https://doi.org/10.1111/bph.v176.2/issuetoc>
- Wan, J., Ristenpart, W. D., & Stone, H. A. (2008). Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16432–16437. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805779105>
- Wang, L., Olivecrona, G., Götberg, M., Olsson, M. L., Winzell, M. S., & Erlinge, D. (2005). ADP acting on P2Y₁₃ receptors is a negative feedback pathway for ATP release from human red blood cells. *Circulation Research*, 96(2), 189–196. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000153670.07559.E4>
- Wheatley, C. (2007). The return of the Scarlet Pimpernel: Cobalamin in inflammation II - Cobalamins can both selectively promote all three nitric oxide synthases (NOS), particularly iNOS and eNOS, and, as needed, selectively inhibit iNOS and nNOS. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*, 16(3–4), 181–211. <https://doi.org/10.1080/10520290701791839>
- Wilcox, G. (2005). Insulin and Insulin Resistance. In *Clin Biochem Rev* (Vol. 26).
- Wischmann, P., Kuhn, V., Suvorava, T., Muessig, J. M., Fischer, J. W., Isakson, B. E., Haberkorn, S. M., Flögel, U., Schrader, J., Jung, C., Cortese-Krott, M. M., Heusch, G., & Kelm, M. (2020). Anaemia is associated with severe RBC dysfunction and a reduced circulating NO pool: vascular and cardiac eNOS are crucial for the adaptation to anaemia. *Basic Research in Cardiology*, 115(4). <https://doi.org/10.1007/s00395-020-0799-x>
- Wolff, C. B., Collier, D. J., Shah, M., Saxena, M., Brier, T. J., Kapil, V., Green, D., & Lobo, M. (2016). A discussion on the regulation of blood flow and pressure.

Advances in Experimental Medicine and Biology, 876, 129–135.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3023-4_16

Wood, K. C., Cortese-Krott, M. M., Kovacic, J. C., Noguchi, A., Liu, V. B., Wang, X., Raghavachari, N., Boehm, M., Kato, G. J., Kelm, M., & Gladwin, M. T. (2013). Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(8), 1861–1871.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.301068>

Yang, J., Gonon, A. T., Sjöquist, P. O., Lundberg, J. O., & Pernow, J. (2013). Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(37), 15049–15054.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1307058110>

Yang, J., Zheng, X., Mahdi, A., Zhou, Z., Tratsiakovich, Y., Jiao, T., Kiss, A., Kövamees, O., Alvarsson, M., Catrina, S. B., Lundberg, J. O., Brismar, K., & Pernow, J. (2018). Red Blood Cells in Type 2 Diabetes Impair Cardiac Post-Ischemic Recovery Through an Arginase-Dependent Modulation of Nitric Oxide Synthase and Reactive Oxygen Species. *JACC: Basic to Translational Science*, 3(4), 450–463. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.03.006>

Zhang, C., & Chilian, W. M. (2008). *Regulation of Coronary Microvascular Resistance in Health and Disease* 12.2.3 Myogenic Control Mechanisms.
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/myogenic-response2/11>

Zhang, H., Shen, Z., Hogan, B., Barakat, A. I., & Misbah, C. (2018a). ATP Release by Red Blood Cells under Flow: Model and Simulations. *Biophysical Journal*, 115(11), 2218–2229. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.09.033>

Zhang, H., Shen, Z., Hogan, B., Barakat, A. I., & Misbah, C. (2018b). ATP Release by Red Blood Cells under Flow: Model and Simulations. *Biophysical Journal*, 115(11), 2218–2229. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.09.033>

- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. S. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. In *Journal of Pharmacological Sciences* (Vol. 129, Issue 2, pp. 83–94). Japanese Pharmacological Society. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>
- Zhou, L., & Zhu, D. Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. In *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* (Vol. 20, Issue 4, pp. 223–230). <https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.03.001>
- Zhou, Z. (2021). Purinergic interplay between erythrocytes and platelets in diabetes-associated vascular dysfunction. In *Purinergic Signalling* (Vol. 17, Issue 4, pp. 705–712). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11302-021-09807-5>
- Zhou, Z., Mahdi, A., Tratsiakovich, Y., Zahorán, S., Kövamees, O., Nordin, F., Uribe Gonzalez, A. E., Alvarsson, M., Östenson, C. G., Andersson, D. C., Hedin, U., Hermes, E., Lundberg, J. O., Yang, J., & Pernow, J. (2018). Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(7), 769–780. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.052>
- Zhuge, Z., Haworth, S., Nihlén, C., Carvalho, L. R. R. A., Heuser, S. K., Kleschyov, A. L., Nasiell, J., Cortese-Krott, M. M., Weitzberg, E., Lundberg, J. O., & Carlström, M. (2023). Red blood cells from endothelial nitric oxide synthase-deficient mice induce vascular dysfunction involving oxidative stress and endothelial arginase I. *Redox Biology*, 102612. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102612>
- Zhuge, Z., McCann Haworth, S., Nihlén, C., Carvalho, L. R. R. A., Heuser, S. K., Kleschyov, A. L., Nasiell, J., Cortese-Krott, M. M., Weitzberg, E., Lundberg, J. O., & Carlström, M. (2023). Red blood cells from endothelial nitric oxide synthase-deficient mice induce vascular dysfunction involving oxidative stress and endothelial arginase I. *Redox Biology*, 60. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102612>

Ziganshin, A. U., Hoyle, C. H. V., Lambrecht, G., Mutschler, E., Bäumert, H. G., & Burnstock, G. (1994). Selective antagonism by PPADS at P2X-purinoceptors in rabbit isolated blood vessels. *British Journal of Pharmacology*, 111(3), 923–929. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb14827.x>

Zweier, J. L., Samouilov, A., & Kuppusamy, P. (1999). Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1411, Issues 2–3, pp. 250–262). [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00018-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00018-3)



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ece	Uyruğu	T.C
Soyadı	KILAVUZ		

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Muratpaşa Lisesi	2010
Lisans	Pamukkale Üniversitesi-Biyoloji Bölümü	2016
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi- Fizyoloji ABD Tezli YL Programı	2023

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Preeklampsi Hastalarından Elde Edilen Eritrositlerin İletim Tipi Damarlarda Endotel Aracılı Gevşeme Yanıtlarına Etkisinin İncelenmesi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2020-(Devam)