

**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİGARA DUMANI MARUZİYETİNE BAĞLI DAMAR HASARININ
MOLEKÜLER TEMELİ VE YENİ TEDAVİ YAKLAŞIMI: ALFA-
LİNOLENİK ASİT**

Halil Mahir KAPLAN

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK**

ADANA-2013

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

**SİGARA DUMANI MARUZİYETİNE BAĞLI DAMAR HASARININ
MOLEKÜLER TEMELİ VE YENİ TEDAVİ YAKLAŞIMI: ALFA-
LİNOLENİK ASİT**

Halil Mahir KAPLAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
TF2010D3 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2013

KABUL VE ONAY

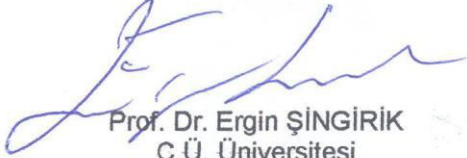
Farmakoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan

“Sigara Dumanı Maruziyetine Bağlı Damar Hasarının Moleküler Temeli ve Yeni Tedavi Yaklaşımı: Alfa-Linolenik Asit”

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 18 / 06 / 2013

TEZ SINAV JÜRİSİ



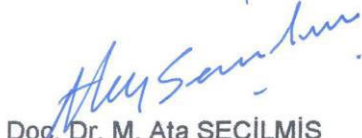
Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK
Ç.Ü. Üniversitesi
Başkan



Yard. Doç. Dr. Hakan KURT
Maraş Sütçü İ. Üniversitesi
Raportör



Prof. Dr. Cemil GÖÇMEN
Ç.Ü. Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. M. Ata SEÇİLMİŞ
Ç.Ü. Üniversitesi
Üye



Yard. Doç. Dr. Besim ÖZAYKAN
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / 2013 tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımız için gerekli bilimsel ortamı sağlayan tez yöneticisi hocam sayın Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK'e, araştırmanın tüm aşamalarında maddi, manevi büyük desteği için Prof. Dr. Naciye YAKTUBAY DÖNDAŞ'a, ayrıca diğer hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma yardımları ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma Ç.Ü. Araştırma Fonu tarafından, TF2010D3 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Sigara dumanı	3
2.2. Esansiyel yağ asitleri	4
2.3. Fosfolipaz A ₂	10
2.4. Siklooksijenaz yolağı ve siklooksijenaz-2	12
2.5. NO ve eNOS	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Kullanılan Kimyasal Ajanlar	20
3.2. Organ Banyosu Deneyleri	21
3.3. ELISA Deneyleri	21
3.3.1. Homojenizasyon	21
3.3.2. Protein Miktar Tayini	22
3.3.3. ELISA testleri	22
3.3.3.1. ELİSA Siklooksijenaz-2 Enzim Miktar Tayini	22
3.3.3.2. ELİSA Fosfolipaz A ₂ enzim miktar tayini	22
3.3.3.3. ELİSA Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Enzim Miktar Tayini	23
3.3.3.4. ELİSA Kotinin Miktar Tayini	23
3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi	23
4. BULGULAR	25

4.1. Kontrol ve Sigara dumanı uygulanan farelerin idrar kotinin seviyeleri	25
4.2. Organ banyosu deneyleri	25
4.2.1. Asetilkolin gevşeme yanıtları	25
4.2.2. Papaverin gevşeme yanıtları	26
4.3. ELISA deneyleri	27
4.3.1. Sitozolik fosfolipaz A ₂ enzim miktar tayini	27
4.3.2. Siklooksijenaz 2 Enzim Miktar Tayini	28
4.3.3. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Enzim Miktar Tayini	29
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	34
7. KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1. Yağ asiti metabolizması
- Şekil 2. Omega 3 ve 6 yağ asitleri
- Şekil 3. Siklooksijenaz yolağı
- Şekil 4. COX-1 ve COX-2'nin substrat bağlayıcı kanalları arasındaki yapısal farklılıkların şematik gösterimi
- Şekil 5. Duman uygulaması düzeneğı
- Şekil 6. Sigara dumanı maruziyetinin asetilkolin ile oluşturulan gevşeme yanıtlarına etkisi(n=6-9). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (* : Kontrole göre $P<0.05$. # Duman kontrole göre $P<0.05$).
- Şekil 7. Sigara dumanı maruziyetinin papaverin ile oluşturulan gevşeme yanıtlarına etkisi(n=6-9). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (* : Kontrole göre $P<0.05$).
- Şekil 8. Sigara dumanı maruziyetinin Fosfolipaz A₂ enzimine etkisi(n=6). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (* : Kontrole göre $P<0.05$. # Duman kontrole göre $P<0.05$).
- Şekil 9. Sigara dumanı maruziyetinin siklooksijenaz-2 enzimine etkisi(n=6). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (* : Kontrole göre $P<0.05$. # Duman kontrole göre $P<0.05$).
- Şekil 10. Sigara dumanı maruziyetinin endotelial nitrik oksit sentaz enzimine etkisi(n=6). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni.
- Şekil 11. Sigara dumanı ve COX-2.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo I. Fosfolipazların dokulardaki dağılımları

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALA	Alfa-linolenik asit
DHA	Dokosaheksaenoik asit
EPA	Eikosapentaenoik asid
LPS	Lipoprotein sakkarit
NF-kB	Nükleer faktör kappa-B
MAPK	Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
TNF-alfa	Tümör nekroz faktör alfa
α	Alfa
PG	Prostaglandin
EDRF	Endotelyum kaynaklı gevşeme faktörü
sGC	Guanilat siklaz
NO	Nitrik oksid
cGMP	Siklik guanozinmonofosfat
eNOS	Endotelyal nitrik oksid sentaz
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksid sentaz
nNOS	Nöronal nitrik oksid sentaz
ICAM-1	Hücreler arası adhezyon molekülü-1
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
V-DL	Çok düşük dansiteli lipoprotein
KCl	Potasyum klorür
Ca^{+2}	Kalsiyum
PLA ₂	Fosfolipaz A ₂
COX-1	Siklooksijenaz-1
COX-2	Siklooksijenaz-2
PKC	Protein kinaz C
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonu
DAG	Diaçilgliserol

GPCRs	G protein-kenetli reseptörler
IP3	İnozitol-1,4,5- trisfosfat
PI3K-C2 α	Sınıf 2 fosfatidilinozitol 3-kinaz'ın α isoformu
PLC	Fosfolipaz C
BH ₄	Tetrahidrobiop-terin
FAD	Flavin adenin dinükleotid
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
FMN	Flavin mono nükleotid

ÖZET

Sigara Dumanı Maruziyetine Bağlı Damar Hasarının Moleküler Temeli ve Yeni Tedavi Yaklaşımı: Alfa-Linolenik Asit

Sigara dumanı maruziyeti damar hasarına neden olmaktadır. Ve bu hasarın mekanizması moleküler düzeyde yeterince aydınlatılmamıştır. Bundan dolayı şimdiki çalışmada farelerde antiinflamatuvar etkisi olduğu bilinen ve doğal olarak gıdalarda bulunan alfa-linolenik asit'in sigara dumanı maruziyeti ile oluşan damar hasarını önleyip önleyemeyeceğini araştırmayı planladık.

Bu amaçla fareler çeşitli gruplara ayrıldı: Kontrol (duman varlığında ve yokluğunda), alfa-linolenik asit (duman varlığında ve yokluğunda) grupları oluşturuldu. Bu gruplara ayrı ayrı 2 ay boyunca (haftada 5 gün) sigara dumanı ve ilgili ajanlar uygulandı. 2 ay sonunda uygulama yapılan fareler servikal dislokasyon ile öldürülerek torasik aortları izole edildi. İzole edilen torasik aortların bir bölümü endotel fonksiyonlarını değerlendirmek için organ banyosuna asıldı. Daha sonra dokular fenilefrin ile kastırılıp asetilkolin ile gevşetildi. Alfa-linolenik asit uygulaması asetilkolin gevşemelerini artırdı. Duman uygulaması gevşeme yanıtlarını azaltırken duman ile birlikte Alfa-linolenik asit uygulaması bu azalmayı geri çevirdi. Düz kas fonksiyonlarını değerlendirmek için ise KCl ile kastırıldıktan sonra papaverine verdiği gevşeme yanıtları ölçüldü. Sigara dumanı, alfa-linolenik asit ve indometazin uygulaması papaverin ile oluşturulan gevşeme yanıtlarını değiştirmede. Torasik aortların bir bölümü de nitrik oksid sentaz, fosfolipaz A₂ ve siklooksijenaz enzimlerinin düzeyleri belirlemek için kullanıldı. Sigara dumanı siklooksijenaz-2 ve fosfolipaz A₂ enziminin miktarında artışa neden oldu. Alfa-linolenik asit bu artışı azalttı. Sigara dumanı endotelial nitrik oksit sentaz enziminin miktarında azalmaya neden oldu ancak bu azalma anlamlı bulunmadı.

Çalışmamız, sigara kullanımı ve duman maruziyeti kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olduğu ve alfa-linolenik asit içerikli besin kullanımının bu hastalıkların riskini azaltabileceğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Sigara dumanı, Alfa-linolenik asit, Fare torasik aortu, Nitrik oksid sentaz, Fosfolipaz A₂ yolağı.

ABSTRACT

The Molecular Basis Of Vessel Damage Induced By Cigarette Smoke Exposure And New Treatment Approach: Alpha-Linolenic Acid

Exposure to cigarette smoke causes vessel damage. And mechanism of this damage has not yet been clearly identified. Therefore in the present study we aimed to investigate whether vessel damage due to the cigarette smoke exposure will be prevented by the alpha-linolenic acid which has antiinflammatory effect in mice.

In experimental study, mice (Swiss albino, male age: 8 weeks) separated into some groups such as controls (with and without cigarette smoke exposure) alpha-linolenic acid (with and without cigarette smoke exposure) and indomethacin (with and without cigarette smoke exposure). The cigarette smoke application continued 5 days in a week during two months. In the end of two months, the mice were killed by cervical dislocation and their blood and thoracic aortas were isolated. Some of isolated aortas used in organ bath experiments for testing endothelial functions. The tissues were precontracted with phenylephrine then relaxed with acetylcholine. Treatment with alpha-linolenic acid increased acetylcholine relaxations. Smoke treatment decreased acetylcholine relaxation. Smoke with alpha-linolenic acid treatment increased acetylcholine relaxations versus just smoke treatment. For testing smooth muscle functions the tissues were precontracted with KCl then relaxed papaverine. There were no variations between testing groups. Other parts of thoracic aortas were used to determine endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and phospholipase A₂ enzymes levels. Smoke exposure caused rising in cyclooxygenase-2 and phospholipase A₂ levels. This rising inhibited with alpha-linolenic acid treatment. Smoke exposure decreased eNOS levels. But this result was not statistically significant.

Using cigarette and smoke exposure is risk factor of cardiovascular disease. Our study showed that alpha-linolenic acid rich diets can decrease the risk of this disease

Key words: Cigarette smoke, Alpha-linolenic acid, Mice thoracic aortae, Nitric oxide synthase, Phospholipase A₂ pathway

1. GİRİŞ

Sigara kullanımı kardiyovasküler hastalıklara yönelik büyük bir risktir. Epidemiyolojik çalışmalar, sigara kullanımının trombozis, ateroskleroz gelişimi, miyokard infarktusu, vasküler graft başarısızlığı ve koroner arter hastalıkları ile birlikte hipertansiyon ve endotelyal disfonksiyonun önemli nedenlerinden olduğunu göstermiştir¹⁻⁴.

Sigara kullanımı plazmadaki kombine nitrit, nitrat ve antioksidan yoğunluğunu düşürür⁵. Sigara dumanı maruziyeti endotel hücrelerindeki L-arjinin-NO sentaz yolağını etkileyerek NO üretimini azaltır. Buna ilave olarak L-arjinin transportunu, nitrik oksid sentaz ekspresyonunu ve aktivitesini azaltır⁶. Uzun süreli sigara dumanı maruziyeti fare karotid arterinin yapısını dönüşümsüz olarak bozar ve elastikiyetini azaltır⁷. Ayrıca sigara kullanımı kronik obstrüktif akciğer hastalığı riskini artırır. A vitamininin azalmasına neden olarak akciğer parankim hücrelerinin yıkımına ve elastikiyetinin azalmasına bağlı bir hastalık olan amfizemin gelişimine neden olur⁸. Sigara kullanımı serbest oksijen radikallerinin artmasına neden olarak oksidatif stresi artırır. Artan oksidatif stres NO inaktivasyonu yaparak endotelyal disfonksiyona katkıda bulunur ve koroner damarların kan akımının azalmasına neden olur⁹. Sigara dumanının maruziyeti siklooksijenaz-2 (COX-2), prostaglandin E₂ ve hücreler arası adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) sentezini arttırarak infalasyon gelişmesine ve ateroskleroza neden olur¹⁰.

Sigara dumanı partikül ve gaz fazında 4000'den fazla kimyasal madde içerdiği için her bir maddenin olumsuz etkilerinin patofizyolojisini ortaya koymak zordur⁴. Vasküler düz kas hücrelerinin ve endotel hücrelerinin proliferasyonunu stimüle eden sigara dumanının temel bileşeninin nikotin olduğu gösterilmiştir¹⁰⁻¹⁵. Nikotin inkübasyonu noradrenalin ile kastırılmış koroner arterin asetilkoline verdiği gevşeme yanıtlarını azaltır, ayrıca karotid arter hücre kültüründe, hücrelerin nikotin ile muamelesi eNOS ekspresyonunu düşürür¹⁷.

Yüksek doz intragastrik nikotin uygulaması mukozal prostaglandin E₂ sentezini azaltırken fosfolipaz A₂ ve total fosfolipid seviyesini değiştirmediği bildirilmiřtir¹⁸. Bunun yanı sıra nikotinin sıçan basiler arterinde kasılma oluşturduğu ve bu kasılmaların çoğunluğu endotel kaynaklı iken bir kısmının nikotinik reseptör kaynaklı olduğu

bununla birlikte nikotin ile oluşturulan kasılmaların fosfolipaz C, fopsfolipaz A₂ ve siklooksijenaz 2 inhibitörleri ile inhibe edildiği gösterilmiştir¹⁹.

Sigara dumanının yukarda bahsedildiği gibi birçok olumsuz etkileri karşı çalışmamızda kullandığımız, bitki(keten tohumu, soya vb.) ve balık yağında doğal olarak bulunan alfa-linolenik asit (ALA)'in çeşitli yararları vardır. Bu yararlar şöyle sıralanabilir. Omega 3 yağ asidi olarak da bilinen ALA kalp ve kardiyovasküler sistem için koruyucu bir besindir^{20,21}, araşidonat yapısına katılan dokozaheksaenoik asit (DHA) ve pentaneoik asid (EPA)'in ön maddesidir²². Alfa-linolenik asit diyeti ile beslenen spontan hipertansif sıçanların kan basıncının düştüğü gösterilmiştir²³. 12 haftalık alfa-linolenik asit diyeti yüksek, orta ve normal tansiyonlu japonların sistolik ve diyastolik kan basınçlarını düşürdüğü bildirilmiştir²⁴. Alfa linolenik asid'in antioksidan etkinliği vardır. oksidatif stresi azaltması inflamasyonun önlenmesine de katkı sağlar²⁵. Alfa-linolenik asit lipopolisakkarit (LPS)'in neden olduğu inflamasyonu da azaltır. Alfa-linolenik asit ayrıca nükleer faktör kappa-B (NF-kB) translokasyonunu ve mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MAPK)'ın fosforilasyonunu inhibe eder. Bu inhibisyon iNOS, COX-2 ve tümör nekroz faktör alfa (TNF-alfa) gibi inflamatuvar faktörlerinin ekspresyonlarını azaltır²⁶.

Çalışmamızda sigara dumanına bağlı fare torasik aortunda meydana gelen inflamasyonun moleküler temelinin araştırılması planlanmaktadır, buna ilave olarak antiinflamatuvar etkileri olan alfa-linolenik asid'in damarlarda sigara dumanı ile indüklenen inflamasyon üzerinde potansiyel tedavi edici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Sigara Dumanı

Sigara kullanımı kardiyovasküler hastalıkların en önemli nedenlerindendir. Sigara dumanı içerisinde 4000 bileşen tanımlanmıştır. Sigara içimi sırasında çok sayıda serbest radikal ve reaktif oksijen ürünleri açığa çıkmaktadır²⁷. Sigaranın çeşitli kanser türlerine neden olduğu rapor edilmektedir²⁸⁻³¹. Sigara dumanının zararlı içeriğinin en önemlisi nikotindir. Nikotin absorbe edildikten sonra yarılanma ömrü kısadır ve hızlıca metabolize edilerek kotinin'e dönüşür. Kotininin yarılanma ömrü nikotinden daha uzundur. Nikotin yarılanma ömrü yaklaşık 180 dakika iken kotininin yarılanma ömrü yaklaşık 1300 dakika kadardır. Nikotin bir alkaloid olup tütünün psikoaktif ve bağımlılığın oluşmasına yol açan komponentidir. Nikotin nikotinik reseptörlere çok yüksek afinite gösterir. Nikotinik reseptörler çok çeşitli yapılarda bulunması nedeniyle bu maddenin farmakolojik etkileri karışıktır. Nikotin kolinerjik yapıları başlangıçta stimüle ederken sürekli depolarizasyon ve reseptör duyarsızlaşması sonucu bu yapıları felç eder. Düşük dozda otonom gangliyonlar ve adrenal medullada stimülasyon yapar ve impuls aşırımını fasilite eder.

Nikotin kolesterol sentezini artırdığı ve lipoprotein metabolizmasını etkileyerek ateroskleroza yol açtığı gösterilmiştir³². Sigaranın içinde ağır metallerden toksik olan kadmiyum da bulunur. Sigara dumanının içerisinde bulunan kadmiyumun uzun süreli maruziyeti bu metalin karaciğerde birikmesine neden olurken olmaktadır. Kadmiyum hepatositlerin apoptozisini indüklemektedir³³. Bu nedenle sigara dumanının uzun süre solunması karaciğer dokusunun yapısını bozmaktadır. Sıçanlarda yapılan çalışmalar sigara dumanının karaciğer hücrelerinde lipid tanecikleri, sinüzoidlerde genişleme ve düzensizliklere neden olduğu gösterilmiştir³⁴.

Sigara dumanının etkisinde kalan arteriyel endotelde çeşitli morfolojik değişikliklerin meydana geldiği bildirilmektedir³⁵. Sigara içimi ile koroner arter hastalıklarının yakın ilişkisinin bulunduğu da bilinen bir gerçektir³⁶. Son araştırmalarda endotel hücre hasarı ile aterosklerotik hastalıkların direk ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Endotelial geçirgenlik artışı aterosklerotik hastalıkların gelişiminde öncü rol oynamaktadır³⁷⁻³⁹. Sigara dumanı içinde bulunan serbest radikaller endotel hasarının en

büyük sorumlusudur⁴⁰. Sigara dumanı ile birlikte metal iyonları da inhale edilir^{41, 42}. Demir ve bakır gibi geçiş metal iyonları oksijen radikallerinin üretimine aracılık ederek endotel hasarını artırır⁴⁰. Oksidatif zedelenme sonucu hücre içinde kalsiyum miktarının arttığı bilinmektedir. Hücre içinde kalsiyumun artması kalsiyuma bağımlı proteazları aktive ederek hücre hasarının artmasına neden olur. Bu nedenle metal iyonları ve serbest radikaller zararlı etkiler oluşturmaktadır⁴³. Dolaşımdaki serbest reaktif oksijen radikallerinin artması endotel hasarı oluşturarak ateroskleroza neden olmaktadır.⁴⁰

Sigara dumanı akciğer ve diğer organlarda kanser gelişimi için büyük bir risk faktörüdür. Sigara dumanı maruziyeti dolaşım sistemine semikinin ve p-benzosemikinon gibi suda çözünabilir oksidantların dolaşım sistemine geçmesiyle proteinlerde, lipidlerde ve DNA'da oksidatif hasara neden olur. Artan oksidatif stres hücreyi kanser gelişimine götürür⁴⁴. Sigara dumanı reaktif oksijen ürünlerini arttırarak mitokondrinin işlevlerini bozar. Bununla birlikte ısı şok proteinleri ve bazı inflamatuvar ajanların gen transkripsiyonlarının artmasına neden olur⁴⁵. Ayrıca artan oksidatif stres rhoA ve fokal adhezyon kinazın aktivitesini azaltarak endotelyum duvarının fonksiyonunu bozar⁴⁶. Artan oksidatif stres ve antioksidan sistemlerin bozulmasıyla reaktif oksijen ürünleri nitrikoksit'in inaktivasyonu sonucu endotelyal disfonkiyona neden olur. Oluşan reaktif oksijen ürünleri eNOS/NO yolağını bloke ederek endotel hücrelerinin fonksiyonunu bozar⁴⁷. Sigara dumanı vasoproliferatif ajanlar olan endotelin ve vasküler endotelyal büyüme faktörü gibi mediyatörlerin artmasına neden olmaktadır⁴⁸.

2.2. Esansiyel yağ asitleri

Yağlar, insan organizması için önemli bir besindir. Yüksek enerji kaynağıdır. Yağda çözünen vitaminleri içerirler ve lipoproteinlerin yapısına katılarak kan lipid düzeylerinde rol almaları bakımından da önem arzederler.

Balık yağlarının yağ asidi içeriği üzerindeki çalışmalar 1900'lü yılların ortalarında başlamıştır. Sonraki çalışmalar balık yağlarının bileşenlerini ortaya koymuş ve insan sağlığı üzerindeki faydalı etkileri nedeniyle bu alanda birçok çalışma yapılmasına neden olmuştur.

Oda sıcaklığında çift bağ içermeyen yağ asitleri katı halde bulunurken çift bağ içeren yağ asitleri ise sıvı haldedirler. Bununla birlikte yaşamın devamlılığı için de çok önemlidirler. İnsan vücudunda üretilemedikleri için temel yağ asitleri olarak adlandırılırlar. Mısır ve soyada omega 6 yağ asidi olarak bilinen linoleik asit bol miktarda bulunur. Keten tohumu, ceviz ve planktonlar ile balıklarda omega 3 olarak bilinen linolenik asit ise bol miktarda bulunur. Keten tohumu yağı ve cevizde alfa-linolenik asit, balık yağlarının ise eikosapentaenoik asit (EPA) ve dekosahekzaenoik asit (DHA) temel içeriğidir.

Çift bağ taşıyan yağ asitleri taşıdığı bağ sayısına göre monoansature ve poliansature yağ asitleri (PUFA) olarak adlandırılırlar.

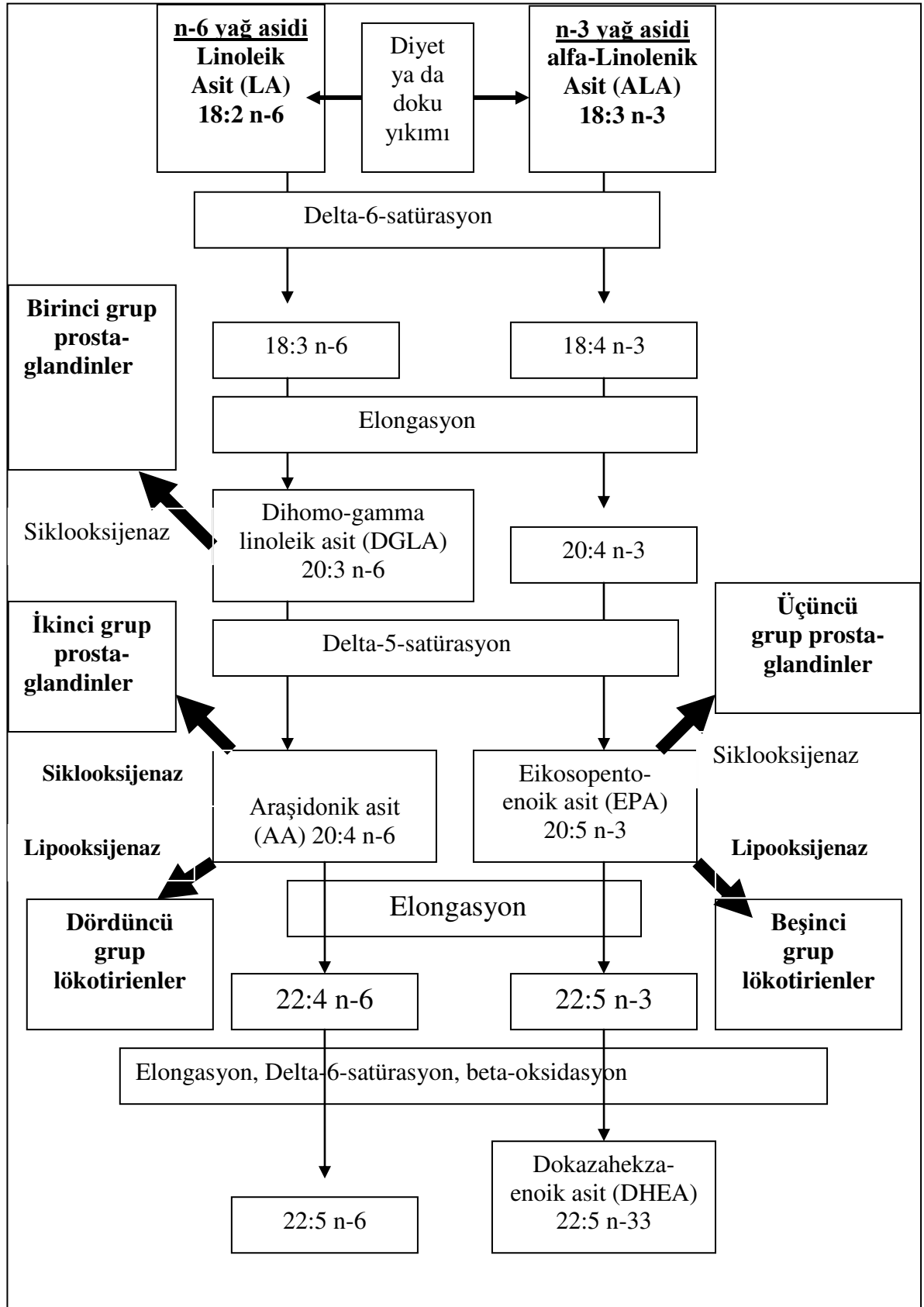
Kara bitkiler genellikle omega 6 yağ asitleri üretirken su bitkileri (mavi-yeşil algler ve soğuk suda yaşayan bitkiler) ise omega 3 yağ asidi üretirler. Balık yağındaki PUFA'lar grubunda 5'ten fazla çift bağ içeren PUFA'lar, yüksek doymamış yağ asitleri (HUFA) olarak isimlendirilirler. İnsanlara en çok faydası olan HUFA'lar EPA ve DHA'dır.

Birçok besin α -linolenik asit içermekte, ancak Omega 3 PUFA'ların insanlar için temel kaynağı balıklardır. Bir balığın yağ asidi içeriği, o balığın beslenme biçimine bağlıdır ve balık yağın ve bu yağdaki omega 3 yağ asitlerinin miktarı, balığın yaşadığı ortamın besin çeşidine bağlıdır. Karasal bitkilerin yağ içeriği omega 6 yağ asiti bakımından yüksektir ve bazılarında az miktarlarda omega 3 yağ asiti bulunur⁴⁹.

Linoleik, linolenik ve araşidonik asit esansiyel yağ asitleri olarak bilinirler. Bu yağ asitleri hayvanlar tarafından sentez edilemedikleri için bunlar mutlaka dışarıdan alınmaları şarttır. Omega-3 ve omega-6 yağ asitleri EPA ve DHA'ya dönüşebilir. Bitki tohumlarından elde edilen yağlarda linoleik asit, balık yağında ise linolenik asit bol miktarda bulunur. Linoleik asitten karbon zincirinin uzaması (elengasyon) ve çift bağ sayısının artması (desaturasyon) sonucu araşidonik asit meydana gelir⁵⁰. Bitkilerin aksine hayvanlar ve insanlar omega 1'in metil grubu ile omega 7 karbon atomu arasına çift bağ oluşturmamışlarından, omega-3 ve omega-6 grubu içeren doymamış yağ asitlerini sentezleyemezler. Bu nedenle linoleik ve linolenik asitler esansiyeldir ve bunlardan da hayvanlar mitokondrilerinde uzun zincirli ve çoğunlukla doymamış yağ asitleri sentezlenmektedir⁵¹. Esansiyel yağ asitleri vücutta doymamış yağ asitlerine,

bunlar da önce ekosanoid isimli 20 karbonlu yağ asidine dönüştürülmekte, sonra da prostanoid denilen prostaglandinler, tromboksanlar ve lökotrienler sentezlenmektedir. Bunlar hormon benzeri bileşikler olup, hücrelerde membran geçirgenliği ile enzim ve reseptör aktivitesini etkilemektedirler. EPA ve DHA asitler n-3 grubunun başlıca yağ asitleri olup, beyin dokusu ve retinanın yapısına girmektedirler⁵².

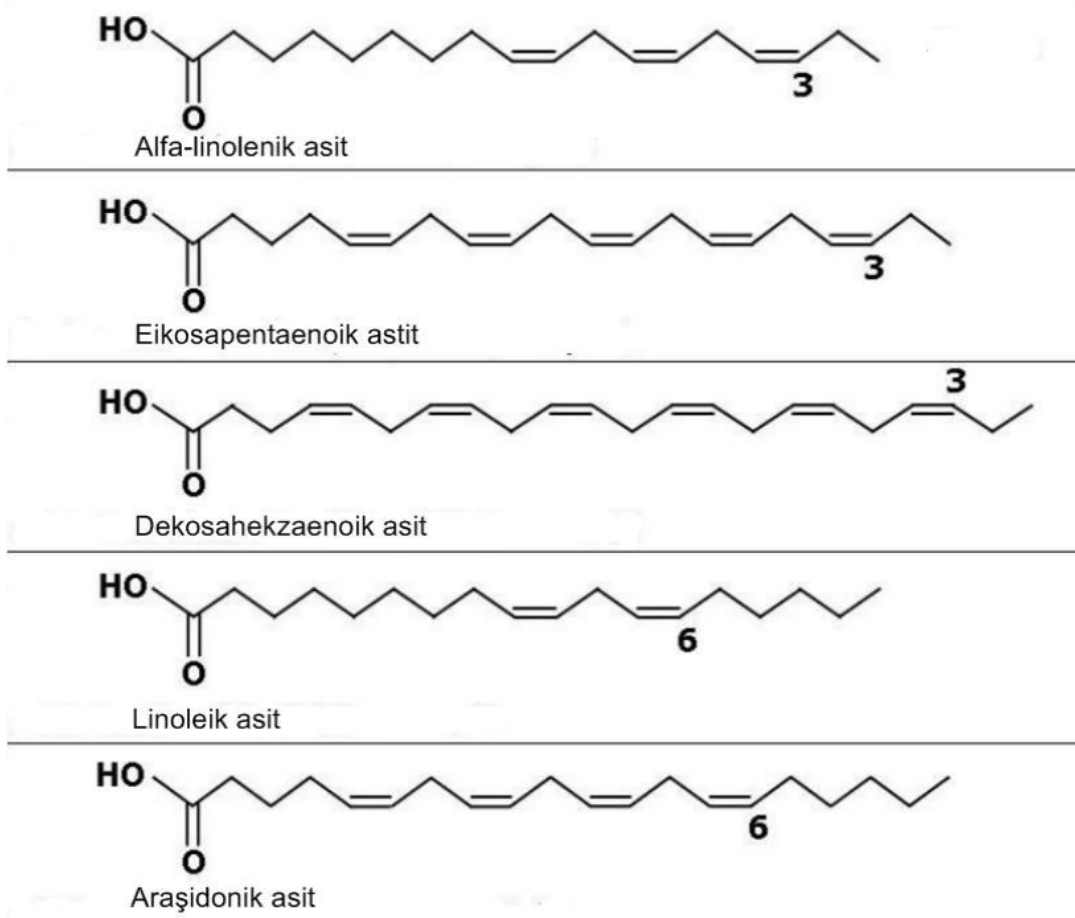
Alfa-linolenik asit desatüraz ve elongaz enzimler vasıtasıyla EPA ve DHA gibi diğer yağ asitlerine dönüşür (Şekil 1).



Şekil 1. Yağ asiti metabolizması

Omega 3 (alfa-linolenik asit) (Şekil 2), Omega 6 (linoleik asit) ve Omega 9 (oleik asit)'dan oluşan omega yağ asitlerinin beyin gelişimi, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, koroner kalp hastalıklarının önlenmesi gibi fonksiyonları bulunmaktadır. Eksikliklerinde insanlarda bazı deri hastalıkları, astım, diyabet, artritis, büyümede gerileme, kanser ve öğrenme güçlüğü görülmektedir⁵³. Ayrıca omega 3 yağ asidi ile zengin diyetin kalp-damar hastalıkları, hipertansiyon, sinirsel bozuklukları ile birlikte bağışıklık sisteminde rol aldığı gösterilmiştir.

Alfa-linolenik asit kalp ve kardiyovasküler sistem için koruyucu bir besindir (20,21). Araşidonat yapısına katılan dokozaheksaenoik asit (DHA) ve pentaneoik asit (EPA)'in ön maddesidir²². Alfa-linolenik asit diyeti ile beslenen spontan hipertansif sıçanlarda kan basıncının düştüğü gösterilmiştir²³. Ayrıca alfa-linolenik asit diyeti yüksek, orta ve normal tansiyonlu japonların sistolik ve diyastolik kan basınçlarını düşürdüğü bildirilmiştir²⁴. Alfa linolenik asid'in antioksidan etkinliği vardır. Oksidatif stresi azaltması inflamasyonun önlenmesine de katkı sağlar²⁵. Alfa-linolenik asit lipoprotein sakkarit (LPS)'in neden olduğu inflamasyonu da azaltır. Alfa-linolenik asit ayrıca nükleer faktör kappa-B (NF-kB) translokasyonunu ve mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MAPK)'in fosforilasyonunu inhibe eder. Bu inhibisyon iNOS, COX-2, TNF-alfa gibi inflamatuvar faktörlerinin ekspresyonlarını azaltır²⁶.



Şekil 2. Omega 3 ve 6 yağ asitleri

Ayrıca omega-3 yağ asitleri prostaglandinlerin sentezinde görev alır⁵⁴. Kardiyovasküler hastalıkların riskini azaltır⁵⁵⁻⁵⁷. Bağışıklık sistemini de düzenlediği gösterilmiştir⁵³. Prostaglandinler vücut sıcaklığı, inflamasyon, ağrı, dolaşım sistemi, boşaltım sistemi ve sindirim sisteminin düzenlenmesinden sorumludurlar. Bununla birlikte kan pıhtılaşması ve bazı hormonların sentezlenmesi için de önem arzetmektedirler⁵⁸.

Esansiyel yağ asitleri doğal kan viskozitesini artırma özelliğine sahip olup, kalp krizine yol açabilen kan pıhtılaşmasını önleyebilmektedirler. Bu yağ asitleri, artrit ve otoimmün hastalıklarının semptomlarını hafifleten doğal antiinflamatuvar bileşikler de içermektedirler. Temel yağ asitlerinden fakir bir diyet; kepek, egzema, çatlak tırnaklar, mat ve kırılğan saçlar gibi deri problemlerine neden olabilmektedir. Söz konusu yağ asitleri bağırsak sistemi içerisindeki hücrelerin yapısını etkilemekte ve ince bağırsağın içini kaplayan mikrovillüslerin yüzey alanını arttırmaktadırlar. Bu da besinlerin daha iyi

emilimine neden olmaktadır. Ayrıca esansiyel yağ asitlerinin içerdiği bileşiklerin hayvan çalışmalarında kanser hücrelerini bloke edebildiğini, insanlarda ise omega-3 grubu yağ asitlerinin göğüs kanseri hücrelerini inhibe ettiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Omega-3 yağ asitlerinin, eritrositlerin dayanıklılığını arttırdığı, kanın viskozitesinde azalmaya yol açtığı ve böylece kılcal damarlarla beslenen dokulara oksijen teminini kolaylaştırdığı öne sürülmektedir. Ayrıca bu yağ asitlerinin antihipertansif etki gösterdikleri bildirilmektedir⁵⁸.

Omega-6 metabolizması daha hızlıdır⁵¹. Bu sebeple vücuttaki omega-6 ve omega-3 yağ asitlerinin birbirine oranı çok önemlidir. İdeal bir diyetle bulunması istenilen omega 6/omega 3 oranı 5:1 ile 10:1 arasında olması istenilmektedir. Yapılan bir araştırmada; Eskimoların Danimarkalılarına göre kan plazmasında düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) düzeylerinin daha düşük, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeylerinin ise daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu durumun omega-3 yağ asitleri bakımından zengin diyetlerle beslenen Eskimoların uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin, doymuş yağ asitlerine oranının, omega-6 yağ asitleri bakımından zengin diyetle beslenen Danimarkalıların oranından fazla olduğundan kaynaklandığı gösterilmiştir^{59, 60}. Diyetteki yağ asitlerinin serum lipoprotein seviyelerini etkiledikleri bilinmektedir⁶¹.

Plazmasındaki lipid düzeyinin yükselmesi koroner kalp hastalıkları ve arteroskleroz riskini artırır. Lipoproteinlerin içerisinde yer alan kolesterol bu riskin sorumlusudur.⁵⁸. Balık yağı hiperlipidemik hastalarda, LDL'yi düşürüp HDL'yi artırıp kolesterolün de azalmasını neden olmaktadır. Trombin formasyonundaki azalma ve plazma fibrinolitik aktivitesindeki artış da aterom plağının büyümesini engelleyerek damar tıkanıklığını önlemektedir⁵⁸. Balık yağı ve Omega-3 yağ asitleri ile zengin diyetin yüksek kolesterolün neden olduğu arteroskleroz ve koroner kalp hastalıklarından meydana gelen ölümleri azalttığı gösterilmiştir⁶⁰.

2.3. Sitozolik fosfolipazA₂

Fosfolipaz A₂ (FLA₂) fosfolipidlerden araşidonik asid ve diğer yağ asitlerinin oluşumu sağlamaktadır. FLA₂ enzimleri, fosfolipid *sn*-2 ester bağının hidrolizini katalizleyerek serbest yağ asidi ile lizofosfolipid yapılarını oluşturan enzim ailesine aittirler. FLA₂ enzimleri 14 kDa molekül ağırlığında olan ve katalizör olarak

kalsiyuma ihtiyaç duyan sekretuvar FLA₂ (secretory phospholypase A₂, sPLA₂), 85 kDa molekül ağırlığında olan kalsiyuma duyarlı sitozolik FLA₂ (cytosolic phospholypase A₂, cPLA₂), 29-85 kDa arasında molekül ağırlığına sahip olan kalsiyumdan bağımsız olan intraselüler FLA₂ (intracellular phospholypase A₂, iPLA₂) ve kalsiyumdan bağımsız lipid mediyatörü olan trombosit aktive edici faktör (TAF) ve okside fosfolipidleri hidroliz eden TAF asetilhidrolazlar olarak 4 gruba ayrılır⁶¹⁻⁶³. (Tablo 1).

Enzim	Molekül Ağırlığı (kDa)	Dokularda Dağılım
Sitozolik FLA₂	85	Damar düz kası kalp, akciğer, nötrofil, makrofaj, endotel hücreleri
İntraselüler FLA₂	85	Kalp, damar düz kası, makrofaj, lenfosit
Sekretuvar FLA₂	14	Kalp, lökosit, trombosit, mast hücreleri

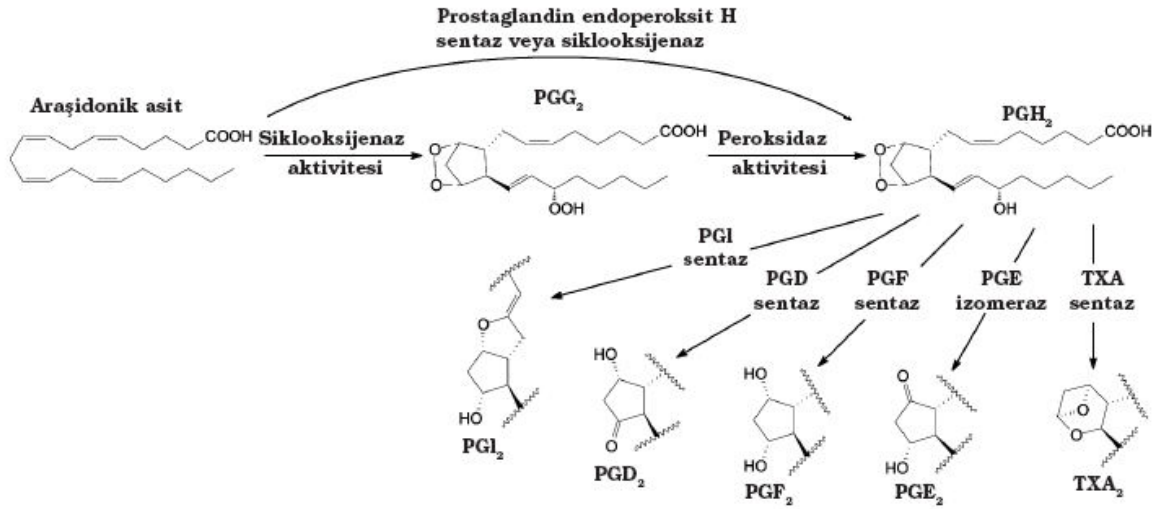
Tablo 1. Fosfolipazların dokulardaki dağılımları

Sitozolik FLA₂'nin molekül ağırlıkları sırası ile 85,110 ve 60 kDa olan α , β ve γ olmak üzere üç izomeri bulunmaktadır⁶⁴⁻⁶⁶. Araşidonik asit metabolizmasında, cFLA_{2 α} 'nın esas rolü vardır. Trombositler, makrofajlar, nötrofiller, endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, alveoler epitel hücreleri, böbrek mezenkimal hücreleri ve keratinositler gibi birçok farklı hücre tipleri sitozolik FLA₂ eksprese ederler. Büyüme faktörleri, mitojenler, vazoaktif peptitler, sitokinler, interferonlar gibi bazı ekstraselüler uyarılar sitozolik FLA₂'yi aktive ederler. Oksidasyon, hiperglisemi, ultraviyole ışığı ve sürtünme stresi gibi reseptör aracılıksız uyarılar sitozolik FLA₂ aktivasyonunu başlatabilmektedir⁶¹. Makrofaj benzeri hücreler, hem TAF tarafından indüklenen çabuk yanıt, hem de LPS tarafından indüklenen gecikmiş cevap oluştururlar. TAF, FLA₂'nin hızlı aktivasyonuna neden olurken, LPS hücreleri öncelikli olarak yeni protein efektörlerini sentez etmek aracılığı ile indükler. Her iki durumda da en önemli olay, hücre içinde sitozolik FLA_{2 α} enziminin translokasyonu ve aktivasyonudur⁶⁷.

Sitozolik FLA₂ enzimi, araşidonik asit içeren fosfolipidlerin özellikle *sn*-2 konumundaki araşidonik aside karşı spesifite gösterirken, diğer FLA₂ izoformlarında bu şekilde bir özellik söz konusu değildir^{62, 68}. Hücre sitozolünde bulunan sitozolik FLA₂, proinflamatuvar uyarı ile MAPK aktivasyonu ve kalsiyum artışını takiben aktive olmaktadır^{62,63,68,69}. Hücre içinde kalsiyum artışı, sitozolik FLA_{2 α} 'nin sitozolden siklooksijenaz (COX) ve 5-lipoksijenaz (5-LO) enzimlerinin bulunduğu endoplazmik retikulum ve nükleer membranlara transloke olmasını sağlamaktadır. Reseptörlere ligand bağlanması ile aktive edilen MAPK'ler sitozolik FLA_{2 α} 'yı *serine* (Ser)⁵⁰⁵ ve Ser⁷²⁷ üzerinden fosforile ederek hücre içinde transloke olmasını sağlamaktadırlar. Hücre kültürü ve *in vitro* kinaz eşeyleri ile yapılan çalışmalar, sitozolik FLA₂'nin ERK2 olarak da bilinen p42 MAPK için substrat olduğunu göstermektedir⁶¹. Ayrıca sitozolik FLA_{2 α} 'nın ayrıca Ca⁺²/kalmodülin bağımlı kinaz II tarafından da Ser⁵¹⁵ üzerinden fosforile edilerek membrana transloke olduğu gösterilmiştir⁶²

2.3. Siklooksijenaz (COX) Yolağı ve Siklooksijenaz-2

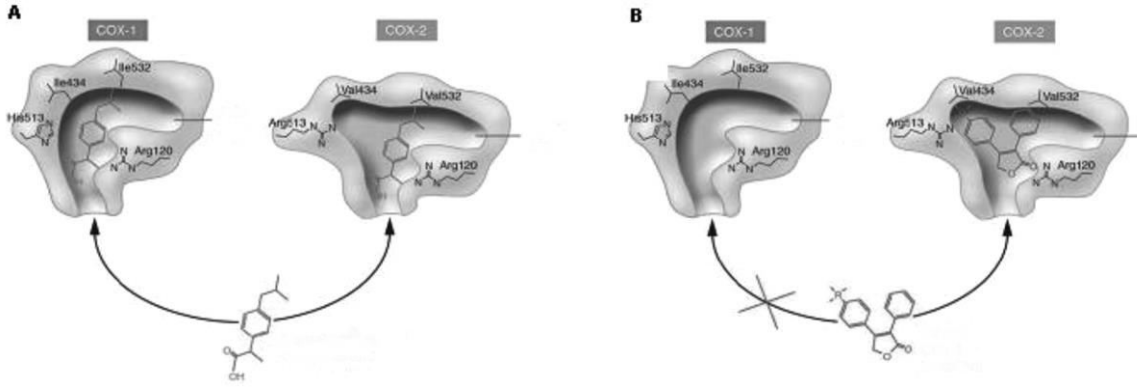
Araşidonik asit, hücre membranı fosfolipidlerinin hidrolizi sonucunda serbest hale geçen polidoymamış yağ asitidir. Çeşitli faktörlerin etkisiyle aktive olan fosfolipaz A₂ membran fosfolipitlerini hidroliz ederek araşidonik asitin salınımını sağlar. Araşidonik asit siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri ile sırasıyla prostanoidleri ve lökotrienleri (LT) meydana getirir(Şekil 3.). Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar son yüzyılda çok kullanılmalarına rağmen 1971 yılında COX enziminin yapısı teşhis edilene kadar etki mekanizmaları tam olarak bilinmeyen ilaçlar olmuşlardır. 1990'a kadar siklooksijenazın tek tipinin olduğu düşünülmüş, takiben hızla ilerleyen çalışmalar ve moleküler biyoloji tekniklerinin bu alanda yaygın olarak kullanılmasıyla siklooksijenazın konstitütif ve indüklenebilir tip olmak üzere iki tipinin olduğu ortaya çıkmıştır. Yapısal siklooksijenaza COX-1, indüklenebilir siklooksijenaza ise COX-2 denilmiştir. COX-1 ve COX-2 aynı reaksiyonları katalizlese de farklı yapı ve fonksiyonlara sahiptir⁷⁰.



Şekil 3. Siklooksijenaz yolağı⁷¹

Pek çok türde COX-1 ve COX-2'nin primer yapıları bilinmektedir. Memelilerde COX-1 ve COX-2 sırasıyla 576 ve 587 amino asitten oluşur. Bu iki izoform birbirine benzemesine rağmen, COX'lar endoplazmik retikulumun membranının yüzeyinde, COX-2 ise çoğunlukla çekirdeğin membranında lokalize olmuştur⁷². Bu iki enzimin üç boyutlu yapıları X-ışınlarıyla belirlenmiştir^{73,74}. Benzer enzimler olmalarına rağmen

COX-2 enziminin aktif bölgesi COX-1'den %20 daha büyüktür ve biraz daha farklıdır. Bunlar, çoğunlukla amino asit diziliminde iki amino asit değişiminin neden olduğu yapı ve şekil farklılıklarıdır⁷⁰. COX-1'de 523. konumunda izolösün (Ile) bulunurken COX-2'de bu, valin yer almaktadır. Ayrıca Ile -434'ün COX-2'de valin/Ile değişimi ve komşusundaki Phe-518 amino asiti, COX-2 enziminin aktif bölgesinde fark edilebilir bir hacim artırmak suretiyle ana kanalda küçük bir hidrofilik cep oluşturur. Phe-518 amino asiti bu cep için fazla alan oluşmasına ve bu cebe daha fazla bileşiğin ulaşmasına katkıda bulunur. COX-1'in 513. konumunda bulunan histidin yerine COX-2'de polar kısımlarla etkileşebilen arjinin bulunur ve ilaç etkileşim bölgesinin şeklini değiştirmemekle beraber kimyasal ortamı oldukça değiştirdiği bildirilmiştir⁷⁵.



Şekil 4. COX-1 ve COX-2'nin substrat bağlayıcı kanalları arasındaki yapısal farklılıkların şematik gösterimi

COX-2'de Val 434, Arg 513 ve Val 532 amino asitleri ikincil bir cep oluşturur. COX-1'de bu durum söz konusu değildir. (A) Non-selektif inhibitörler her iki enzimin substrat bağlayıcı bölümlerini ulaşabilirken, (B) COX-1'deki daha hacimli His 513, Ile 434 ve Ile 532 amino asitlerinden dolayı selektif COX-2 inhibitörlerinin COX-1'in büyük yan cebe ulaşmasını engeller (Şekil 4)⁷⁶.

COX-1 daha çok dokularda koruyucu etki gösterir ve böbrek, GİS'de trombosit agregasyonu ve homeostazis gibi fizyolojik koruyucu fonksiyonları düzenlerken, COX-2 enzimi bunların tersi yönünde etki yapar. COX-2 izoformu sağlıklı insanlarda bulunmaz. Sitokinler, tümör nekroz ajanlar, büyüme faktörleri, bakteriyel endotoksinler gibi proinflamatuar ajanlar COX-2'nin ekspresyonuna neden olurlar. COX-2 ürünü PG'ler inflamatuvar reaksiyonlarda major rol oynar ve kızarıklık, ateş, şişlik, ağrı ve fonksiyon kaybı gibi karakteristik inflamatuvar semptomlardan sorumludurlar⁷⁷.

Kolorektal ve göğüs kanseri gibi bazı kanser türlerinde de COX-2'nin indüklendiği ve oluşturduğu PG'lerle hücre apoptozunu engelleyerek kanser hücresi proliferasyonunu teşvik ettikleri görülmüştür. Ayrıca, Alzheimer ve Parkinson hastalarının beyinlerindeki plaklarda da COX-2'nin indüklendiği saptanmıştır⁷⁸.

Gastrik mukozanın bütünlüğünden ve renal fonksiyondan sorumlu PG'ler sadece COX-1 yoluyla üretilirken, inflamatuvar yanıtlara neden olan PG'ler ise sadece COX-2 yoluyla üretilir. COX-2 bobrekler üzerinde iyileştirici etki göstermesi yanında, hem doğal hem de patofizyolojik (karaciğer sirozu, renal yetmezlik ve konjestif kalp yetmezliği) koşullarda renal fonksiyonun (perfüzyon, su kullanımında, renin yapımında) önemli bir bölümünün düzenlenmesinde rol oynar⁷⁹.

2.4. NO ve eNOS

Nitrik oksit (NO) 1987 yılına kadar basit bir atmosfer gazı olduğu düşünülmüştür. Ancak endotelyum kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak bilinen yapının izole edilmesiyle nitrik oksit sentaz keşfedilmiş ve daha sonra EDRF'nin nitrik oksit olduğu bulunmuştur⁸⁰⁻⁸².

Renksiz bir gaz olan NO havada hızla O₂'le oksitlenerek nitrojen dioksit'e dönüşür. Nitrojen dioksit dokular için oldukça zararlıdır. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Nitrik oksidin, üzerinde yük taşımaması ve çiftlenmemiş elektron bulundurması, hücreden hücreye hiçbir engelle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır⁸³.

Düşük konsantrasyondaki NO, O₂'e nazaran hemoglobine 3000 kat bir affiniteyle bağlanır. Hemoglobin oksijen formunda ise NO'yi kısa sürede nitrata (NO₃) oksitleyerek etkisizleştirir⁸⁴. NO çok kısa yarılanma süresine sahiptir ve 2-30 saniye içinde daha stabil bir yapı olan nitrata oksitlenir^{85,86}.

Birçok hormon ve ilaç hücre içi etkilerini hücre yüzeyinde spesifik reseptörlere bağlanarak ve hücre içi siklik AMP konsantrasyonunu arttırarak gösterirlerken, NO ise etkisini guanozin trifosfatın (cGMP) konsantrasyonunu arttırarak gösterir. NO'nun hedefi, çözünebilir guanilat siklaz (sGC) enziminin hem grubudur. Düz kas hücresine geçen NO, guanilat siklazı aktive ederek, guanozin trifosfatın cGMP'ye dönüştürür.

Artan cGMP konsantrasyonu protein kinazı aktive ederek gevşemeye neden olur. Fosfodiesteraz enzimi cGMP'yi hidrolize etmesiyle bu etki sonlandırılır⁸⁷.

Damar düz kaslarının gevşemesi endotelden salınan NO ile sağlanarak kan akışı ve basıncı düzenlenir.^{83,88}

NO, santral sinir sisteminde hafıza oluşumu, denge, uyarı geçişi, koku alma gibi birçok fonksiyonları destekleyen bir nörotransmitter olarak fonksiyon göstermektedir⁸⁹. Periferik sinir sisteminde ise nonadrenerjik ve nonkolinerjik sinirleri etkileyerek vazodilatasyon, solunum, genitoüriner ve mide barsak fonksiyonlarının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır⁹⁰.

Ayrıca dolaşım sisteminde trombosit agregasyonunun ve adezyonunun engellenmesi, kalp kasılmasının düzenlenmesi gibi olaylara da katılmaktadır^{83,91}.

NO, trombosit agregasyonunu ve adezyonunu engellemesinde prostasiklinle sinerjistik bir etkileşme gösterir⁹²⁻⁹⁴. Ayrıca trombositler de NO sentez ederek trombosit aktivasyonunun kontrolüne katkıda bulunmaktadır⁹⁵. NO lökositlerin damar duvarıyla karşılıklı etkileşmesini de engeller^{91,96}. Damar endoteli ve düz kaslarında bulunan indüklenebilir NOS bazı sitokinler veya sitokin salınımını artıran endotoksin lipopolisakkaritler tarafından indüklenebilir. Fizyolojik şartlarda sadece konstitütif NOS (cNOS) aktiftir⁸³. Bu indüksiyon, damar endoteli ve düz kaslarında aynı anda meydana gelmektedir. İndüksiyon sonucu vazodilatasyon meydana gelir. Bu olay vazokonstriktörlere karşı oluşan bir direnç olarak fade edilebilir.

Endotelial kaynaklı NO, düz kas hücrelerine geçerek vazodilatasyona neden olmaktadır. Arterler venlerden daha fazla NO sentez ederler ve bu nedenle arterlerdeki gevşeme venlerdeki gevşemeden daha fazla olmaktadır. Bu durum arteriyel ve venöz koroner bypass graftlarını etkileyen önemli bir etkidir⁹⁷. Ateroskleroz, arterlerde gevşemenin azalmasına ve vazokonstriktör ajanlara karşı verilen cevabın azalmasına neden olduğu bildirilmiştir⁹⁸.

Endotel kaynaklı gevşeme, esansiyel hipertansiyonlu hastalarda da azalmaktadır⁹⁹. Çünkü bu hastalarda endotelium bağımlı NO sentezinin aksaması hipertansiyona neden olur¹⁰⁰. Deneysel çalışmalarda hayvana NOS inhibitörü (L-NMA, L-NAME ve diğerleri) verilmesi kan basıncını artırdığı bunun sonucunda glomerüller hasar ve sodyum atılımında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir^{101,102}. Hipertansiyona eğimli hayvanlara L-arjinin verilmesi bu hayvanların kan basıncını düşürdüğü

bildirilmiştir^{103,104}. Ayrıca esansiyel hipertansiyonlu ve sağlıklı insanlara L-arjinin infüzyonu sistolik ve diastolik basıncını da kısa sürede düşürmektedir¹⁰⁵. Anjiotensin-dönüştürücü enzim inhibitörlerinin bradikinin artışına neden olur bu durum endotelden NO salınımını stimüle ederek vazodilatasyona neden olmaktadır. Bununla birlikte diyabetli hayvanların damarlarında ve kalp akciğer transplantasyonu yapılan insanların izole akciğer arterlerinde endotel kaynaklı gevşemenin azaldığı tespit edilmiştir¹⁰⁶.

İdrarla L-arjinin metil türevleri (L-NMA, L-NAME ve diğerleri) normal şartlarda vücut dışına atılmaktadır. Akut böbrek yetmezliği olan hastaların bu maddelerin plazma düzeyleri aşırı derecede yükselmektedir¹⁰⁷. Bu inhibitörlerle NO sentezinin inhibisyonu, kan basıncının yükselmesine ve lökositlerde fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır.

Nitrik oksit sentaz (NOS), hücre içinde sürekli bir şekilde var olan ve vasküler tonus ile nöronal aşırım için aralıklarla ve küçük miktarlarda NO üretir. Nöronal yapılar, endotel hücreleri, endokard, miyokard ve trombositlerde bulunur. Kofaktör olarak Ca^{+2} /kalmoduline bağımlıdır ve hücre içi Ca^{+2} düzeyini yükselten agonistlerle aktive edilir. Hücre içinde Ca^{+2} 'un yükselmesi kalmodulinin NOS'a bağlanmasına neden olur ve hızlı bir şekilde pikomolar düzeylerde NO sentezlenir⁸³.

3 farklı NOS formu vardır⁸⁷;

- Nöronal (nNOS veya NOS-1)
- İndüklenebilir (iNOS veya NOS-2)
- Endotelyal (eNOS veya NOS-3)

eNOS ve nNOS, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artıran asetilkolin ve bradikinin gibi ajanlarca aktive edilir. Makrofajlar ve diğer bağışıklık hücrelerinde bulunan iNOS sitokinlerce, uyarılır ve kalsiyum/kalmoduline bağımlı değildir. NOS'un üzerinde NADPH, FAD, FMN ve tetrahidrobiopterin gibi kofaktörleri ve prostetik grupları bağlamak için birçok düzenleyici kısım vardır. Hücrede eNOS esas olarak hücre membranında kaveolde kaveolinlere bağlı bulunurken nNOS stoplazmada bulunur. NOS'un izoformları aminoasit dizilişleri bakımından %50 benzerlik gösterir. N-metil-L-arginin, N-nitro-L-arginin ve N-amino-L-arginin gibi L-arginin analogları NOS'u inhibe eder. Ayrıca imidazol türevleri ve aminoguanidin gibi kimyasal ajanlar da inhibe etmektedir¹⁰⁸⁻¹¹¹.

134 kD'luk iki benzer monomerden oluşan eNOS fonksiyonel olabilmesi için dimerik formda olması gerekir. Monomerleri kodlayan gen 7q35-36 kromozomu üzerinde bulunur ve 21 kb'lik 26 ekson taşır¹¹².

Hem grunun bağlanması Enzimin dimerik hale getirir, hem grubunun yokluğunda enzim monomer halde kalır. Tetrahydrobiopterin (BH₄) bağlanması dimerik hale geçmesiyle mümkün olur ve dimer kararlı duruma geçer. Kararlı hale geçişte çinko da önemlidir¹¹³. Dimerin fonksiyonu, BH₄ konsantrasyonuna da bağlıdır. eNOS BH₄'e bağlanmamışken sadece O₂ üretir, BH₄'e bağlanmasıyla O₂ ve NO üretir. Ortamda BH₄ konsantrasyonunun fazla olması doymuş eNOS yaratarak sadece NO sentezleyen bir enzim oluşmasını sağlar. Monomerlerin katalitik bölümü içeren N-terminal oksijenaz (amino asit 1-491) ve NADPH, FAD ve FMN bağlanma bölümlerinin bulunduğu redüktaz (amino asit 492-1205) olmak üzere fonksiyonel iki bölümü vardır. Enzimin hücre içindeki belirli değildir. En yoğun olarak membran üzerinde bulunan kaveolde bulunduğu gösterilmiştir. eNOS kaveolde bulunan kaveolin adı verilen proteinlere sarılı olarak inaktiftir. Hücre içi serbest kalsiyumun artması ile enzim bu proteinden ayrılır, aktif hale gelir ve ortamdaki L-arginin, oksijen ve NADPH'dan NO üretimi yapar. Söz konusu enzim serbest kalsiyum düzeyi düşene kadar aktif kalır. eNOS enzimi bazal bir düzeyde üretilse de düşük oksijen, östrojen gibi hormonlar, düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve mekanik uyarılar gibi faktörler ekspresyonu artırabilir¹¹³⁻¹¹⁷.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Ç.Ü. Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (TIBDAM)'den etik kurul izni alınarak yapılmıştır.

Deneylerde Ç.Ü. Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (TIBDAM)'dan sağlanan 8 haftalık balb/c albino türü erkek fareler kullanıldı.

Fareler 6 deney grubuna ayrıldı.

1. Kontrol (Dumansız, n=10)
2. Alfa-linolenik asit (400 mg/kg/gün; gavaj) uygulanan (Dumansız, n=10)
3. İndometazin uygulanan (0.2 mg/kg; gavaj) (Dumansız, n=10)
4. Kontrol (Dumanlı, n=10)
5. Alfa-linolenik asit uygulanan (400 mg/kg/gün; gavaj) (Dumanlı, n=10)
6. İndometazin (0.2 mg/kg; gavaj) uygulanan (Dumanlı, n=10)

Fareler 100 cm uzunluğunda 60 cm genişliğinde 80 cm yüksekliğinde karşılıklı 2 kenarın birinde duman giriş bölgesi diğerinde ise hava çıkış bölgesi olan fleksiglas odanın içine konuldu(Şekil 3). Duman giriş bölgesine yanma düzeneği monte edilip düzeneğe bağlı olan sigara yakılarak düzeneğin içerisindeki vakum pompası vasıtasıyla duman giriş bölgesinden hava çıkış bölgesine duman akımı oluşturularak farelerin dumanı solumaları sağlandı. Her sigaradan 10 dakika boyunca odanın içerisine duman sağlandı. Bu süre sonunda 10 dakika odanın dumansız kalması sağlandı. Bu döngü 20 adet sigaranın bitimine kadar uygulandı. Bu uygulamaya 8 hafta boyunca haftada 5 gün devam edildi. Dumansız kontrol gruplarına da aynı deneysel koşullar sağlandı. Fleksiglas odanın içine duman yerine hava aspirasyonu sağlandı. Yukarıda açıklanan protokolün sonunda fareler servikal dislokasyon ile öldürdü. Farelerin duman maruziyet derecelerini değerlendirmek için farelerin idrar örnekleri mesana içinden alındı ve ELISA testinde kotinin miktarları tayin edilmek üzere -20°C'de saklandı.

Farelerin toraksı açılarak torasik aort dokusu çıkarıldı. Çıkarılan doku Krebs solüsyonu bulunan petri içerisinde çevre dokulardan temizlendi. Bir farenin torasik aortundan yaklaşık 3 mm kalınlığında halkalar hazırlandı. Bir aorttan ortalama 4 preparat elde edildi. Bu preparatların bir kısmı kantitatif tayin deneylerinde kullanılmak

üzere -20°C'de dondurularak eppendorf içinde saklandı, diğer kısmı ise kalitatif tayin deneylerinde kullanılmak üzere gazlandırılmış Krebs solüsyonu bulunan beher içine alındı



Şekil 5. Duman uygulaması düzeneği

3.1. Kullanılan kimyasal ajanlar

Sodyum klorür, potasyum klorür, magnezyum sülfat, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum hidrojen karbonat, glukoz, magnezyum sülfat, kalsiyum klorür, glisin, Merck firmasından, L-fenilefrin hidroklorid, asetilkolin klorür, , fenilmetilsülfonilflorid (PMSF). Sığır serum albumini, alfa-linolenik asit Sigma firmasından temin edildi. Bioscience, bradford protein assay solüsyonu Biorad'dan, Ripa-buffer Santa Cruz'dan, kotinin ELISA kit Calbiotech'ten, cFLA₂, COX-2 ve eNOS ELISA kitleri Uscn Life Science Inc'den temin edildi.

3.2. Organ banyosu deneyleri

Kalitatif tayin deneylerinde kullanılmak üzere gazlandırılmış Krebs solüsyonu bulunan beher içine alınan izole torasik aort halkaları % 95 O₂, % 5 CO₂ karışımıyla sürekli olarak gazlandırılmış 37°C'de PH'sı 7.4 olan Krebs solüsyonu (mM olarak NaCl 118, KCl 4.8, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 24, glikoz 11, MgSO₄ 1.2, Na₂EDTA 0.01) içeren izole organ banyosuna konularak izometrik transdusere asıldı. Aort preparatlarına 0.5 g ön tansiyon uygulanıp ve bir saatlik inkübasyon süresi boyunca 20 dakikada bir Krebs solüsyonuyla yıkandı. Dokuların tonusundaki değişiklikler “force displacement transducer” (COMMAT, Ankara, Türkiye) aracılığı ile izometrik olarak ölçüldü ve Biopac kayıt sistemi (Biopac systems Inc., CA, USA) ile verilerin kaydı ve analizi yapıldı.

Deney gruplarından elde edilen torasik aorta halkaları ile dokuların endotel ve düz kas fonksiyonlarını test etmek amacıyla fonksiyonel organ banyosu deneyleri yapıldı. Endotel fonksiyonlarını test etmek için, dokular fenilefrinle (5x10⁻⁶M) kastırıldı ve kasılmalar maksimum düzeye erişince asetilkolin (5x10⁻⁶ M) uygulanarak gevşeme yanıtları elde edildi. Diğer deney grubunda, düz kas fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla KCl (40 mM) ile kastırıldı ve kasılma maksimum düzeye erişince papaverin (5x10⁻⁶ M) uygulanarak gevşeme yanıtı oluşturuldu.

3.3. ELISA deneyleri

ELISA testleri Rayto firmasından temin edilen ELISA mikropate okuyucu ve yıkayıcı ile yapılmıştır.

3.3.1. Homojenizasyon

Ependorf içinde -20°C dondurulmuş dokuların üzerine gram başına 3ml RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) buffer, 30µl PMSF (fenylmetanesulfonylfluoride), 30µl sodyum vanadat, 30µl proteaz inhibitörü eklendi ve ultrasonic parçalama cihazıyla buz üzerinde dokuların parçalanarak homojenatlar elde edildi. Homojenatlar 10.000 RPM'de 10 dakika santrifüj edildi. Alttaki çökeltiler (pelletler) atıldı. Üstte ayrılan kısımlar (süpernatantlar) ELISA testlerinde kullanılmak üzere alındı.

3.3.2. Protein miktar tayini

Homojenizasyon yapılarak elde edilen homojenatların total protein miktarının tayini için Bradford yöntemi kullanıldı.

Sığır serum albumini (1µg/ml) kullanılarak 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10 (µg/ml) konsantrasyonlarda standart hazırlandı. Her bir örnekten 10 µl alınarak distile su ile 100 µl'ye tamamlandı. Standart ve örneklerin üzerine 1ml bradford solüsyonu eklendi ve vorteksle karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 595 nanometre dalga boyunda absorbans miktarları manuel olarak ölçüldü. Prism programında çizilen standart eğriye göre homojenatların protein miktar tayini µg/µl cinsinden yapıldı.

3.3.3. ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Testi

3.3.3.1. ELİSA Siklooksijenaz 2 Enzim Miktar Tayini

Homojenatlardan 100'er µl eliza kuyucuklarına eklendi. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp yıkama sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edildi. Sonra 50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm'de

mikroplate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek COX-2 enziminin miktarları tayin edildi.

3.3.3.2. ELİSA Fosfolipaz A₂ enzim miktar tayini

Homojenatlardan 100'er µl eliza kuyucuklarına eklendi. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp yıkama sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edildi. Sonra 50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm'de mikroplate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek fosfolipaz A₂ enziminin miktarları tayin edildi.

3.3.3.3. ELİSA Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Enzim Miktar Tayini

Homojenatlardan 100'er µl eliza kuyucuklarına eklendi. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkanıp yıkama sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edildi. Sonra 50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm'de mikroplate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek endotelyal nitrikoksit sentaz enziminin miktarları tayin edildi.

3.3.3.4. ELİSA Kotinin Miktar Tayini

Örneklerden 10 µl kuyucuklara eklendi. Üzerine 100 µl enzim konjugatı eklenip 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda çalkalandı ve 2 saat 24 °C'de karanlıkta bekletilip kuyucuklar 6 kez 300 µl distile su ile yıkandı. Yıkanan kuyucuklara 100 µl substrat reaktifi eklenip 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonra durdurucu solüsyon eklenip 450 nm dalga boyunda eliza okuyucuda kuyucuklar okunarak kotinin miktarları tayin edildi.

3.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Dokuların gevşeme yanıtları kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi. standart hataları ile birlikte ($\pm$ SEM) gösterildi. Grafiklerin çizimi ve istatistiksel analiz için bilgisayar ortamında Graph-Pad Prism (CA, USA) programı kullanıldı. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* testi olarak Bonferoni kullanıldı. 0.05'den küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

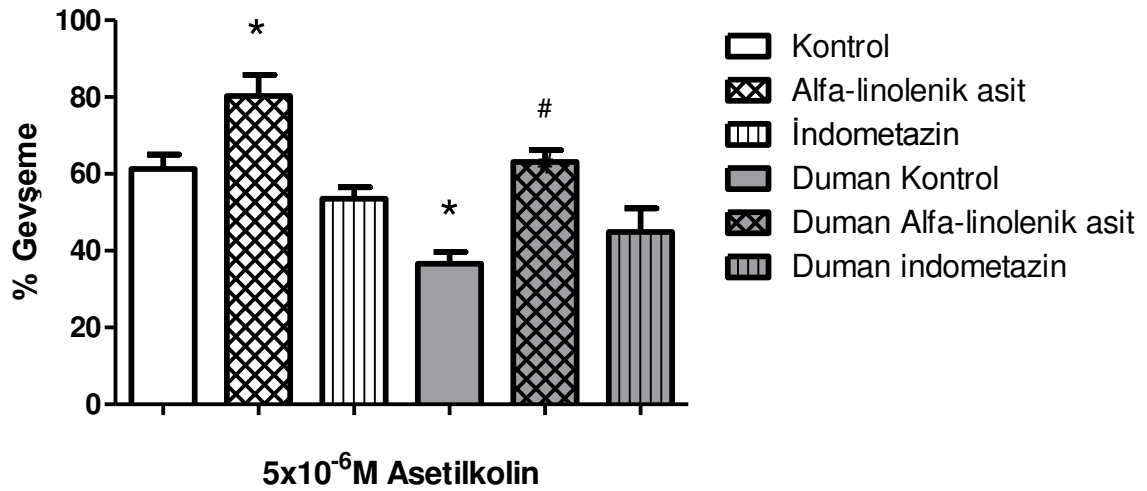
4.1. Duman uygulanan farelerin idrar kotinin seviyeleri

Farelerin idrar kotinin seviyeleri 113 ± 12 ng/ml (n=25) bulundu.

4.2. Organ banyosu deneyleri

4.2.1. Asetilkolin gevşeme yanıtları

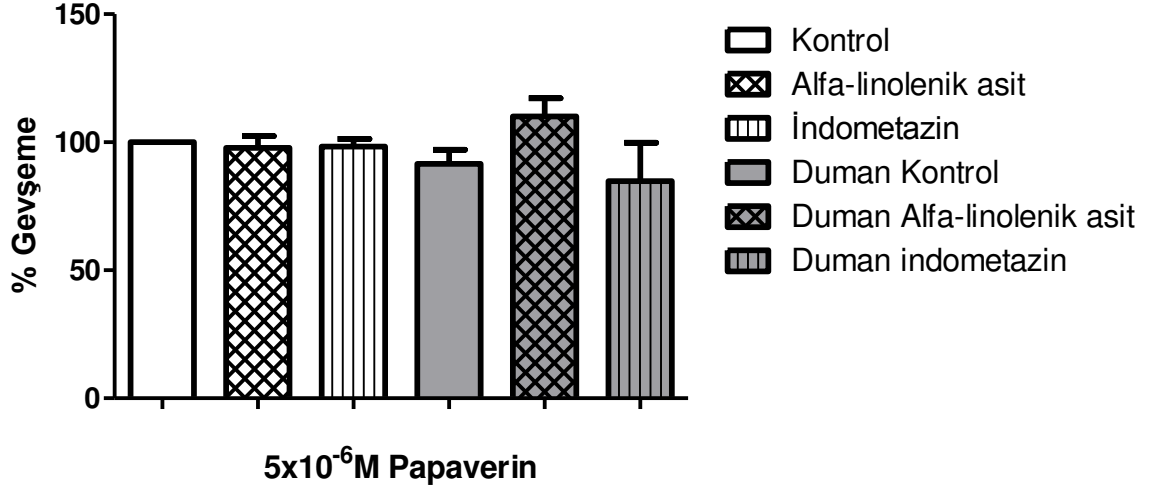
Alfa-linolenik asit uygulaması asetilkolin gevşemelerini kontrole göre anlamlı bir şekilde artırdı. Sadece duman uygulaması gevşeme yanıtlarını azaltırken duman ile birlikte Alfa-linolenik asit uygulaması bu azalmayı geri çevirdi(Şekil 6).



Şekil 6. Sigara dumanı maruziyetinin torasik aortta asetilkolin ile oluşturulan gevşeme yanıtlarına etkisi(n=6-9). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (* : Kontrole göre $P < 0.05$. # Duman kontrole göre $P < 0.05$).

4.2.2. Papaverin gevşeme yanıtları

Sigara dumanı, alfa-linolenik asit ve indometazin uygulaması papaverin ile oluşturulan gevşeme yanıtlarını anlamlı olarak değıştirmedir(Şekil 7).

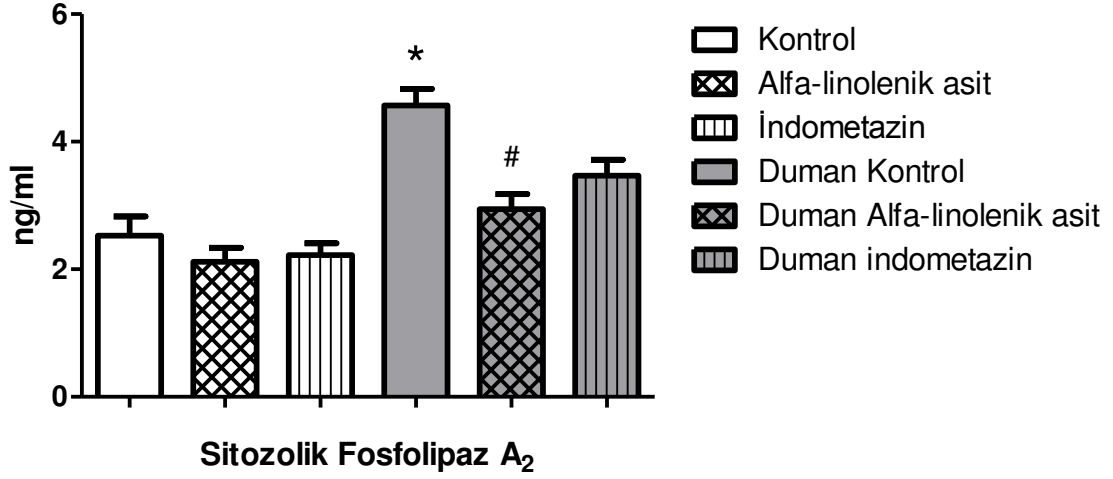


Şekil 7. Sigara dumanı maruziyetinin torasik aortta papaverin ile oluşturulan gevşeme yanıtlarına etkisi(n=6-9). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (* : Kontrole göre P<0.05).

4.3. ELISA deneyleri

4.3.1. Sitolik fosfolipaz A₂ enzim miktar tayini

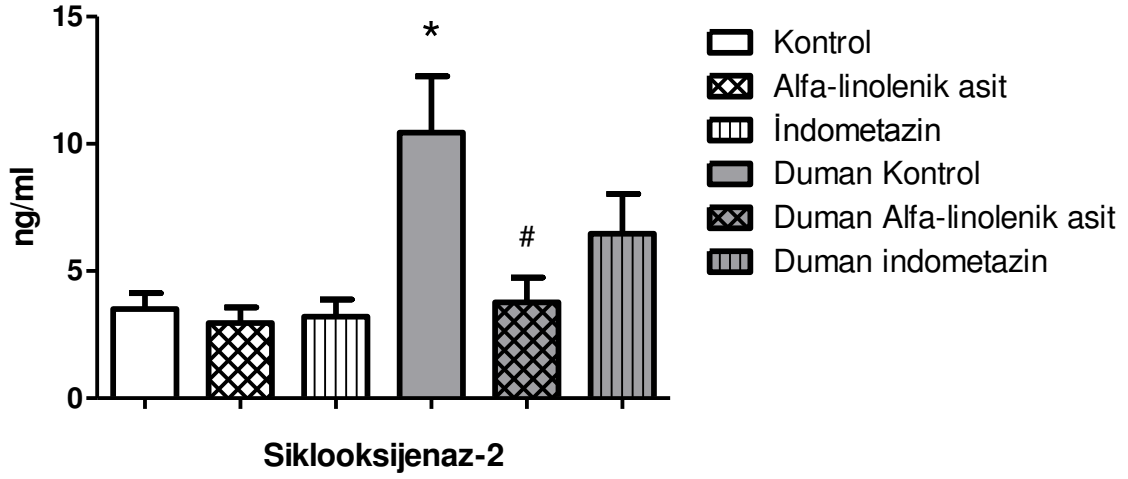
Sigara dumanı Fosfolipaz A₂ enziminin miktarında artışa neden oldu alfa-linolenik asit bu artışı anlamlı olarak azalttı (Şekil 8).



Şekil 8. Sigara dumanı maruziyetinin torasik aortta Fosfolipaz A₂ enzimine etkisi(n=6). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (* : Kontrole göre P<0.05. # Duman kontrole göre P<0.05).

4.3.2. Siklooksijenaz 2 Enzim Miktar Tayini

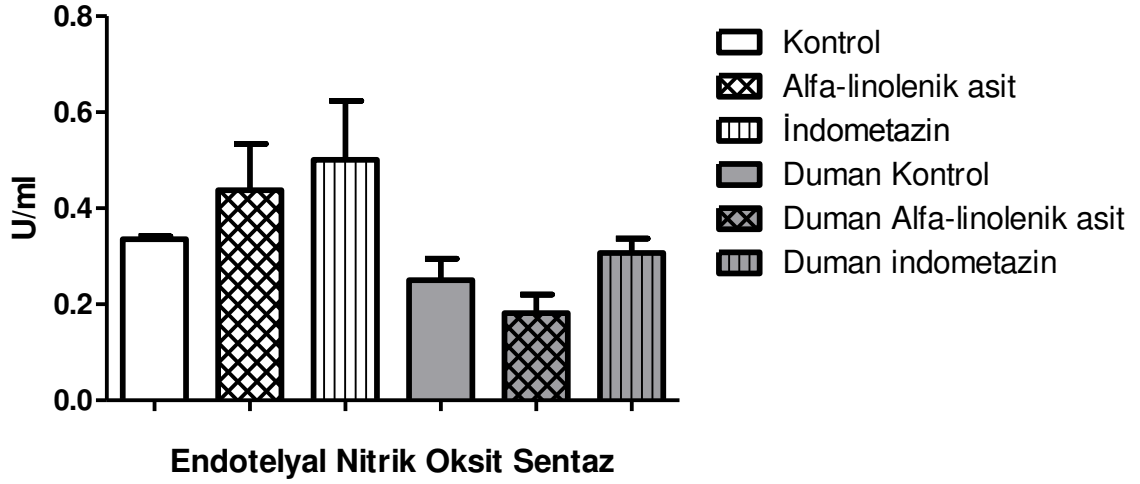
Sigara dumanı siklooksijenaz-2 enziminin miktarında artışa neden oldu. Alfa-linolenik asit bu artışı anlamlı olarak azalttı. (Şekil 9).



Şekil 9. Sigara dumanı maruziyetinin torasik aortta siklooksijenaz-2 enzimine etkisi(n=6). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (* : Kontrole göre $P<0.05$. # Duman kontrole göre $P<0.05$).

4.3.3. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Enzim Miktar Tayini

Sigara dumanı endotelyal nitrik oksit sentaz enziminin miktarında azalmaya neden oldu ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 10).



Şekil 10. Sigara dumanı maruziyetinin torasik aortta endotelyal nitrik oksit sentaz enzimine etkisi(n=6). İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni.

5. TARTIŞMA

Sigaranın temel bileşeni olan nikotin, sigaranın kütlesinin yaklaşık %1.5'ini oluşturur ve her bir sigara yaklaşık 10-14 mg nikotin içerir. Ancak içiciler bu miktarın yaklaşık 1 mg'ını absorbe edebilirler^{118,119}. Nikotinin absorbe edildikten sonra yarılanma ömrü kısadır ve hızlıca metabolize edilerek kotinine dönüşür. Kotininin yarılanma ömrü nikotinden daha uzundur. Bu sebeple çalışmamızda sigara maruziyet derecesini değerlendirmek için farelerin idrarında kotinin miktarını saptadık. Aktif içicilerin serum ve idrar kotinin konsantrasyonları sırası ile 500 ng/ml ve 1300 ng/ml'ye kadar çıktığı gösterilmiştir^{120,121}. Bizim çalışmamızda ferelerin idrar kotinin seviyeleri 113 ± 12 ng/ml bulunmuştur. Bu değer üzerine, farelerin idrarını son duman uygulanmasından 15 saat sonra almamızın bir etkisi olmuş olabilir. Çünkü kotininin yarılanma ömrü yaklaşık 1300 dakika kadardır.

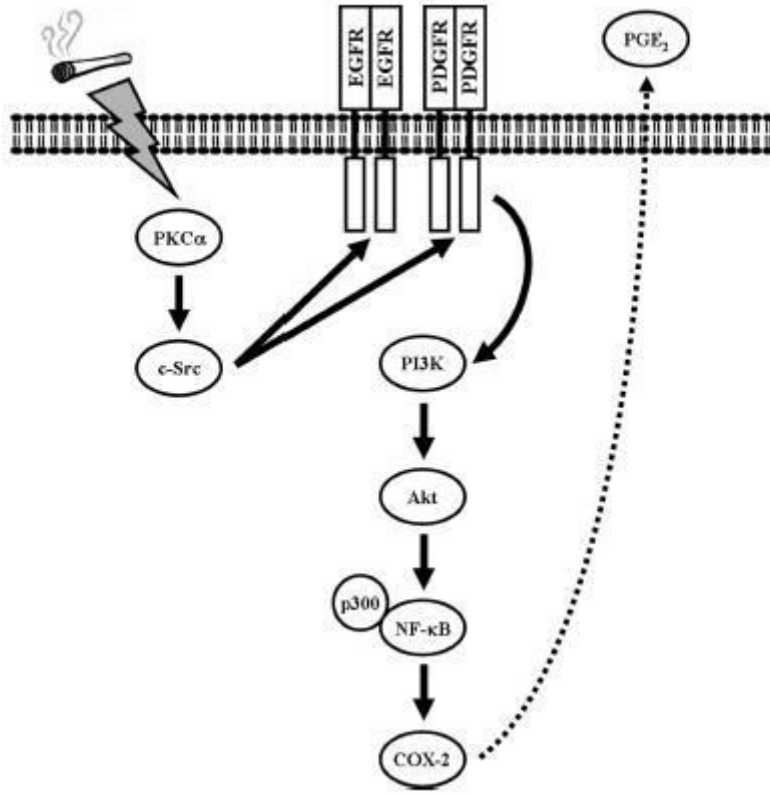
Kalitatif organ banyosu deneylerinde sigara dumanı, alfa-linolenik asit ve indometazin uygulaması fosfodiesteraz inhibitörü olan papaverin¹²² ile oluşturulan gevşeme yanıtlarını değiştirmedir. Bu durum çalışmamızda uyguladığımız sigara dumanının düz kas gevşemeleri üzerinde bir etki oluşturmadığını göstermektedir. Diğer deney grubunda alfa-linolenik asit uygulaması asetilkolin gevşemelerini artırmıştır. Sadece duman uygulaması gevşeme yanıtlarını azaltırken duman ile birlikte Alfa-linolenik asit uygulaması bu azalmayı geri çevirmiştir. Alfa-linolenik asit'in antiinflamatuvar özelliği de bilinmektedir²⁶. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak indometazin kullanılmıştır. İndometazin sigara dumanının neden olduğu asetilkolin gevşemelerindeki azalmayı anlamlı bir şekilde geri çevirememiştir. Bu durum Alfa linolenik asitin asetilkolin gevşemelerindeki artırıcı etkisinin antiinflamatuvar mekanizmalar üzerinden olmadığını göstermektedir. Ancak alfa-linolenik asit'in antioksidan özelliği de vardır²⁵. Sigara dumanı maruziyeti oksidatif stresi artırarak endotelyum bağımlı gevşeme yanıtlarını azalttığı gösterilmiştir^{9,123}. Bu nedenle Alfa-linolenik asit'in sigara dumanına bağlı asetilkolin gevşemelerindeki azalmayı geri çevirmesi antioksidan özelliğinden veya başka bir mekanizmadan kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca çalışmamız da NO üretiminden sorumlu eNOS enziminin kantitatif tayini yapılmıştır. Elde ettiğimiz bulgularda sigara dumanı endotelial nitrik

oksidant sentaz enziminin miktarında azalmaya neden olmuştur. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Buna ilaveten sadece alfa-linolenik asit uygulaması eNOS enziminin ekspresyonunu bir miktar arttırırken bu artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sigara dumanının, inflamasyon mekanizmalarında önemli rolleri olan siklooksijenaz-2 ve fosfolipaz A₂ enzimini arttırdığı diğer çalışmalarda gösterilmiştir^{124,125}. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde sigara dumanı siklooksijenaz-2 ve Fosfolipaz A₂ enzimlerinin miktarında artışa neden olurken antiinflamatuvar özelliği bilinen alfa-linolenik asit bu artışları anlamlı olarak azalttı.

Yapılan bir çalışmada sigara dumanının NADPH oksidaz enziminin aktivitesini indükleyerek hücre içi süperoksit radikallerinin üretimini arttırdığı ve bu artışın da sitozolik fosfolipaz A₂ enzim düzeyini yükselttiği gösterilmiştir. Bu artışın proinflamatuvar gen transkripsiyonunu aktifleyen MAPKs yoluyla, NF- κ B, ve AP-1 faktörlerinden kaynaklandığı gösterilmiştir¹²⁶.

Yapılan bir başka çalışmada da benzer şekilde sigara dumanının siklooksijenaz-2 enzimini arttırdığı ortaya konmuştur. Bu artışın PKC γ /c-Src/EGFR ve PDGFR/PI3K/Akt PDGFR/PI3K/Akt sinyalizasyon yollarının aktive edilmesiyle artan NF- κ B ve p300 inflamatuvar transkripsiyon faktörlerinden kaynaklandığı gösterilmiştir¹²⁴.



Şekil 11. Sigara dumanı ve COX-2

Çalışmamızda ise sigara dumanının neden olduğu FLA₂ ve COX-2 enzimlerindeki artışı alfa-linolenik asit geri çevirmiştir. Yapılan bir çalışmada alfa-linolenik asit COX 2 enziminin sentezinde görev alan mRNA sentezini azaltarak COX-2 enziminde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir¹²⁷. Buna ilaveten. Alfa-linolenik asit lipoprotein sakkarit (LPS)'in neden olduğu inflamasyonu da azaltığı ayrıca nükleer faktör kappa-B (NF-κB) translokasyonunu ve mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MAPK)'ın fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu inhibisyon iNOS, COX-2, TNF-alfa gibi inflamatuvar faktörlerinin ekspresyonlarını azaltır²⁶.

Bunun yanı sıra İn-vitro deneylerde nikotinin sıçan basiler arterinde kasılma oluşturduğu ve bu kasılmaların çoğunluğunun endotel kaynaklı olduğu bununla birlikte nikotin ile oluşturulan kasılmaların fosfolipaz C, fopsfolipaz A₂ ve siklooksijenaz 2 inhibitörleri ile inhibe edildiği gösterilmiştir¹⁹. Ayrıca nikotinin endotelyum bağımlı kasılmaya neden olduğu, oluşan kasılmaların siklooksijenaz inhibitörleriyle geri çevrildiği gösterilmiştir¹²⁸. Ayrıca vasküler düz kas hücrelerinin ve endotel hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir¹⁰⁻¹⁵. Nikotin inkübasyonun

noradrenalin ile kastırılmış koroner arterin asetilkoline verdiği gevşeme yanıtlarını azalttığı bildirilmiştir¹⁷. Yapılan diğer çalışmalar, çalışmamızda göstermiş olduğumuz sigara dumanının fosfolipaz A₂ ve siklooksijenaz-2 enzimlerinin ekspresyonları üzerine artırıcı etkisine, bir anlamda sigara dumanı vasıtasıyla kronik uyguladığımız nikotinin de katkısının olabileceğini telkin etmektedir.

Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz bulgular da benzer şekilde sigara dumanının inflamasyon mekanizmalarını aktive ettiğini, alfa linolenik asit'in ise bu mekanizmaları inhibe edici etkisinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca bazı çalışmalarda da antioksidanların fosfolipaz A₂ ve siklooksijenaz-2 enzimlerinin ekspresyonlarını azaltıcı etkisi bildirilmiştir¹²⁹.

İlaveten Alfa-linolenik asit'in anti inflamatuvar etkisini antioksidan özelliğinden kaynaklanabileceğini çeşitli literatürler de desteklemektedir¹³⁰.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sigara dumanı partikül ve gaz fazında 4000'den fazla kimyasal madde içerdiği için her bir maddenin olumsuz etkilerinin patofizyolojisini ortaya koymak zordur. Son yapılan çalışmalarda sigara dumanının bu olumsuz etkileri oksidatif stres ve inflamasyon artırıcı mekanizmalar üzerinden yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca bu mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte alfa-linolenik asit'in kolesterol düşürücü etkilerinin yanı sıra kardiovasküler sistemde yararlı olacağı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda sigara dumanına bağlı damar hasarının moleküler mekanizmasını ortaya koymayı ve bu hasarı alfa-linolenik asit ile geri çevirmeyi amaçladık.

Çalışmamızda Alfa-linolenik asit uygulaması asetilkolin gevşemelerini kontrole göre anlamlı bir şekilde artırmıştır. Tek başına duman uygulaması gevşeme yanıtlarını azaltırken duman ile birlikte alfa-linolenik asit uygulaması bu azalmayı geri çevirmiştir. Sigara dumanı, alfa-linolenik asit ve indometazin uygulaması papaverin ile oluşturulan gevşeme yanıtlarını anlamlı olarak değiştirmemiştir. Sigara dumanı siklooksijenaz-2 enziminin miktarında artışa neden olurken, alfa-linolenik asit bu artışı anlamlı olarak azaltmıştır. Benzer şekilde sigara dumanı Fosfolipaz A₂ enziminin miktarında artışa neden olurken, alfa-linolenik asit bu artışı da anlamlı olarak azaltmıştır. Ayrıca sigara dumanı endotelyal nitrik oksit sentaz enziminin miktarında azalmaya neden olmuş ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmamız sigara dumanının endotel hasarına ve inflamasyon mekanizmalarını arttırıcı etkiye sahip olduğunu, alfa-linolenik asit sigaranın neden olduğu inflamasyon mekanizmalarını inhibe ettiğini göstermiştir. Sonuç olarak alfa-linolenik asit ile zengin diyetin, sigaranın neden olduğu koroner ve periferik damar hastalıklarına eşlik eden aterosklerozun ve endotelyal disfonksiyonun önlenmesine yardımcı olacağını göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Barua RS, Ambrose JA, Reynolds LJE, DeVoe MC, Zervas JG, Saha DC.** Heavy and light cigarette smokers have similar dysfunction of endothelial vasoregulatory activity. *Journal of the American College of Cardiology*. **2002**;1758–1763
2. **Tell GS, Polak JF, Ward BJ, Kittner SJ, Savage PJ, Robbins J.** Relation of smoking with carotid artery wall thickness and stenosis in older adults. The Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study (CHS) Collaborative Research Group. *Circulation*. **1994**;90:2905–2908.
3. **Jonas MA, Oates JA, Ockene JK, Hennekens CH.** Statement on smoking and cardiovascular disease for health care professionals. *Circulation*. **1992**;86:1664–1669.
4. **Smith CJ, Fischer TH.** Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. **2001**;158:257–267.
5. **Tsuchiya M., Asada A., Kasahara E., Sato EF, Shindo M., Inoue M.** Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation* **2002**; 105: 1155-1157
6. **Zhang WZ, Venardos K, Chin-Dusting J, Kaye DM.** Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension*. **2006**;48(2):278-285.
7. **Guo X, Oldham MJ, Kleinman MT, Phalen RF, Kassab GS.** Effect of cigarette smoking on nitric oxide, structural, and mechanical properties of mouse arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2006** Nov;291(5):H2354-H2361.
8. **Li T, Molteni A, Latkovich P, Castellani W, Baybutt RC.** Vitamin A depletion induced by cigarette smoke is associated with the development of emphysema in rats. *J Nutr*. **2003**;133(8):2629-2634.
9. **Tanriverdi H, Evrengul H, Kuru O, Tanriverdi S, Selecki D, Enli Y, Kaftan HA, Kilic M.** Cigarette smoking induced oxidative stress may impair endothelial function and coronary blood flow in angiographically normal coronary arteries. *Circ J*. **2006**;70(5):593-599.
10. **Zhou Y, Wang ZX, Tang MP, Yao CJ, Xu WJ, Wang LY, Qiao ZD.** Nicotine induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) expression in human umbilical vein endothelial cells. *doi:10.1016/j.intimp.2009.12.019*.
11. **Carty CS, Soloway PD, Kayastha S, Bauer J, Marsan B, Ricotta JJ, Dryjski M.** Nicotine and cotinine stimulate secretion of basic fibroblast growth factor and affect expression of matrix metalloproteinases in cultured human smooth muscle cells. *J Vasc Surg*. **1996**;24:927–934.
12. **Cucina A, Sapienza P, Corvino V, Borrelli V, Mariani V, Randone B, Santoro D'Angelo L, Cavallaro A.** Nicotine-induced smooth muscle cell proliferation is mediated through bFGF and TGF-beta 1. *Surgery*. **2000**; 127:316–322.
13. **Lee WO, Wright SM.** Production of endothelin by cultured human endothelial cells following exposure to nicotine or caffeine. *Metabolism*. **1999**;48:845–848.

14. **Villablanca AC.** Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J Appl Physiol.* **1998**;84:2089–2098.
15. **Boutherin-Falson O, Blaes N.** Nicotine increases basal prostacyclin production and DNA synthesis of human endothelial cells in primary cultures. *Nouv Rev Fr Hematol.* **1990**;32:253–258.
16. **Zhang S, Day I, Ye S.** Nicotine induced changes in gene expression by human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis.* **2001**;154: 277–283.
17. **Conklin BS, Surowiec SM, Ren Z, Li JS, Zhong DS, Lumsden AB, Chen C.** Effects of nicotine and cotinine on porcine arterial endothelial cell function. *J Surg Res.* **2001**;95(1):23-31.
18. **Lindell G, Bukhave K, Lilja I, Madsen JR, Graffner H.** Acute effects of high-dose intragastric nicotine on mucosal defense mechanisms: an analysis of nicotine, prostaglandin E2, phospholipase A2, and phospholipids. *Dig Dis Sci.* **1997**;42(3):640-644.
19. **Ji X, Nishihashi T, Trandafir CC, Wang A, Shimizu Y, Kurahashi K.** Pharmacological nature of nicotine-induced contraction in the rat basilar artery: involvement of arachidonic acid metabolites. *Eur J Pharmacol.* **2007**;577(1-3):109-114.
20. **Bucher HC, Hengstler P, Schindler C, et al.** N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med* **2002**;112:298–304.
21. **De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, et al.** Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon diet heart study. *Circulation* **1999**;99:779–785.
22. **Gerster H.** Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vitam Nutr Res* **1998**;68:159–173.
23. **Ogawa A, Suzuki Y, Aoyama T, Takeuchi H.** Dietary alpha-linolenic acid inhibits angiotensin-converting enzyme activity and mRNA expression levels in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Oleo Sci.* **2009**;58(7):355-360.
24. **Takeuchi H, Sakurai C, Noda R, Sekine S, Murano Y, Wanaka K, Kasai M, Watanabe S, Aoyama T, Kondo K.** Antihypertensive effect and safety of dietary alpha-linolenic acid in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *J Oleo Sci.* **2007**;56(7):347-360.
25. **Alessandri C, Pignatelli P, Loffredo L, Lenti L, Del Ben M, Carnevale R, Perrone A, Ferro D, Angelico F, Violi F.** Alpha-linolenic acid-rich wheat germ oil decreases oxidative stress and CD40 ligand in patients with mild hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2006**;26(11):2577-2578.
26. **Ren J, Chung SH.** Anti-inflammatory effect of alpha-linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression via NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Agric Food Chem.* **2007**;55(13):5073-5080.
27. **Park EM, Park YM, Gwak YS.** Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Free Radic Biol Med* **1998**; 25:79-86.
28. **Doll R.** Cancers weakly related to smoking. *Br Med Bull* **1996** 52: 35-49.

29. **Hoffmann D, Hoffman I.** The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health* **1997**; 50: 307-364.
30. **Yamamoto Y, Isoyama E, Sofikitis N, Miyagawa I.** Effects of smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. *Urol Res* **1998**; 26: 45-48.
31. **Al-Bader A, Omu AE, Dashti H.** Chronic cadmium toxicity to sperm of heavy cigarette smokers: immunomodulation. *Arch Androl* **1999**; 43: 135-140.
32. **Shakumary AL, Vijagummal PL.** Effect of nicotine on lipoprotein metabolism in rats. *Lipids* **1997**; 32: 311-315.
33. **Habeebu SS, Liu J, Klaassen CD.** Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol.* **1998**; 149: 203-9.
34. **Kükner A, Çolakoğlu N, Ozan E, Ozan S.** Sigaranın sıçan karaciğerine etkisi. *Fırat Tıp Dergisi* **1999**; 8: 547-52.
35. **Zimmerman M, McGeachie J.** The effect of nicotine on aortic endothelium: a quantitative ultrastructural study. *Atherosclerosis* **1987**; 63: 33-41.
36. **Pittilo RM, Bull HA, Gualati S, et al.** Nicotine and cigarette smoking: effect on the ultrastructure of aortic endothelium. *Int J Exp Path* **1990**; 74: 573-586.
37. **Roberge S, Bazin M, Bauter M.** Endothelial cell coat modifications in rat thoracic aorta. Effect of ovariectomy and cigarette smoke. *Experientia* **1983**; 39: 72-74.
38. **Cotran RS, Kumar V, Robbins SL.** Robbins Pathologic Basis of Disease. *Philadelphia, WB Saunders Comp*, **1994**: 473-476.
39. **Pittilo RM.** Cigarette smoking and endothelial injury: a review. *Adv Exp Med Biol* **1991**; 273: 61-78.
40. **Halliwell B.** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* **1989**; 70: 737-757.
41. **Church DF, Pryor WA.** Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* **1985**; 64: 111-126.
42. **Mussalo-Rauhamaa H, Salmela SS, Leppanen A, Pyysalo H.** Cigarette as a source of some trace and heavy metals and pesticides in man. *Arch Environ Health* **1986**; 41: 49-55.
43. **Orrenius S, McConkey DJ, Nicotera P.** Role of calcium in toxic and programmed cell death. *Biol React Intermed* **1991**; 283: 419-425.
44. **Ghosh A, Choudhury A, Das A, Chatterjee NS, Das T, Chowdhury R, Panda K, Banerjee R, Chatterjee IB.** Cigarette smoke induces p-benzoquinone-albumin adduct in blood serum Implications on structure and ligand binding properties. *Toxicology* 10.1016/j.tox.2011.11.014
45. **Henderson B, Csordas A, Backovic A, Kind M, David Bernhard, Georg Wick** Cigarette smoke is an endothelial stressor and leads to cell cycle arrest. *Atherosclerosis* **2008**; 201:298–305

46. **Lu Q, Sakhatsky P, Grinnell K, Newton J, Ortiz M, Wang Y, Sanchez-Esteban J, Harrington EO, Rounds S.** Cigarette smoke causes lung vascular barrier dysfunction via oxidative stress-mediated inhibition of RhoA and focal adhesion kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011 Dec;301(6):L847-57. Epub 2011 Oct 7.
47. **Michaud SE, Dussault S, Groleau J, Haddad P, Rivard A** Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol.* **2006**; Aug;41(2):275-84
48. **Joanne L. Wright, Hsin Tai, and Andrew Churg.** Cigarette Smoke Induces Persisting Increases of Vasoactive Mediators in Pulmonary Arteries. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* Vol. 31, pp. 501–509, 2004
49. **Besler HT, Coşkun T;** Uzun Zincirli Yağ Asitlerinin Kimyasal Özellikleri ve Sağlıkla Olan Etkileşimi. *Katkı Pediatri Dergisi*, **2006**; Vol:28, Sayı:1; 5-20.
50. **Watkins, B. A.** Importance of essential fatty acids and their derivatives in poultry. *J. Nutr.* **1991**,121:1475-1485.
51. **Grashorn, M.A.** Ernährungsphysiologische bedeutung der omega-3- fettsäuren und möglichkeiten der anreicherung in eiern. *Arch. Geflügelk.*, **1995.** 60: 49-58.
52. **Murray, R.K., Mayez, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W.** Harper'in Biyokimyası (Çevirenler: Mentis, G., Ersöz, B.), Baris kitabevi, _stanbul.
53. **Lewis N.M., Seburg, S., Flanagan, N.L.** 2000. Enriched eggs as a sourced of n-3 polyunsaturated fatty acids for humans. *Poult. Sci.* **1993.**, 79: 971-974.
54. **Norum, K.R., Drevon,C.A..** Dietary omega-3 fatty acids and cardiovascular diseases. *Arteriosclerosis*, **1986**, 6: 352-355.
55. **Bayizit, A. A.** Doymamıs yağ asitlerinin beslenme ve sağlık açısından önemi. Gıda ve Yem Bilimi -Teknolojisi Dergisi, **2003**, 3: 28-31.
56. **Farrell, D.J.** The hearty egg. *Poultry Digest*, **1992.** 7: 20-22.
57. **Farrell, D.J.** Une's designer egg. *Poult. Int.* **1993**, 32: 62-66.
58. **Leaf, A.,Weber, P.C.** Cardiovascular effects of ω-3 fatty acids. *The New Engl. J.Of Med.* **1988**, 318:549-557.
59. **Dyerberg, J.** Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutr. Rev.* **1986**, 44: 125-134.
60. **Kromhout, D., Bosschieter, M.D., Coulander, L.** The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *The New Engl. J. of Med.* **1985**, 312: 1205-1209.
61. **Taketo MM, Sonoshita M.** Phospholipase A₂ and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, **2002**; 55972:1-5.
62. **Kudo I, Murakami M.** Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Medial*, **2002**; 68(69):3-58.

63. **Murakami M, Kudo I.** Recent advances in molecular biology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res*, **2004**; 43:3-35.
64. **Underwood KW, Song C, Kriz RW, Chang XJ, Knopf JL, Lin LL.** A novel calcium independent phospholipase A₂, cPLA₂-y, that is prenylated and contains homology to cPLA₂. *The Journal of Biological Chemistry*, **1998**; 273(34):21926-21932.
65. **Song C, Chang XJ, Bean KM, Proia MS, Knopf JL, Kriz RW.** Molecular characterization of cytosolic phospholipase A₂-p. *J Biol Chem*, **1999**; 274(24):17063-17067.
66. **Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL.** A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, **1991**; 65(6):1043-1051.
67. **Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA.** Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Letters*, **2002**; 531:2-6.
68. **Capper EA, Marshall LA.** Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *Prog Lipid Res*, **2001**; 40(3):167-197.
69. **Gijon MA, Leslie CC.** Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. *J Leukoc Biol*, **1999**; 65(3):330-6.
70. **Fu, J.Y., Masferrer, J.L., Seibert, K., Raz, A., Needleman, P.** The Induction and uppression of Prostaglandin H-2 Synthase (Cyclooxygenase) in Human Monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **1990**; 265 (28), 16737.
71. **Marnett, L.J., Rowlinson, S.W., Goodwin, D.C., Kalgutkar, A.S., Lanzo, C.A.** Arachidonic Acid Oxygenation by COX-1 and COX-2: Mechanisms of Catalysis and Inhibition, *Journal of Biological Chemistry*, **1999**; 274 (33), 22903.
72. **Morita, I., Schindler, M., Regier, M.K., Otto, J.C., Hori, T., DeWitt, D.L., Smith, W.L.** Different Intracellular Locations for Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1 and -2. *Journal of Biological Chemistry*, **1995**; 270 (18), 10902.
73. **Picot, D., Loll P.J., Garavito, R.M.** The X-ray Crystal Structure of the Membrane Protein Prostaglandin H2 Synthase-1. *Nature*, **1994**; 367, 243.
74. **Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., Browner, M.F.** Flexibility of the NSAID Binding Site in the Structure of Human Cyclooxygenase-2. *Nature Structural & Molecular Biology*, **1996**; 3, 927.
75. **Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.G., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak J.Y.** Structural Basis for Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Antiinflammatory Agents. *Nature*, **1996**; 384 (6610), 644.
76. **Grosser, T., Fries, S., FitzGerald, G.A.** Biological Basis for the Cardiovascular Consequences of COX-2 Inhibition: Therapeutic Challengesand Opportunities, *The Journal of Clinical Investigation*, **2006**; 116 (1), 4.
77. **Smith, W.L., Garavito, R.M., DeWitt, D.L.** Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases) -1 and -2. *Journal of Biological Chemistry*, **1996**; 271 (52), 33157.

78. **Hoffmann, C.** COX-2 in Brain and Spinal Cord-Implications for Therapeutic Use, *current. Medicinal Chemistry*, **2000**;7 (11), 1113.
79. **Gambaro, G.** Strategies to Safely Interfere with Prostanoid Activity while Avoiding Adverse Renal Effects: Could COX-2 and COX-LOX Dual Inhibition be the Answer? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2002;17 (7), 1159.
80. **Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byns RE, Chaudhuri G.** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1987**; 84: 9265-9.
81. **Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S.** Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **1988**; 333: 664-6.
82. **Nussler AK, Billiar TR.** Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol (USA)* **1993**;54(2):171-8.
83. **Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH.** Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120: 227-37.
84. **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A.** Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Reviews* 1991; 43(9): 109-37.
85. **Star RA.** Nitric oxide. *Am J Med Sci (USA)*. **1993**;306(5):348- 58.
86. **Tayeh MA, Marletta MA.** Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate: Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem*. **1989**; 264:19654-8.
87. **Nathan C, Xie QW.** Nitric oxide synthases. Roles, tolls and controls. *Cell* **1994**; 78: 915-918
88. **Snyder SH.** Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters. *Science* **1992**;257: 494-6.
89. **Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH.** A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* **1992**;32:297-311.
90. **Tottrup A, Glavind EB, Svane D.** Involvement of the L-arginine-nitric oxide pathway in internal anal sphincter relaxation. *Gastroenterology* **1992**;102:409-15.
91. **Loscalzo J, Welch G.** Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis (U S A)*. **1995**;38(2):87-104.
92. **Varela AF, Runge A, Ignarro LJ, Chaudhuri G.** Nitric oxide and prostacyclin inhibit fetal platelet aggregation: a response similar to that observed in adults. *Am J Obstet Gynecol* **1992**;167:1599-604.
93. **De Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ.** Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* **1992**;85:2284-90.
94. **Radomski MW, Palmer RMS, Moncada S.** Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* **1987**; 2: 1057-8.
95. **Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.** Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* **1990**;101:325-8.
96. **Kubes P, Suzuki M, Granger DM.** Nitric oxide: An endogenous modulator of leucocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**; 88: 4651-5.
97. **Luscher TF, Diederich D, Siebenmann R, et al.** Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Eng J Med* **1988**; 319: 462-7

98. **Cox DA, Vita JA, Treasure CB, et al.** Atherosclerosis impairs flow mediated dilatoin of coronary arteries in human. *Circulation* **1989**; 80: 458-65.
99. **Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE.** Abnormal endothelium- dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension . *N Eng J Med* **1990**;323: 22-7.
100. **Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA.** Role of endothelium derived nitric oxide in the abnormal endothelium dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1993;87:1468-74.
101. **Balis C, Mitruka B, Deng A.** Chronic blockade of nitrik oxide synthesis in the rat produces systemic hypertansion and glomerular damage. *J Clin Invest* **1992**; 90: 278-81.
102. **Yukimura T, Yamashita Y, Miura K, Okumura M, Yamanaka S, Yamamota K.** Renal effects of the nitric oxide synthase inhibitor; L-NG- niyroarginine, in dogs. *Am J Hypertens* **1992**; 5: 484-7.
103. **Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H.** Correction of endothelial dysfintion in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L- arginine. *Lancet* **1991**; 338: 1546-50.
104. **Creager HA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP.** L-arginine improves endothelium- dependent vasodilation in hypercholesterolaemic humans. *J Clin Invest* **1992**; 90: 1248- 53.
105. **Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE.** Abnormal endothelium- dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension . *N Eng J Med* **1990**;323: 22-7.
106. **Elabbady AA, Gagnon C, Hassouna MM, Begin LR, Elhilaki MM.** Diabetes mellitus increase nitric oxide synthase inpenises but not in majör pelvic ganglia of rats. *B J Urol* **1995**; 76: 196-202.
107. **Vallence P, Leone A, Calver A, Colier J, Moncada S.** Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* **1992**; 339: 572-5.
108. **Vallence P, Leone A, Calver A, Colier J, Moncada S.** Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxidesynthesis in chronic renal failure. *Lancet* **1992**; 339: 572-5.
109. **Moncada S.** The L-arginine-nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand.* **1992**; 145: 201-227
110. **Moncada S, Higgs A.** The L-arginine-nitric oxide path way. *N. Eng J. Med.* **1993**; 329:2002-2012
111. **Marsden PA, Heng HH, Scherer SW.** Structure and chromosomal localization of human constitutive endothelial nitric oxide synthases gene. *J BiolChem.* **1993**; 15:268 (23): 17478-17488
112. **Bivalacqua TJ, Champion HC, Hellstrom WJG.** Implications of nitric oxide synthases isoforms in the pathophysiology of Peyronie's disease. *Int J Imp Res.* **2002**; 14: 345-352
113. **Albecht E, Stagemen C, Heeringa P, Henning RH, Van Goor H.** Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol.* **2003**; 199: 8-17
114. **Hoffman A, Gloe T, Pohl U.** Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *J. Cell Physiol.* **2001**; 188: 33-44
115. **Ruehlman DO, Mann GE.** Rapid non-genomic vasodilatator actions of estrogens and sex steroids. *Curr Med Chem.* **2000**; 7:533-541
116. **Ramasamy S, Parthasarathy S, Harrison DG.** Regulation of endothelialnitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid. *J Lipid Res.* **1998**; 39:268-276

117. **Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ.** Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension* **1998**; 32: 351-355
118. **Kozlowski LT, Mehta NY, Sweeney CT, Schwartz SS, Vogler GP, Jarvis MJ, et al.** Filter ventilation and nicotine content of tobacco in cigarettes from Canada, the United Kingdom, and the United States. *Tob Control* **1998**;7:369-375.
119. **Benowitz NL, Jacob P.** Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin Pharmacol Ther* **1994**;56:483-493
120. **Benowitz NL.** Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* **1996**;18:188-204.
121. **Benowitz NL, Perez-Stable EJ, Fong I, Modin G, Herrera B, Jacob P III.** Ethnic differences in N-glucuronidation of nicotine and cotinine. *J Pharmacol Exp Ther* **1999**;291(3):1196-1203.
122. **Li QY, Xu MK, Liu G, Christoffersen CT, Wang MW.** Discovery of novel PDE10 inhibitors by a robust homogeneous screening assay. *Acta Pharmacol Sin.* **2013** Apr 22. doi: 10.1038/aps.2013.25.
123. **Freischlag JA, Johnson D, Farooq MM, Doty J, Cambria RA, Seabrook GR, Towne JB.** Cigarette smoke impairs endothelium dependent relaxation in rabbit superficial femoral veins. *J Surg Res.* **1999** Jan;81(1):77-80.
124. **Cheng SE, Luo SF, Jou MJ, Lin CC, Kou YR, Lee IT, Hsieh HL, Yang CM.** Cigarette smoke extract induces cytosolic phospholipase A₂ expression via NADPH oxidase, MAPKs, AP-1, and NF-kappaB in human tracheal smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* **2009** Apr 1;46(7):948-60.
125. **Yang CM, Lee IT, Lin CC, Yang YL, Luo SF, Kou YR, Hsiao LD.** Cigarette smoke extract induces COX-2 expression via aPKCalpha/c-Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt/NF-kappaB pathway and p300 in tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2009** Nov;297(5):L892-902.
126. **Tithof PK, Richards SM, Elgayyar MA, Menn FM, Vulava VM, McKay L, Sanseverino J, Saylor G, Tucker DE, Leslie CC, Lu KP, Ramos KS.** Activation of group IVC phospholipase A(2) by polycyclic aromatic hydrocarbons induces apoptosis of human coronary artery endothelial cells. *Arch Toxicol.* **2011** Jun;85(6):623-34.
127. **Vecchini A, Ceccarelli V, Susta F, Caligiana P, Orvietani P, Binaglia L, Nocentini G, Riccardi C, Calviello G, Palozza P, Maggiano N, Di Nardo P.** Dietary alpha-linolenic acid reduces COX-2 expression and induces apoptosis of hepatoma cells. *Lipid Res.* **2004** Feb;45(2):308-16.
128. **Shirahase H, Usui H, Kurahashi K, Fujiwara M, Fukui K.** Endothelium-dependent contraction induced by nicotine in isolated canine basilar artery--possible involvement of a thromboxane A₂ (TXA₂) like substance. *Life Sci.* **1988**;42(4):437-45

129. **O'Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G.** Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res.* **2004** Jul 13;551(1-2):245-54.
130. **Fuhrmann H, Sallmann HP.** Alpha-tocopherol and phospholipase A_2 in liver and brain of chicks posthatching: the influence of dietary fat and vitamin E. *Ann Nutr Metab.* **1995**;39(5):302-9.

ÖZGEÇMİŞ

Halil Mahir Kaplan, 1983 yılında Adana’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana’da tamamladı. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2004 yılının Eylül ayında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı’nda ‘Yüksek Lisans’ eğitimine başladı. 2007 Haziran ayında Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. 2007 yılının Eylül ayında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı’nda Doktora eğitimine başladı.