

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

**UVABAİN İLE HİPERTANSİF YAPILMIŞ SIÇANLARIN
DAMARLARINDA
RHO KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Ayşegül DEMİRTAŞ

Tez danışmanı
Doç. Dr. Nilüfer N. TURAN

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından
02/2007-12 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Ekim 2008

Tez dönemim boyunca benden desteğini esirgemeyen, tecrübeleri ile her türlü yardımda bulunan tez danışmanım **Doç. Dr. Nilüfer N. TURAN** sonsuz teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca tecrübeleri ile yardımda bulunan **Doç. Dr. Mustafa ARK'a** sonsuz teşekkür ederim.

Öğrencilik hayatım ve tez dönemim boyunca benden maddi manevi desteğini esirgemeyen, bana olan güvenlerini her zaman hissettiren **annem Necla ve babam Sabahattin DEMİRTAŞ'a** sonsuz teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca bana, her türlü yardımda bulunan ve destekleyen arkadaşlarım **Ecz. Gürkan Şahan'a ve Ecz. Aysun ÖZDEMİR'e** sonsuz teşekkür ederim.

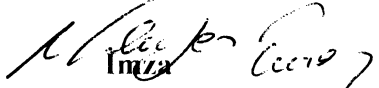
**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Farmakoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 21/10/2008



**İmza
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı
Prof. Dr. Nurettin ABACIOĞLU**



**Doç. Dr. Nilüfer TURAN
Gazi Üniversitesi**



**Doç. Dr. Özge UZUN
Düzce Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller	iv
Tablolar	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kan Basıncının Regülasyonu	3
2.2. Hipertansiyon Patogenezi	5
2.3. Kardiyak Glikozitler ve Endojen Uvabain	9
2.3.1. Na ⁺ /K ⁺ - ATP-az Enzimi ve Uvabain	14
2.4. G Proteinleri ve Rho/Rho Kinaz Yolağı	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Gereçler	23
3.1.1. Kullanılan Deneysel Hayvanları	23
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.1.3. Kullanılan Aletler	23
3.2.Yöntem	24
3.2.1. In Vivo Kan Basıncı Ölçümü	24
3.2.2 İzole Organ Banyosu Deneyleri	24
3.2.3 İstatistiksel Analiz	25
4. BULGULAR	26
4.1. Uvabain İle İndüklenen Hipertansiyon	26
4.2. KCl ile Prekontrakte Edilen Damarlardaki Y27632 Gevşeme Yanıtları	27
4.3. Fenilefrin ile Prekontrakte Edilen Damarlardaki Y27632 Gevşeme Yanıtları	30

4. TARTIŞMA	33
5. SONUÇ	37
6. ÖZET	38
7. SUMMARY	39
8. KAYNAKLAR	40
9. ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİLLER

Şekil 1 : Agonist ile indüklenmiş düz kas kasılmalarında Ca ⁺² duyarlılığı	19
Şekil 2 : Düz kaslarda kontraksiyonun regülasyonu	20
Şekil 3: 6 hafta süresince Kontrol (serum fizyolojik) ve Uvabain (28 µg/kg) uygulanan sıçanlardaki kuyruktan kan basınç yöntemi ile elde edilen haftalık ortalama sistolik kan basıncı grafiği	27
Şekil 4A: Y27632 (10 ⁻⁶ M) öncesi ve sonrası KCl (10-90 mM) doz-cevap eğrileri (n.4-6)	29
Şekil 4B: Y27632 (10 ⁻⁶ M) öncesi ve sonrası FE (10 ⁻⁹ -10 ⁻⁴ M) doz-cevap eğrileri (n:5)	30
Şekil 5A: KCl (60 mM) ile prekontrakte edilen damarlardaki Y27632'nin (10 ⁻⁸ -3x10 ⁻⁴ M) doz-cevap eğrisi (n:4-6)	32
Şekil 5B: FE (10 ⁻⁵ M) ile prekontrakte edilen damarlardaki Y27632'nin (10 ⁻⁸ -3x10 ⁻⁴ M) doz-cevap eğrisi (n:5)	33

TABLULAR

Tablo 1: KCl'nin Y27632 öncesi ve sonrası kasılma cevabı	29
Tablo 2: Fenilefrin'nin Y27632 öncesi ve sonrası kasılma cevabı	30
Tablo 3: KCl ile prekontrakte edilmesi damarlardaki Y27632 gevşeme cevabı	32
Tablo 4: Fenilefrin ile prekontrakte edilen damarlardaki Y27632 gevşeme cevabı	33

1. GİRİŞ

Çevresel ve genetik faktörler esansiyel hipertansiyonun gelişimine, kardiyak ve renal komplikasyonlarda risk artışına neden olmaktadır. Endojen uvabain (EU) çeşitli memelilerin plazmasında bulunur^{1,2} EU'in yüksek seviyelerinin insanda hipertansiyon, kardiyak hipertrofi ve hasarı stimule ettiği gösterilmiştir^{3,4,5,6}. Yüksek EU seviyelerinin kardiovasküler sistem üzerindeki patogenetik mekanizmalarının renal tübüler sodyum reabsorpsiyonu ve büyüme faktörü ile ilgili gen transkripsiyonuyla ilişkili sinyal ileti yolağının aktivasyonundan sorumlu enzim Na-K ATPaz'ın modülasyonu ile ilgilidir. Hipertansif sıçanlardaki deneysel çalışmalar insan modeli ile karşılaştırıldığında EU seviyelerinin, hipertansiyon ile ilişkili, hüce iskeleti proteinlerinin genetik polimorfizminin arttığı ve Na-K pompa aktivitesinin yükseldiği bulunmuştur⁷. Uvabain'in kendisi yüksek tansiyon oluşturur ve düşük konsantrasyonlarda sıçanlara uygulandığında renal Na-K pompasını up-regüle eder. İzole damar preparatlarında uvabain'in nanomolar konsantrasyonda agonistin oluşturduğu kontraksiyonu potansiyelize ettiği⁸, mikromolar konsantrasyonda vasküler düz kasda direkt etki ile kontraksiyon oluşturduğu⁹ veya, perivasküler adrenerjik sinir uçlarından noradrenalin'in salıverilmesine neden olduğu gösterilmiştir⁹. Uvabain'in oluşturduğu kasılmaya KCl'nin oluşturduğu kasılmaya benzer şekilde rho/rho kinaz yolağının katılması muhtemeldir. Ark ve ark.'nın¹⁰ sıçan renal arterinde yaptıkları çalışmada uvabain kontraksiyon oluşturmuştur, bu çalışmada uvabain vasküler Na⁺,K⁺-ATPazı inhibe ederek düz kasta etki göstermiş, ekstraselüller Ca⁺²'mun ortamdan kaldırılması ile ortadan kalkması, bu etkinin ekstraselüller Ca⁺²'a bağlı olduğu göstermiştir. Ancak, Saunders ve ark.'nın 2004¹¹ yılında insan umbilikal arterlerinde yaptıkları başka bir çalışmada uvabain'nin vasküler tonüs regülasyonunu endotelin-1 ekspresyonu ve salıverilmesi üzerinden gösterdiğini bulmuşlardır.

Agonistler tarafından (5-HT, fenilefrin, asetilkolin, U46619, endotelin, histamin, tromboksan A2) ve KCl tarafından düz kas kontraksiyonu myozin hafif zincir kinazının Ca^{+2} bağımlı aktivasyonuna, aynı zamanda Ca^{+2} bağımsız rho/rho-kinaz yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır^{12,13,14,15}. Yapılan çalışmalarda, Rho ve Rho kinaz yolağı komponentlerinin (RhoA, GEFs, ROCK) çeşitli deneysel hipertansiyon modellerinde^{10,16,17,18,19} ve hipertansif hastalarda²⁰ artığı bulunmuştur.

Rho kinazlar, kan basıncı homeostazında, düz kas kontraksiyonu, hücre proliferasyonu, hücre adezyonu, migrasyonu ve çok sayıda inflamatuvar cevabı da içeren çok sayıda önemli fizyolojik fonksiyonlara katıldığı gösterilmiştir²¹. Ayrıca, kan damarları, bronşiyal trakea, kavernosum gibi çeşitli dokularda tonik düz kas kasılmasının modülasyonunda da önemli rol oynamaktadırlar^{22,23,24}. Rho kinazlar, myozin hafif zincir fosfatazın (MHZF) myozin bağlayan alt ünitesini fosforile ederek düz kasın kalsiyuma duyarlılığını artırır, böylece intraselüler kalsiyum da belirgin artış olmaksızın düz kasın kasılması sağlanır^{2,25,26,27}.

Uvabainin sıçan renal arterinde Rho/Rhokinaz yolağını kullanarak kasılma oluşturduğu gösterilmiştir²⁸. Ancak literatürde uvabain ile oluşturulan kronik hipertansiyonda rhokinaz aktivasyonunun rolünün olup olmadığına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle, bu çalışmada uvabain ile oluşturulan hipertansiyonda, damar düz kaslarında Rho kinaz aktivasyonunun rolünün olup olmadığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kan Basıncının Regülasyonu

Kan basıncı; kalp atım hacmi ve damar yatağındaki kanın akım sırasında damar duvarına yaptığı basınca karşı olurturduğu dirence (toplam periferik direnç) bağlıdır. Kan basıncının düzenlenmesinde; çeşitli yapılar rol oynar. Bunlardan biri, vazomotor merkezler ve kardiyoregülatuar merkezlerdir. Bu merkezler, beyin sapının alt bölümlerinde bulunur. Görevi kan damarlarının özellikle de arteriyollerin çapını düzenlemektir. Buradan çıkan sempatik sinir dalları kan damarlarında bulunan düz kaslar üzerinde etki gösterirler. Bu düz kasların sürekli belirli düzeyde kasılmasını sağlayarak vazomotor tonusu oluşturur ve böylece de normal arteriyel basıncın oluşumunu sağlarlar. Vazomotor merkezin aktivitesinin artması kan basıncını artırır. Kardiyoregülatuar merkez kardiyak outputu etkileyerek kan basıncını etkiler. Bir diğer düzenleyici yapı, baroreseptörler ve kemoreseptörlerdir. Baroreseptörler arter basıncı hakkında beyin sapındaki merkezlere özel sinir dallarıyla sürekli bilgi gönderirler. Arter basıncı yükseldiğinde baroreseptörler gerilir ve uyarı oluşur, beyin sapında bulunan kardiyak yavaşlatıcı merkez uyarılır, kardiyak hızlandırıcı merkez inhibe edilir. Sonuçta kardiyak output azalır, arteriyoller genişler ve kan basıncı düşer. Arter basıncı düştüğünde tersi olaylar ile arter basıncı yükseltilir. Baroreseptörlerin yakınında düşük oksijen, yüksek CO₂ ve hidrojen iyon konsantrasyonlarına duyarlı kemoreseptör adı verilen özel reseptörler de bulunur. O₂ konsantrasyonu düşerse veya CO₂ ve H⁺ iyon konsantrasyonları yükselirse arteriyel basınç düşürülür ve kemoreseptörler uyarılır. Buradan kalkan uyarılar vazomotor merkeze gönderilir, vazomotor merkez uyarılır. Böylece kan damarları vazokonstriksiyona uğrar, arteriyel kan basıncı artar. Kan basıncının

artmasıyla kan akımı da artar. Kan basıncının düzenlenmesinde rol oynayan üçüncü yapı, üst beyin merkezleri ve emosyonel duylardır.

Korku ve hiddet gibi sempatik sinir sistemini uyaran düşünceler vazomotor merkezleri de uyarır, bu da arteriyollerin vazokonstruksiyonuna sonuçta da kan basıncının yükselmesine yol açar. Sempatik tonusun artışı, renin salgılanmasını da artırarak anjiotensin-aldesteron sistemini uyarıp Na ve su tutulumunun artmasına neden olur²⁹.

Dördüncü yapı, hormonlar ve kimyasal maddelerdir. Renin-anjiyotensin sistemi birkaç saat içerisinde kan basıncını değiştirebilir. Renin anjiotensin I'ı anjiotensin II'ye çevirir. Anjiotensin II güçlü bir vazotonstriktör olduğundan sistemik vasküler rezistansta aşırı bir artış olur. Ayrıca aldesteron salgılatarak sodyum tutulumunu artırır, böylece hipervolemiye neden olur²⁹. Anjiotensin dönüştürücü enzim bradikinin-kallikrein sistemi üzerinden nitrik asit (NO) salınımını azaltarak aterosklerozun öncüsü olan endotel disfonksiyonuna neden olur³⁰.

Beşinci yapı endotel dokudur. Tüm damar düz kaslarında bulunan endotel, vazodilatör ve vazokonstriktör substratların yapımında etkili olarak vasküler hemostazın yapımında temel rol oynamaktadır³¹. Hipertansif hastalarda yapılan bir çalışmada, damarlarda vazokonstriktör cevabın arttığı bunun nedenin ise endotel-1 (ET-1) seviyesinin artışı olduğu gösterilmiştir³².

2.2. Hipertansiyonun Patogenezi

Hipertansiyon, sistemik arteriyel kan basıncının devamlı yükselmesi ile kendini gösteren bir kalp-damar hastalığıdır. Hipertansiyon, zamanla kalpte ve arterlerde geri dönüşümsüz değişiklikler yaparak ciddi kardiyovasküler komplikasyonlara yol açması (akut myokard infaktusu, diğer koroner hastalıklar, sol ventrikül hipertrofisi, konjestif kalp yetmezliği, inme, progresif böbrek yetmezliği, retrinopati, disekan aort anevrizması vb gibi) nedeniyle önemli bir klinik sorundur³³.

Hipertansiyon primer (veya esansiyel) ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Esansiyel hipertansiyon; sistolik kan basıncının 140 mmHg, diastolik kan basıncının 90 mmHg'nin üzerine çıkmasıyla karakterizedir³⁴. Temel nedeni belli olmayan esansiyel hipertansiyon, olguların yaklaşık %95'ini oluşturur. Olguların %5'inde hipertansiyon; başta bazı böbrek hastalıkları, renovasküler hastalıklar ve bazı endokrin hastalıklar (bazı tiroid, adrenal, paratiroid ve ön hipofiz hastalıkları gibi) olmak üzere arteriyel kan basıncını yükselttiği bilinen primer patolojik bozukluklara bağlıdır³³.

Esansiyel hipertansiyonda kan basıncı yükselmesi total periferik damar rezistansının yükselmesine bağlıdır; ancak az sayıdaki bazı olgularda kalp debisi veya dolaşan kan hacmi de yükselmiş olabilir. Esansiyel hipertansiyon uzun yıllar semptomsuz veya komplikasyonsuz olarak seyreder; bu sırada hastalığın tek göstergesi diyastolik ve/veya sistolik kan basıncının yükselmiş olmasıdır³³.

Esansiyel hipertansiyonun patogenezi çok faktörlü ve karmaşıktır. Genetik faktörler bunlardan biridir³³. Hipertansiyonogenik faktörler olarak adlandırılan; obezite, yüksek alkol ve tuz alımı gibi faktörler

kan basıncını artırmaktadırlar. Bu faktörler kalıtsal, davranışsal veya çevresel koşullardan etkilenecek gelişmiş olabilir. Çevresel ve kalıtsal etkileşimlerle birlikte, sempatik sinir aktiviteleri, renin anjiyotensin ve renin-kallikrein-kinin sistemi ve endotel faktörlere aracılık eden fenotipler, kardiyak kontraksiyonu, vasküler reaksiyonu ve sodyumun vücuttan atılımını etkilerler. Bu ve bunun gibi diğer birçok aracı fenotip toplam vasküler direnci, kalp debisi ve kan basıncını etkileyebilirler³⁴.

Yüksek miktarda tuz (sodyum) alınımı ile kan basıncı arasındaki bağlantı:

Yüksek tuz alınımı hipertansiyonda major risk olarak gösterilmiştir. Geniş ölçekli epidemiyolojik çalışmalarda INTERSALT³⁵ ve CARDIAC³⁶ gibi tuz atılımını ile kan basıncı arasındaki bağlantı açıklanmıştır. Deney hayvanları ve insanlarda tuz geri alınımı üzerine çalışmalar yapılmıştır^{37,38,39}. Esansiyel hipertansiyonu olan hastalar tuza duyarlı ve tuza duyarlı olmayan hastalar olarak iki gruba ayrılmıştır⁴⁰. Tuza duyarlı hipertansiyonu olan hastalarda, tuz yükselmesiyle kan basıncının, tuza duyarlı olmayan hastalara göre daha çok arttığı ve diüretiklerle yapılan tedaviye daha iyi cevap verdikleri gösterilmiştir³⁷. Aşırı sodyum alınımı, sıvı hacmini ve preloadu artırarak kardiyak debiyi yükseltir. Bunun yanında vasküler reaksiyona ve renal fonksiyona etki ederek de kan basıncını artırır³⁴.

NaCl 'ün kan basıncına direk etkisi:

Normal hayvanlarla yapılan çalışmalarda; diyetle alınan NaCl' ün, vücut ağırlığında, toplam sodyum giriş-çıkışında, ekstraselüler sıvı, plazma ve kan hacminde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra; plazma renin, anjiyotensin ve noradrenalin seviyelerinde azalma

ve Na^+ , K^+ , Ca^{+2} vücuttan atılımında artış olduğu gözlenmiştir. Çalışmalar insanlarda da benzer etkileri göstermiştir⁴¹.

NaCl'ün kan basıncına dolaylı etkisi;

İki farklı etkisi vardır. Birincisi dijitalis benzeri maddelerin (DBM) plazma konsantrasyonunda artış ve böbreklerden K^+ atılması nedeniyle plazma K^+ konsantrasyonunda azalmadır. Plazma K^+ konsantrasyonundaki azalma hayvan damarlarında vazokonstriksiyona bağlı kan basıncında artışa neden olur⁴¹.

DBM ile plazma konsantrasyonundaki artış birçok nedenden kaynaklanabilir. Diyetle yüksek miktarda tuz alınması; plazmada Na^+ - K^+ pompasını inhibe eder, bu nedenle özellikle hayvanlarda renal kütlede azalma, insanlarda düşük renine bağlı hipertansiyon gelişmesine neden olur^{29,42,43}.

Damar düz kaslarında, kalp kasında ve adrenerjik hücrelerde Na^+ - K^+ ATPaz inhibisyonu, DBM miktarının artması ve K^+ plazma konsantrasyonundaki azalma prohipertansif olayların başlamasına neden olur. Na^+ - K^+ ATPaz inhibisyonu; damar düz kas hücrelerinin depolarizasyonu ile voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarından Ca^{+2} 'un hücre içine akışını sağlayarak kan basıncını artırır⁴¹.

Kalp damar düz kas hücreleri ve plazma arasındaki Na^+ - Ca^{+2} giriş çıkışı azalır. Böylece Ca^{+2} un hücre dışına taşması azalır. Noradrenalin (NA) geri alınımını azaltır, kan duvarlarındaki adrenerjik sinir uçlarından NA salınması artar, nöromusküler kavşakta NA miktarı artar.

Bütün bu mekanizmalar kontraktil aktiviteyi artırır ve kan basıncının artmasına neden olur⁴¹.

Normotansif ratlarda; uzun süreli introserebroventriküler (ICV) infüzyon şeklinde hipertonic tuz çözeltisi uygulanması sonucu, arteriyel barorefleksin zayıflaması ve hipertansiyonun indüklendiği görülmüştür. Bilinçli ratlarda; kısa süreli ICV infüzyon şeklinde hipertonic tuz çözeltisi, uvabain veya uvabain aktivitesi içeren beyin ekstrakte dokuda benzer sempatik aktivite ve baskılanmış yanıt ortaya çıkmıştır⁴⁴. Yapılan çalışmalarda; kalıtsal hipertansif ratlardaki arteriyel baroreseptör fonksiyonlardaki, Na^+ geri alınımındaki cevaplılıkta oluşan değişikliklerin normotansif kontrol ratlara oranla farklı olmasının nedenin Na^+ a duyarlı hipertansiyon faktörlerinden kaynaklandığı gösterilmiştir⁴⁴.

Renal sempatik aktiviteler veya iv fenilefrin verilmesi sonucu kalp atım hızı ve ortalama kan basıncındaki değişiklikler; baroreseptör mekanizmanın uyarılmasına sebep olur. Beyinde yüksek miktarda Uvabain bulunması arteriyel baroreseptör mekanizmayı duyarsız hale getirir böylelikle yüksek Na^+ a bağlı hipertansiyon oluşturur⁴⁴.

Böbrekler; tuzun geri alınımı ve arteriyel kan basıncı arasındaki bağlantıda merkezi rol oynar³⁸. Böbrekler iki mekanizma ile kan basıncını etkilemektedir. Bunlardan birtanesi Na^+ ve suyun idrar atılımını çift yönlü, artırarak veya azaltarak ekstraselüler sıvı hacmini ve renal perfüzyon basıncını düzenlemektedir. Bir diğer mekanizma da, Na^+ ve suyun reabsorpsiyonu ve periferel vasküler basıncı direkt olarak kontrol eden renin-anjiyotensin-aldosteron sistemidir³⁴. Birçok hipertansif hastada; hem düşük plazma renin aktivitesi (düşük renin hipertansiyon) hem de yüksek plazma renin aktivitesi (normal-yüksek renin hipertansiyon) görülmüştür. Renin plazma aktivitesi düşük olanlarda böbrek hasarı

oluştugu ve buna bağlı olarak da NaCl ve suyun vücuttan atılımının yavaş olduğu gösterilmiştir⁴¹.

Buna karşılık ayrıca stres de doğrudan sempatik sinir sistemi ile anjiyotensin sistemini aktive ederek yüksek sodyum geri alınımına neden olmaktadır. Sempatik sinir sisteminin aktive olmasıyla vasküler direnç artmaktadır³⁴.

Hipertansiyon obez insanlarda çok yaygın olarak görülmektedir. Obez insanlarda obez olmayan insanlara göre daha yüksek kardiyak output, kalp vuruş hacmi, toplam kan hacmi, düşük periferel rezistans görülmüştür. Vücut ağırlığının artması ile orantılı olarak kardiyak outputdaki artış, kan basıncının yükselmesine neden olmaktadır³⁴.

2.3.Kardiyak Glikozitler ve Endojen Uvabain

200 yılı aşkın süredir; dijitalis, kardiyotonik steroidler ve türevleri konjestif kalp hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır. 1953 yılında Schatzman, kardiyotonik steroidlerin sodyum pompasını inhibe ettiğini ve dijitalis reseptörünün plazma membranındaki Na^+/K^+ ATPaz olduğunu keşfetmiştir. 1960 sonlarında memeli kardiyak kasında Na^+/Ca^{+2} değiştiricisinin bulunması ile kardiyak steroidlerin sodyum pompasını inhibe etmesi ile intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun artması sonucu kardiyak kasta pozitif inotropik etki oluşturduğu gösterilmiştir⁴⁵.

Kardiyak glikozitler, kardiyak hücrelerdeki kısa ve uzun dönemdeki etkilerini Na^+/K^+ ATPaz enzimini spesifik bağlanma noktalarına bağlanarak, intraselüler iyon dengesindeki etkilerini de uvabain benzeri bileşiklerle yapmaktadır⁴⁶. Kardiyak glikozitlerin Na^+/K^+ ATPaz enzimi inhibisyonu ile intraselüler Na^+ konsantrasyonu ve buna bağlı olarak

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiştirici ile intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonu artmaktadır. Sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} geri alınımının artması pozitif inotropik etkinin oluşmasına neden olur. Sitoplazmik Ca^{+2} miktarı sarkoplazmik retikulumdaki depo kapasitesini aşarsa toksik etki olarak aritmi grlmektedir^{5,46}.

Kardiyak glikozitlerden dijitoksin, Digitalis purpureanın, digoksin ise Digitalis lanatanın yapraklarından elde edilmektedir^{33,46}. Memelilerde ise kardenoit benzeri (Uvabain, dijitoksin) ve bufodienolid benzeri (marinobufogenin) izole edilmiřtir⁴⁷.

Kardiyak glikozitler myokardın kontraktilesini ve kalp verimini artırmaktadır. Kardiyak glikozitler, kontraktilete üzerinde artırıcı etkilerinin sonucu olarak, sistolik disfonksiyona bağlı konjestif kalp yetmezliğinde; azalmış olan kalp atış hacminin ve debisinin artmasını, kalp tonusunun artmasını ve yetmezlik halinde büyümüş olan kalbin diyastolik hacminin azalmasını sağlarlar. Ayrıca düşmüş olan ejeksiyon fraksiyonunu yükseltirler, yükselmiş olan santral ve periferik venöz basıncı ve akciğer venöz basıncı azaltmaktadırlar³³.

Kardiyak steroidlerin, tuza bağımlı hipertansiyondaki rolleri

Son zamanlarda keşfedilen uvabain gibi kardiyotonik steroidler, marinobufagenin, proscillaridin A ve bufalin gibi diğer steroidler tuza bağımlı hipertansiyon patogenezinde potansiyel aracı mediyatrlerdir. İnsanlarda kronik olarak yüksek miktarda tuz alınması, plazma kardiyotonik steroidlerin (KTS) yüksek seviyelere çıkmasına yol açmıştır. Ayrıca esansiyel hipertansiyon hastalarının yaklaşık %50'sinde endojen uvabain miktarının yükseldiği gözlenmiştir. Genellikle; KTS lerin plazma membranındaki Na^+/K^+ -ATPaz'ları bloke ettiği^{47,48} ve sitozolik Na^+

konsantrasyonunun yükselmesine yol açtığı düşünülmektedir. Hücrede sodyum birikmesi Na^+/Ca^{+2} değiştirici yoluyla sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu yükseltir. Böylece vasküler düz kasların veya kalp kaslarının kasılmasını artırır^{11,45,46,48}.

Uvabain, adrenal korteks ve hipotalamusun steroid yapıdaki hormonudur. Uvabain benzeri immünoreaktivite, plazma dahil bütün dokularda bulunmuş, fakat en yüksek konsantrasyon adrenal, hipofiz ve hipotalamusda görülmüştür^{1,45,46,47,49}.

Kardiyovasküler fonksiyon ile ilgili birçok düzenleyici mekanizmada kalsiyum yer almaktadır. Uvabainin, kalsiyumun salınımını tetiklediği Aizman ve ark. tarafından gösterilmiştir. Kalsiyumun salınımını tetikleyen Uvabain dozu, pompa aracılıklı transportu ya sadece kısmen inhibe etmekte veya hiç inhibe etmemektedir. Fakat bu etki, kalsiyum salınımını kontrol eden inositol trifosfat reseptörünün inhibisyonu ile veya intraselüler kalsiyum konsantrasyonu arttığı zaman bu kanal kapanır ve sistolik kalsiyum konsantrasyonu düşer. Uvabain Na^+/K^+ -ATPaz'a bağlanır ve bu enzimin inositol trifosfat reseptörü ile etkileşmesi kanalın açılması ile sonuçlanır⁵⁰.

Sodyum dengesizliğinde, kronik renal yetmezlikte, hiperaldesteronizmde, konjestif kalp yetmezliğinde endojen uvabain (uvabain benzeri immünoreaktivite) konsantrasyonunda artış görülmüştür⁴⁵.

Uvabainin düşük dozlarda insanlarda vazokonstriksiyona neden olduğu gözlenmiştir. Komplikasyona bağlı olmayan esansiyel hipertansif Kafkasların %50'sinde; endojen uvabainin

konsantrasyonundaki artış, kalp atım sayında, sol ventrikül kütlesinde ve kalp atım hacminde artış olduğu görülmüştür⁵¹.

İzole damar preparatlarında uvabainin nanomolar konsantrasyonda agonistin oluşturduğu kontraksiyonu potansiyelize ettiği⁸, mikromolar konsantrasyonda vasküler düz kasta doğrudan etki ile kontraksiyon oluşturduğu⁹ veya perivasküler adrenerjik sinir uçlarından noradrenalin salınımına neden olduğu gösterilmiştir⁹.

Kronik uvabain uygulanması; santral sinir sistemiyle bağlantılı olan sempatik tonusu artırarak, renin anjiotensin sistemini aktive ederek^{52,53}, periferel vasküler sistemi etkileyerek ve kardiyak dokuda yapısal, fonksiyonel ve biyokimyasal değişiklikler meydana getirerek hipertansiyon oluşturmaktadır^{5,45}.

Rossoni ve ark.'nın⁸ sıçan torasik aort ve kuyruk arteri üzerinde yaptıkları çalışmada uvabainin oluşturduğu hipertansiyonun, endotel NOS ve nöronal NOS kaynaklı NO salınımının artışı ile kalsiyum bağımlı potasyum kanallarının açılmasını sağlayan endotelial hiperpolarize edici faktör (EDHF) ile ilişkilidir. Bu yolların fenilefrin kontraksiyonunun negatif modülasyonunu sağlayarak hipertansiyon oluşturduğunu göstermişlerdir. Uvabainin kronik uygulanması sonucu hipertansiyon oluşturulmuş ratlardan izole edilen torasik aortta ve mesenterik arterde fenilefrinin oluşturduğu kontraktıl aktivitede azalma olduğu gözlenmiştir. Uvabainin akut uygulanması ile endotelden feniferinin kontraktıl etkisini negatif modüle eden, EDHF, prostasiklin, ve NO salınımını artırdığı görülmüştür⁸.

Uvabainin Na⁺/K⁺- ATP'az enzimine bağlanması sitoplazmik tirozin kinaz Src'yi aktive eder. Ayrıca mitokondride reaktif oksijen (ROS)

üretimini artırır ve intraselüler kalsiyum konsantrasyonunu düzenler. Uvabain kardiyak miyositlerde hipertrofik büyümeyi stimüle eder ve düz kas hücrelerinde poliferasyon ve birçok malign hücrede apoptosis oluşturur⁵⁴.

Ayrıca kronik uvabain uygulaması sonucunda uvabainin böbreklerde yüksek oranda biriktiği ve renal vasküler direnci artırdığı gösterilmiştir⁵¹.

Oral ve paranteral yolla alınan uvabain; selektif olarak adrenalde tutulmakta, %3-5 oranında da intestinal sistemde tutulmaktadır⁴⁵.

2.3.1. Na⁺/K⁺ - ATP-az Enzimi ve Uvabain

Na⁺/K⁺- ATP'az enzimin, yapısı, pompa fonksiyonu ve enzimin regülasyonu iyi karakterize edilmiştir⁵⁴. Sodyum pompasının α izoformunun 4 alt ünitesi vardır (α_1 , α_2 , α_3 ve α_4) her biri ayrı dokularda dağılım göstermektedir. α_1 izoformu bir çok dokuda yer alırken α_2 izoformu beyin, kalp, damarlarda ve iskelet kaslarında bulunmaktadır. α_3 ler sınırlı olarak sinirsel dokularda ve damar düz kaslarında insanlarda kalpte bulunmaktadır. α_4 izoformları ise testislerde ve özellikle olgunlaşmış spermde bulunmaktadır. Na⁺/K⁺ ATPaz'ın α_1 / α_2 izoformları kan basıncını spesifik Uvabaine duyarlı kardiyak glikozit bağlanma bölgeleri yoluyla düzenlemektedir. Bu iki izoform kardiyak kontraktilite de benzer rol oynamaktadır⁵⁵.

Na⁺/K⁺- ATP'az enzimi, 3 Na⁺ iyonunun dışarı çıkışına karşı 2 K⁺ iyonunun içeri girişini sağlayarak etki gösterir, bu etki sonucu hücrede pozitif yük kaybı meydana gelir^{11,33}. 3 Na⁺ iyonunun dışarı çıkışı ve 2 K⁺ iyonunun içeri girişi sonucu oluşan elektrokimyasal fark, iyonların, aminoasitlerin, glukoz ve birçok farklı bileşiğin sodyum ile çift oluşturarak hücre içine girmesini kolaylaştırmaktadır⁵⁰.

Kardiyotonik steroidler (KTS); Na⁺/K⁺- ATP'az enziminine katalitik α ve regülatör β alt ünitelerine spesifik bağlanarak etki gösterirler^{54,46}. Na⁺/K⁺ ATPaz'ın α_2 , α_3 , izoformları plazma membranında endoplazmik retikuluma yakın bulunurlar. α_2/α_3 izoformlarının inhibisyonu, sistolik Na⁺ konsantrasyonunun ve indirekt olarak da Ca⁺² konsantrasyonunun değişmesine neden olur. Sarkoplazmik retikulumdaki Ca⁺² içeriğini ve sinyalini modüle eder, bu da kardiyak glikozidlerin pozitif inotropik etkisinin başlamasına öncülük eder⁴⁵.

Kardiyovasküler dokularda endojen dijitalis benzeri bileşiklerin üretiminin artması Na^+/K^+ ATPaz enzimini inhibe ederek hipertansiyona katkıda bulunur⁴⁵.

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiştirici proteini (NCD); NCD_1 , NCD_2 , NCD_3 içeren multigen ailesini kapsar. NCD_1 genellikle kalp, böbrek, beyin, arterler ve diğer organlarda eksprese edilir. Buna rağmen NCD_2 ve NCD_3 ün eksprese edildiği yerler genellikle beyinle sınırlıdır. Bu dönüştürücüler, I_1 (intraselüler sodyum bağımlı) inaktivasyonu ve I_2 inaktivasyonları (Ca^{+2} regülasyonu gibi) olmak üzere en az 2 inaktivasyon sistemi tarafından modüle edilir⁴⁸.

Kardiyak kaslarda görülen kasılma gevşeme boyunca NCD_1 Ca^{+2} 'un ihraç edilmesinde, dışarı atılmasında ana görevi üstlenir. Vasküler düz kas hücrelerinde NCD_1 'in ayrıca Ca^{+2} homeostazını sağlamak için sitozolden Ca^{+2} dışarı atılmasında görevli olduğu düşünülmektedir. Fakat kardiyak NCD_1 'ine kıyasla, vasküler NCD_1 'e ait çok az bilgi vardır⁴⁸.

2.4 . G Proteinleri ve RhoA/Rho Kinaz Yolağı

Hücreler, hormonlar, nörotransmitterler veya duyuşal uyarılar gibi hücre dışı sinyaller sayesinde dışardan bilgi alırlar. Böylece hücreler birbiriyle iletişim kurarlar. Transmembran sinyal sistemlerinin tümü, reseptör ve efektör olmak üzere iki bileşenden oluşur. Reseptör hücre dışı uyarıları tanır, efektör ise ilgili reseptör denetiminde hücre içi sinyal oluşturabilir⁵⁶.

Hücre dışı sinyallerin hücre içine girişi dört farklı yolla gerçekleşir. Bunlar; hidrofobik moleküllerin hücre zarından difüzyonu ile,

iyon kanalları aracılığı ile, G protein kenetli reseptörler aracılığı ile ve enzim aktivitesine sahip reseptörler aracılığı ile gerçekleşmektedir⁵⁶.

G proteinleri; bakterilerden memelilere kadar korunmuş büyük GTPaz ailesinin üyelerindedir. G proteinleri plazma zarındaki reseptörler ve efektörler ile kenetlenerek hücredeki sinyal iletiminde önemli rol oynarlar. G proteinleri GTP'nin bağlandığı hidrolizlendiği bir α -alt birimi ile bir $\beta\gamma$ -kompleksinden oluşmaktadır⁵⁶.

Hücre zarının sitoplazmik yüzüne yerleşik olarak bulunan heterotrimetik G proteinleri (Guanin Nükleotit Bağlayan Proteinler) küçük monomerik GTP bağlayan proteinleri de içine alan geniş GTPaz üst ailesinin üyesidirler. α, β, γ altbirimlerinden oluşan G proteinleri binden fazla hücre yüzey reseptörleri ile kenetlenerek, enzim ve iyon kanalı gibi pekçok efektör üzerinden sinyal iletimine aracılık ederler⁵⁶.

G proteinleri inaktif durumdayken α -altbirimi, $\beta\gamma$ -kompleksi ve GDP birbirine bağlıdır⁵⁶. GDP-bağlı dinlenme durumunda heterotrimetik yapıda bulunan G proteini hücre dışı reseptörlerle veya hücre içi efektör sistemleri ile etkileşim halinde değildir. Bir sinyal molekülünün G protein kenetli reseptöre bağlanmasıyla reseptör uyarılır. Böylece α -altbiriminin guanin nükleotid bağlanma bölgesinden GDP'nin serbestleşmesine ve yerine GTP'nin bağlanmasına yol açar. Yapıda meydana gelen bu değişiklik iyon kanalları ya da enzimler gibi efektörlerin aktivitesini düzenler. G protein α -altbirimi GTPaz aktivitesine sahiptir ve α -altbirimine bağlı GTP'yi GDP ve inorganik fosfata hidrolizler. GTP hidrolizi oldukça yavaş seyredir. G proteinlerinin uyarılmasında hız belirleyici aşama, nükleotid bağlanma cebinden GDP'nin serbestleşmesidir^{56,57}.

Küçük G proteinleri, heterotrimetrik G proteinleri gibi GTPaz aktivitesine ve GTP bağlayıcı bölgeye sahiptir. Ancak onlardan farklı olarak tek bir protein zincirine sahip olduğundan monomerik veya küçük G proteinleri olarak adlandırılırlar. Küçük G proteinlerinin beş alt ailesi (Ras-Rho-Rab-Arf ve Ran) tanımlanmıştır. Ras proteinleri gen ekspresyonunu, Rho/Rac/Cdc42 proteinleri hücre iskeletinin reorganizasyonunu, gen ekspresyonunu ve düz kas kasılmasını, Rab ve Sar1/Arf proteinleri hücre içi veziküler trafiği, Ran proteinleri nükleostoplazmik transportu düzenlerler^{56,58}. Fizyolojik fonksiyonlarının yanında kanser, hipertansiyon, diyabet ve kronik spazm gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynarlar⁵⁸.

Rho A/ Rho-kinaz yolu:

Kontraktilite özelliği gösteren düz kasların kasılması için Ca^{+2} seviyesi önemli rol oynamaktadır. Düz kaslarda agonist (örneğin fenilefrin, karbakol) stimülasyonu ile oluşturulan maksimum kasılmaların çoğu kez depolarizasyonla (örneğin yüksek K^{+} ile) indüklenen maksimum kasılmadan daha fazla olduğu gözlenmiştir⁵⁸.

Sitoplazmik serbest Ca^{+2} düzeylerindeki artış, düz kas kasılmasının ana tetik mekanizmasını oluşturmaktadır. Ancak hücre içi Ca^{+2} düzeyleri ile myozin hafif zincir fosforilasyon derecesi ve buna bağlı kasılma gücü her zaman birbiri ile paralellik göstermemektedir^{58,59} (Şekil 1 ve Şekil 2).

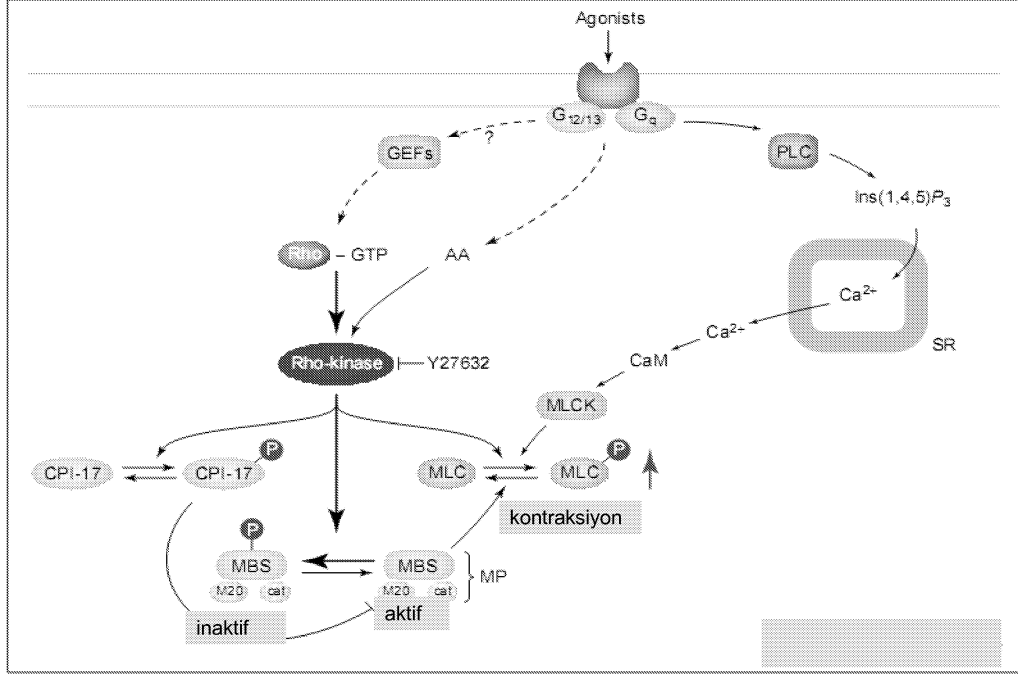
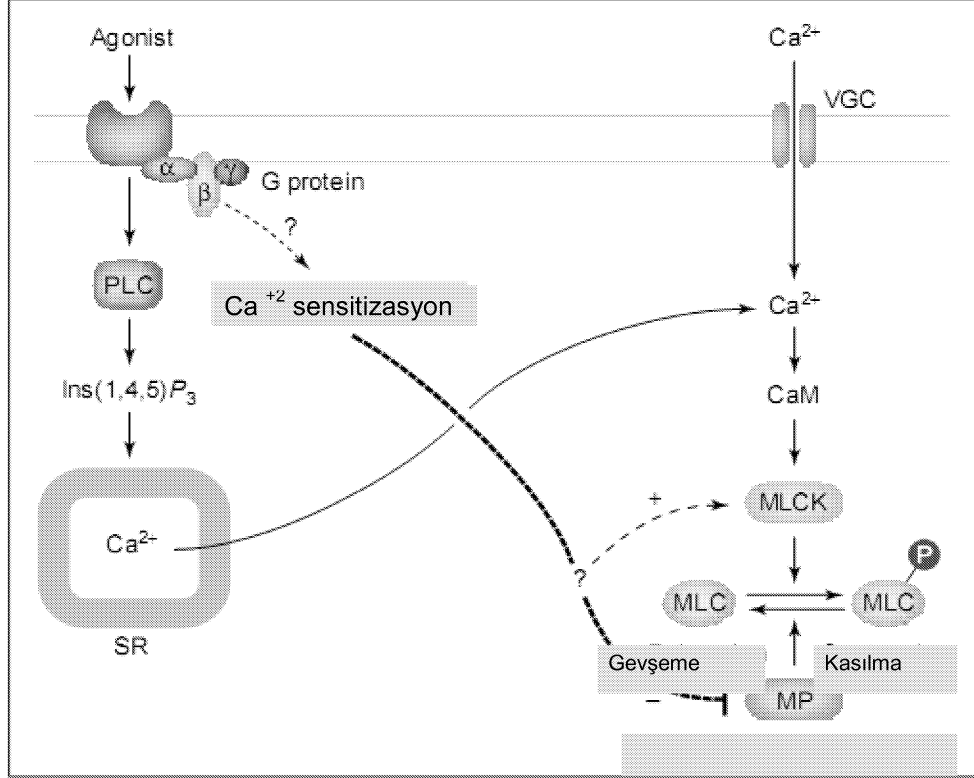


Fig. 2. Established and proposed models for the regulation of smooth muscle contraction. The Rho-kinase pathway is specifically inhibited by Y27632 (Refs. 40, 41). These

Şekil 1 : Agonist ile indüklenmiş düz kas kasılmalarında Ca^{+2} duyarlılığı. (59 nolu kaynaktan türkçeleştirilmiştir)



Şekil 2 : Düz kaslarda kontraksiyonun regülasyonu (59 nolu kaynaktan türkçeleştirilmiştir)

Agonistler tarafından stimüle edilen hücre membranındaki reseptörler farklı en az iki heterotrimetrik G proteinini uyarır. G proteini uyarılırsa fosfolipaz C (fosfoinozididaz) enzimi aktive edilir. Böylece hücre membranında fosfotidil inozitol 4,5 difosfat hidroliz olarak diaçil gliserol (DAG) ve inozitol-trifosfat (IP₃) oluşur. DAG, proteinkinaz C'yi aktive ederek kalsiyum duyarlılaşması gibi bir takım hücresel etkilere neden olurken, IP₃ endoplazmik redikulumdan Ca⁺² açığa çıkmasına neden olur. Ca⁺² kritik konsantrasyona ulaşınca myozin hafif zincir kinaz enzimini (MHZK) aktive eder^{56,60}. Bu enzim myozin hafif zinciri (MHZ) fosforile ederek kasılma olayını başlatır. Ancak hücre içi kalsiyum düzeylerinin düşmesine rağmen başlatılan kasılma olayının sürdürülebildiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar kasılmanın sürdürülmesini sağlayan bir Ca⁺² duyarlı mekanizmanın var olduğunu ortaya koymuştur. Bu yollardan biri Rho A/ Rho-kinaz yolağıdır⁶⁰.

Rho proteinleri (RhoA ve diğerleri) GDP-bağlı iken inaktif halde GTP-bağlı iken aktif halde bulunurlar. Rho aktivitelerini kontrol eden başlıca 3 protein tanımlanmıştır.

Bunlar;

1. Rho'nun aktive olmasını sağlayan GEP veya GEF (Guanin nükleotid değiş-tokuş proteini veya faktörü),
2. Rho'dan GDP'nin ayrışmasını ve GTP bağlanmasını dolayısıyla onun aktive olmasını önleyen GDI (Guanin nükleotid disosiyasyon inhibitörü),
3. Rho-GTP'yi inaktif hali olan Rho-GDP şekline dönüştüren GAP (GTPaz aktive edici proteinler)'dir^{58,59}.

Rho'nun aktivasyonunda hız kısıtlayıcı basamak GDP-bağlı form'dan GDP'nin ayrılmasıdır. Diğer GTP bağlayıcı proteinler gibi Rho, hem GDP/GTP bağlayıcı hem de GTPaz aktivitesi gösterir ve

moleküler bir anahtarlık gibi çalışarak GDP bağlayıcı inaktif durumla (GDP-Rho) GTP bağlayıcı aktif durum arasında gider-gelir. Rho'nun aktivitesi döngüsel olarak düzenlenir. Aktif haldeki Rho, yani Rho-GTP, C- terminaline bağlı geranil-geranillenmiş kuyruğuyla (izoprenilasyon) hücre membranına hedeflenir ve spesifik hedefleriyle (Rho-kinaz gibi) etkileşir⁶¹.

GTP'azı aktive eden proteinler (GAP), Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini hızlandırarak ve onu inaktif GDP-Rho'ya dönüştürerek negatif regülatörler gibi çalıştırır⁶¹.

Rho-kinaz (ROCK, ROK): Rho-kinaz bir serin-treonin protein kinazdır. ROCK-1 (ROCK β) ve ROCK-2 (ROCK α) olarak bilinen 2 izoformu tanımlanmıştır^{25,59}.

Rho-kinaz, myozin hafif zincirinin direkt fosforilasyonu ve myozin fosfatazın inaktivasyonu ile düz kaslarda Ca⁺² duyarlılığını artırarak kontraksiyon oluştururlar^{25,26,59}. Rho-kinaz enzimini inhibe eden ajanlar arasında Y27632 ve fasudil (HA-1077) gibi maddeler bulunmaktadır^{59,63,64,65,66}.

Rho/Rho-Kinaz Sinyal Mekanizmasının Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi :

Spontan hipertansif sıçanlarda agonistle indüklenen Rho- aracılı Ca⁺² duyarlılığının arttığı bildirilmiştir⁶⁷. Büyükaşar ve ark.'nın 2004 yılında yaptıkları çalışmada sıçan süperior mezenterik arterinde ROCK-2 enzimin eksprese edildiği ve damar yatağı perfüzyon basıncının kontrolüne katkı sağladığını göstermişlerdir. ROCK

inhibitörü olan Y-27632 aritmilere karşı myokardı koruyucu etki yapmaktadır⁶⁸.

Rho-kinaz ve NO kardiyovasküler sistemde birbirine zıt çalışan iki ana mekanizmadır. Rho-kinaz enziminin, e-NOS enzimini 495. treonin amino asidinden fosforilleyerek inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca NO çözümlenür guanilil siklazı aktive ederek sGMP düzeyini artırır, oluşan sGMP, kendisine duyarlı proteinkinaz G'yi (PKG) aktive eder. NO bağımlı PKG, Rho-kinazın etkisini antagonize etmektedir⁶².

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Deneylerde Sağlık Bakanlığı Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı'ndan temin edilen Wistar cinsi 250-300g ağırlığında erkek ratlar kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

NaCl, NaHCO₃, MgCl₂, KH₂PO₄, CaCl₂, Glukoz monohidrat (Merck); KCl, Fenilefrin, Asetilkolin, Uvabain (Sigma)'dan sağlanmıştır.

3.1.3. Kullanılan Aletler

İzole organ banyosu

Sirkülatör (May WBC 34)

Transducer (May FDT 10-A)

Bridge Amplifier (May TDA 979)

Bilgisayar

Hasas terazi (Schimadzu)

pH metre (Jenco 6173ph)

Mikropipet (Eppendorf Research)

Kuyruktan Kan Basınç Ölçüm Cihazı (May 9610BPHR)

3.2. YÖNTEM

In vivo Kan Basıncı Ölçümü (Tail Cuff Yöntemi)

Deneylerde 250-350 g ağırlığındaki albino ratlar kullanılmıştır. Kontrol grubuna serum fizyolojik, ilaçlı gruba Uvabain (28 µg/kg, intraperitoneal) enjeksiyonu 6 hafta boyunca hergün aynı saatte yapılmasına özen gösterilerek uygulanmıştır⁵. Bu süre boyunca haftada iki defa hayvanların kan basınçları ve kalp atım hızları kuyruktan kan basınç ve kalp atım hızı cihazı aracılığıyla (Non Invasive Blood Pressure System) ölçülmüştür^{8,55}.

3.2.2 İzole Organ Banyosu

5 hafta sonunda eter anestezisi altında sıçanın torasik aortası çıkartılmış, bağ dokularında temizlenen damar 2-3 mm'lik 4 eşit parçaya ayrılarak, %95 O₂. %5'lik CO₂ ile havalandırılan 37°C'deki Krebs-Henseleit (Molar: NaCl 6,95g/ml, NaHCO₃ 2,1 g/ml, KCl 0,34 g/ml, MgCl₂ 0,25 g/ml, KH₂PO₄ 0,16 g/ml, CaCl₂ 0,27 g/ml, glukoz 2,17 g/ml) çözeltisinin bulunduğu organ banyosuna asılmıştır. 1 g'da 1 saat dengelenme süresi sonunda deneye geçilmiştir. Bu süre boyunca her 15 dakikada bir izole organ banyoları yıkanmıştır. 60Mm KCl verilerek dokunun maksimum kasılması sağlandı. Deneyde kontrol ve ilaçlı gruplarda iki deney protokolü uygulandı.

1. grupta; damarlarda Rho kinaz inhibitörü Y27632'nin (10⁻⁸-10⁻⁵ M) KCl (60mM) veya fenilefrin (10⁻⁵ M) ile prekontrakte edilen dokulardaki gevşeme yanıtları incelendi.

2. grupta; damarlarda Y27632 (10^{-5} M) ile 30 dakika inkübasyon öncesi ve sonrası KCl (10-90 mM) veya fenilefrin'nin (10^{-9} - 10^{-4} M) kasılma cevapları yanıtları incelenmiştir.

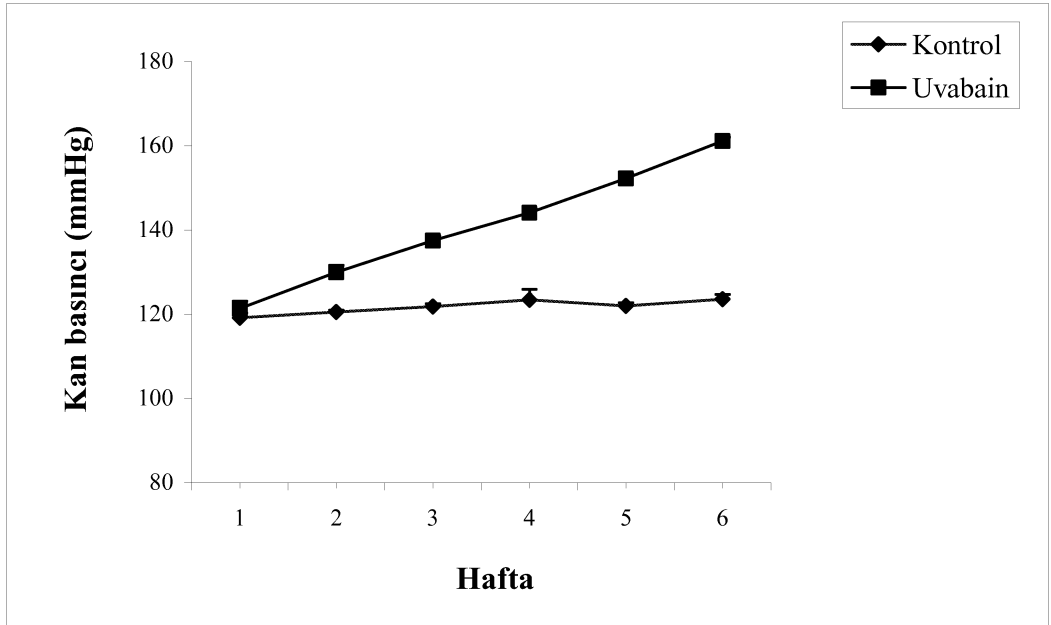
3.2.3. İstatistiksel analiz

Gruplar arasındaki anlamlılık Student t testi ve tek yönlü varyans analizi ANOVA yapılarak karşılaştırıldı. Değerler $X \pm SH$ şeklinde gösterildi ve $P < 0,05$ 'den küçük olan olduğunda anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Uvabain İle İndüklenen Hipertansiyon

6 hafta boyunca kontrol hayvanlara hergün serum fizyolojik, diğer gruba 28 µg/kg Uvabain uygulanmıştır. Bu süre içerisinde haftada iki defa kuyruktan kan basınç ölçüm cihazı ile sistolik kan basınçları ölçülmüştür. Uvabain uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna göre sistolik kan basıncında artış 4. haftadan sonra anlamlı olarak artmaya başlamıştır 6 hafta sonunda kontrol grubundaki sistolik kan basıncı 124 ± 1 (n=25) iken, Uvabain uygulanan grupta bu değer 161 ± 1 (n=25) çıkmıştır (Şekil 3).



Şekil 3: 6 hafta süresince Kontrol (serum fizyolojik) ve Uvabain (28 µg/kg) uygulanan sıçanlardaki kuyruktan kan basınç yöntemi ile elde edilen haftalık ortalama sistolik kan basıncı grafiği.

4.2. Y27632 Öncesi ve Sonrası KCl ve Fenilefrin Kasılma Yanıtlarındaki Değişmeler

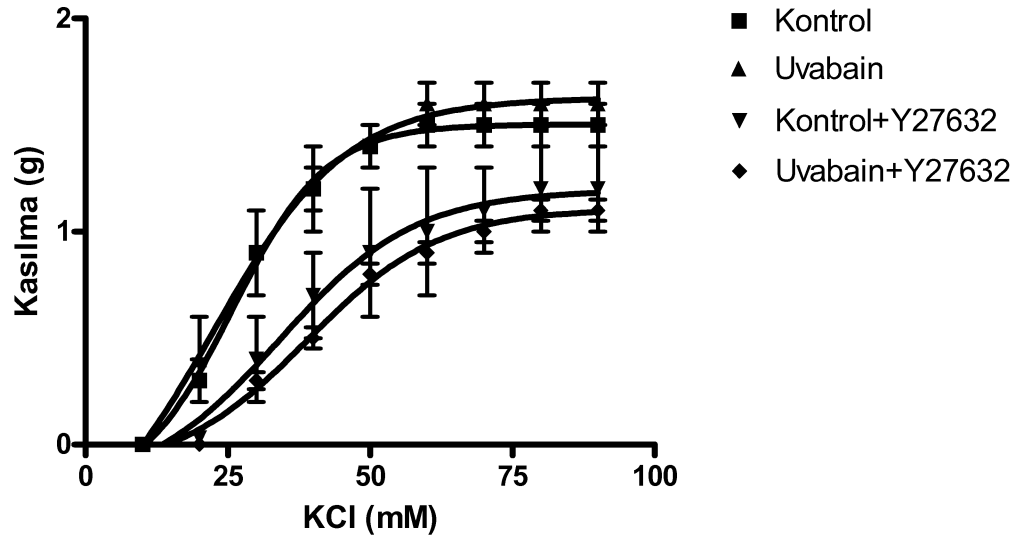
Damarlarda Y27632 (10^{-6} M) ile 30 dakika inkübasyon öncesi ve sonrası KCl (10-90mM) veya fenilefrin'nin (10^{-9} - 10^{-4} M) kasılma yanıtları incelenmiştir.

Uvabain ile hipertansif yapılan hayvanlar ile kontrol grubundaki hayvanlar arasında KCl kasılma yanıtları arasında EC_{50} değeri değişmezken, E_{max} değeri anlamlı olarak artmıştır. Kontrol ve hipertansif yapılmış gruptaki hayvanların damarlarında Y27632 inkübasyonu sonrası KCl'ün EC_{50} değerleri anlamlı olarak artmıştır. E_{max} değerleri ise hem kontrol ve hem uvabain grubunda Y27632 sonrası azalırken, bu azalış sadece Uvabain'li grupta anlamlı olmuştur (Şekil 4A).

Fenilefrin kasılma cevaplarının EC_{50} değerleri kontrol ve uvabain ile hipertansif yapılmış grupta Y27632 inkübasyonu sonrası anlamlı olarak azalmıştır. E_{max} değerleri ise hem kontrol ve hem uvabain grubunda Y27632 sonrası azalmıştır. (Şekil 4B).

Tablo 1: KCl'nin Y27632 öncesi ve sonrası kasılma cevabı. $P < 0.005$, * kontrole göre; # uvabaine göre.

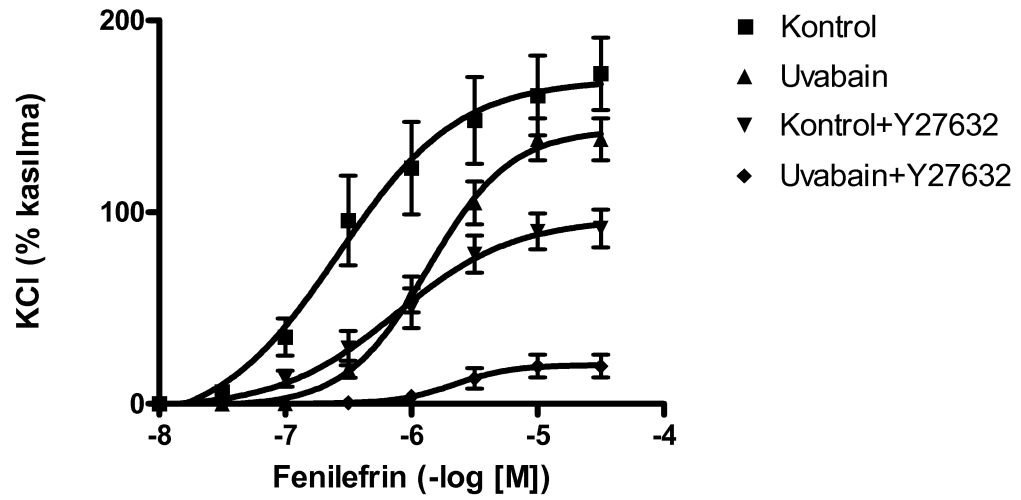
	Kontrol	Uvabain	Kontrol + Y27632	Uvabain + Y27632
EC ₅₀	25.85±0.53	22.51±0.93	34.19±1.29 *	38.94±0.77 #
E _{max}	1.50±0.007	1.63±0.008*	1.19±0.02 *	1.11±0.01 #



Şekil 4A: Y27632 (10^{-6} M) öncesi ve sonrası KCl (10-90 mM) doz-cevap eğrileri (n.4-6).

Tablo 2: Fenilefrin'nin Y27632 (10^{-6} M) öncesi ve sonrası kasılma cevabı. $P<0.05$, * kontrole, # uvabaine göre.

	Kontrol	Uvabain	Kontrol+ Y27632	Uvabain+ Y27632
EC ₅₀	6.58±0.22	5.86±0.076*	6.11±0.16 *	5.66±0.18
E _{max}	169.00±16.3 7	142.80±7.94	96.44±9.52 *	20.22±3.12 #



Şekil 4B: Y27632 (10^{-6} M) öncesi ve sonrası fenilefrin (10^{-9} - 10^{-4} M) doz-cevap eğrileri (n:5).

4.3. KCl ve Fenilefrin ile Prekontrakte Edilen Damarlardaki Y27632 Gevşeme Yanıtlarındaki Değişmeler

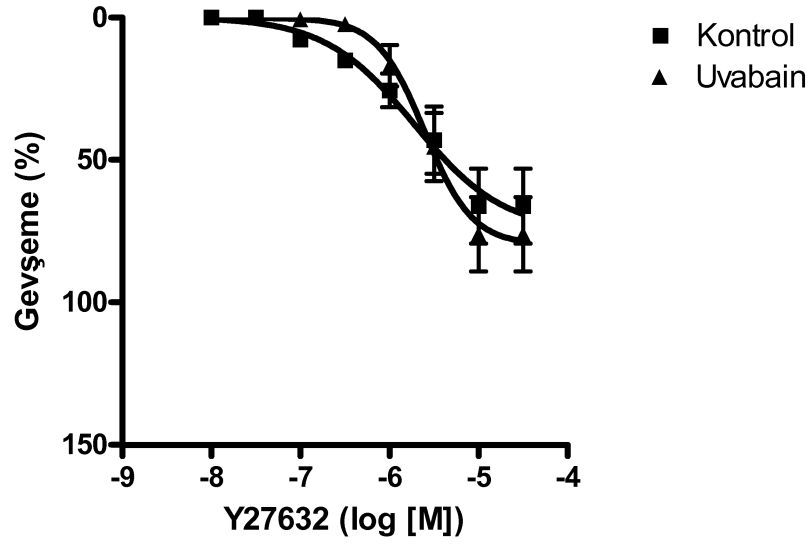
Kontrol ve hipertansif hayvanların damarlarında Rho kinaz inhibitörü Y27632'nin (10^{-8} - 3×10^{-4} M) KCl (60mM) veya fenilefrin (10^{-5} M) ile prekontrakte edilen dokulardaki gevşeme yanıtları incelendi.

Uvabain uygulanmış grupta KCl ile prekontrakte edilen damarlarda Y27632 gevşeme yanıtının EC_{50} değeri kontrol'e göre anlamlı olarak azalırken, E_{max} değeri anlamlı olarak değişmemiştir (Şekil 5A).

FE ile prekontrakte edilen damarlardaki Y27632 gevşeme yanıtlarının EC_{50} ve E_{max} değerleri kontrole göre uvabain'li grupta anlamlı olarak artmıştır (Şekil 5B).

Tablo 3: KCl ile prekontrakte edilmesi damarlardaki Y27632 gevşeme cevabı. $P < 0.05$, *kontrolle göre.

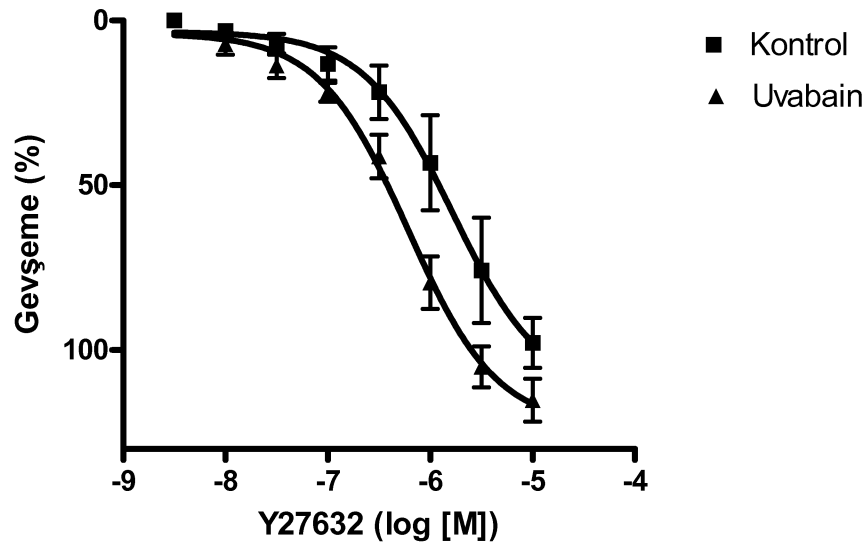
	Kontrol	Uvabain
EC ₅₀	5.72±0.05	5.60±0.01*
E _{max}	75.16±3.14	79.83±0.89



Şekil 5A: KCl (60 mM) ile prekontrakte edilen damarlardaki Y27632'nin (10^{-8} - 3×10^{-4} M) doz-cevap eğrisi (n:4-6)

Tablo 4: Fenilefrin ile prekontrakte edilen damarlardaki Y27632 (10^{-8} - 3×10^{-4} M) gevşeme cevabı. $P < 0.05$, * kontrole göre.

	Kontrol	Uvabain
EC ₅₀	5.78±0.02	6.21±0.02 *
E _{max}	113.4±1.55	123.20±1.28 *



Şekil 5B: FE (10^{-5} M) ile prekontrakte edilen damarlardaki Y27632'nin (10^{-8} - 3×10^{-4} M) doz-cevap eğrisi (n:5)

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, kronik uvabain uygulaması ile hipertansiyon oluşturulmuş sıçanların izole damarlarında, spesifik bir Rhokinaz inhibitörü olan Y27632'nin etkinliğini ve Rho/Rhokinaz yolağının uvabain aracıklı hipertansiyonda rolünün olup olmadığını inceledik.

Çalışmamızda gerek KCl'e ait kasılma cevapları gerekse KCl ile prekontrakte edilen dokularda ROCK inhibitörü Y27632 gevşeme cevapları, kontrol ve uvabain uygulanan gruplar arasında önemli bir değişiklik oluşturmamıştır.

Diğer taraftan hem FE ile oluşturulan kasılma cevaplarında hem de FE ile prekontrakte edilen dokulardaki Y27632'ye ait gevşeme cevaplarında kontrol ve uvabainle hipertansif yapılmış gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir. Y27632 inkübasyonu, uvabain ile hipertansif yapılmış sıçanların aortlarındaki FE kasılmalarında kontrol grubuna göre daha yüksek oranda inhibisyon oluşturmuştur. Benzer şekilde FE ile prekontrakte edilen dokulardaki Y27632'ye ait gevşeme cevapları uvabain ile hipertansif yapılmış sıçanların dokularında daha yüksek bulunmuştur.

İnsan esansiyel hipertansiyonunda olduğu gibi çeşitli deneysel hipertansiyon modellerinde de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATP}^{\text{az}}$ inhibitörü uvabain miktarlarının arttığı gözlenmiştir^{71,72,73}. Uvabainin kronik uygulanmasıyla oluşturulan hipertansiyon, $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATP}^{\text{az}}$ inhibisyonu ile ilgilidir²⁶. Bu enzim vasküler tonus ve kan basıncının kontrolü için gerekli olan Na homeostazı ve membran potansiyelinin sağlanmasında rol oynar. Bu pompanın aktivitesindeki değişikliklerin hipertansiyon oluşmasına aracılık edebileceği ileri sürülmüştür⁶⁹. Bununla birlikte sadece bu pompanın inhibisyonu dışında uvabainin hipertansif etkisinden sorumlu başka

mekanizmalar da olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. İlave olarak renin-anjiyotensin sisteminin aktivasyonu ile sempatik aktivitenin artması, arteriyel baroreseptör mekanizmanın bozulması ve kontraktıl ajanların cevaplılığındaki değişimler uvabain uygulanması ile oluşturulan hipertansiyona aracılık edebilir²⁶.

Uvabainin nanomolar konsantrasyonlarda FE kontraktıl cevaplarını artırmıştır⁸. Uvabainin mikromolar konsantrasyonda uygulanması, vasküler düz kaslardaki direkt etkisiyle ve/veya adrenerjik sinir ucundan noradrenalin salınmasıyla kasılma oluşturmuştur. Buna karşılık uzun süreli uvabain uygulamasını takiben bazı vasküler yataklarda FE etkinliğinin azaldığı gözlenmiştir⁹. Rossoni ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada sıçanlara kronik uvabain uygulaması sonucu oluşturulan hipertansiyonda FE kontraktıl cevaplarının izole torasik aort ve süperior mezenterik arterde azaldığı gösterilmiştir⁷⁴. Bu bulgular bizim uvabain ile hipertansif yapılmış sıçan aortlarında elde ettiğimiz bulgular ile aynıdır. Rossoni ve arkadaşları bu değişikliğin Na^+/K^+ aktivitesindeki değişimler ve Na^+/K^+ ATPaz'ın ekspresyonlarındaki artış veya endotelial faktörlerin salınımı ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bunu destekleyen ve sıçan izole kuyruk vasküler yatağında yapılan çalışmada uvabain (10nM) uygulamasından sonra, kümülatif FE (0,5-10 μ M) uygulamasının ortalama perfüzyon basıncını kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Bu cevaplılığın endoteli çıkartılmış arterlerde anlamlı olarak arttığı bulunmuştur⁷⁶. Daha sonraki çalışmalar, akut uvabain uygulamasının, endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör, prostosiklin ve NO gibi endotel kaynaklı vazodilatör maddelerin salınımına neden olduğunu gösterilmiştir⁸. Bu faktörlerin hepsi FE kontraktıl cevapların azalmasına neden olabilir. Benzer sonuçlar uvabain ile oluşturulan hipertansiyonda endotelial ve nöronal NOS kaynaklı NO salınımını ve endotelial hiperpolarize edici faktörün salınımının artışı ile de gösterilmiştir⁸.

Y27632'nin FE kontraktil cevaplarında oluşturduğu azalma farklı doku ve farklı maddeler ile oluşturulan hipertansiyon modellerinde de gösterilmiştir. Örneğin, sıçan intrapulmoner düz kaslarında yapılan bir çalışmada ROCK inhibitörü Y27632'nin asetilkolin aracılıklı kontraktil cevapları da azalttığı gösterilmiştir⁶³. İnsan umbilikal arterinde yapılan bir çalışmada fasudil ve Y-27632 prekontrakte edilmiş dokularda gevşeme oluşturmuş, ve agonist'in oluşturduğu kasılmayı inhibe etmiştir^{64,65}. Ark ve arkadaşlarının sıçan renal arterlerinde yaptıkları bir çalışmada uvabain ile oluşturulan kasılma cevapları Y27632 ve diğer bir Rhokinaz inhibitörü olan fasudil tarafından inhibe edilmiştir²⁸. Jin ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise anjiotensin II uygulanarak hipertansif yapılan sıçanların aortlarında da Y27632 sonrası FE kasılma cevaplarında azalma görülmüştür. Aynı çalışmada endoteli çıkartılmış sıçan torasik aortunda Y27632'nin konsantrasyon bağımlı gevşeme cevapları incelenmiştir. Gevşeme cevaplarının endotelden bağımsız olduğu gözlenmiştir⁷⁵.

Gerek bizim bulgularımız gerekse diğer çalışmalar kronik uvabain uygulaması ile hipertansiyon oluşturulmuş sıçanların aortlarında Rhokinaz aktivasyonunun artmış olabileceğini düşündürmektedir. Ancak rock aktivasyonunda gözlenen bu artış agonist aracılıklı (FE) cevaplarla sınırlı olduğu görülmektedir. Uvabainin rock aktivasyonu üzerindeki bu etkisini hangi mekanizma(lar) ile oluşturduğu bu tez kapsamındaki çalışmalarda incelenmemiştir. Son yıllardaki çalışmalar uvabainin sadece Na pompasını inhibe etmediğini bunun dışında farklı sinyalleme yollarını da uyarabildiğini göstermiştir. Bu farklı sinyal ileti yollarının uvabain aracılı pek çok etkiden ve özellikle de hipertansiyon da önemli olabilecek düz kas poliferasyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Yapılan alışmalar uvabain aracıklı rock aktivasyonunun, olası olarak uvabain-sodyum pompası-sinyal ileti sistemleri etkileşiminin sonucunda gerçekleşebileceğini dűřündürmektedir. Rho-kinaz inhibitörleri fasudil ve Y-27632 ile yapılan pek çok çalışmada dokularda gevşeme oluşturduğu gösterilmiştir, ancak uvabain-rock aktivasyonu arasındaki ilişkinin ortaya konulabilmesi için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmalarımızın sonunda elde ettiğimiz bulgular uvabain aracıklı hipertansiyonun mekanizmasında rock aktivasyonunun önemli bir mekanizma olduğunu ortaya koymasının yanında rock inhibitörleri için yeni bir klinik uygulama alanının olabileceğini de dűřündürmektedir.

Yeni doğan sıçanlar üzerinde yapılan diğer bir çalışmada akciğer hipertansiyonunda ROCK aktivasyonunun önemli rolü olduğu ve Rock inhibitörü olan fasudil ve Y27632'nin tedavide kullanılabileceği gösterilmiřtir⁷⁷. Buradan hareketle Uvabain ile hipertansif yapılmış hayvanlarda gözlenen rock inhibitörlerine olan duyarlılık artışı, endojen uvabain düzeylerinin yükseldiği esansiyel hipertansiyon tedavisinde rock inhibitörleri için önemli bir endikasyon olabilir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada kronik uvabain uygulaması ile hipertansiyon oluşturulmuş sıçanların izole damarlarında, spesifik bir Rhokinaz inhibitörü olan Y27632'nin etkinliğini ve Rho/Rhokinaz yolağının uvabain aracılı hipertansiyonda rolünün olup olmadığını inceledik. Çalışmalarımızın sonunda elde ettiğimiz bulgular uvabain aracılı hipertansiyonun mekanizmasında rock aktivasyonunun önemli bir mekanizma olduğunu ortaya koymasının yanında rock inhibitörleri için yeni bir klinik uygulama alanının olabileceğini de ima etmektedir.

Uvabain ile hipertansif yapılmış hayvanlarda gözlenen rock inhibitörlerine olan bu duyarlılık artışı, endojen uvabain düzeylerinin yükseldiği esansiyel hipertansiyon tedavisinde rock inhibitörleri için önemli bir endikasyon olabilir.

6. ÖZET

Yapılan çalışmalar, kronik uvabain uygulaması ile oluşturulan hipertansiyonun Na-K-ATPazın inhibisyonu ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Agonistler tarafından (5HT, fenilefrin vb.) ve KCl tarafından oluşturulan düz kas kasılması MHZK'ın Ca^{+2} bağımlı aktivasyonuna ve Ca^{+2} den bağımsız Rho-Rhokinaz yolağını aktive eder. İzole dokularda rho-rhokinaz farmakolojik manipasyonu Y27632, fasudil gibi ajanlar kullanılarak yapılmıştır.

Bu çalışmada uvabain ile oluşturulan hipertansiyonda sıçan torasik aortunda, Y27632 kullanılarak Rho/ Rho kinaz yolağının rolünün olup olmadığı inceledik. Öncelikle Y27632 inkübasyonu öncesi ve sonrası KCl ve Fe kasılma yanıtlarına ve ikici olarak da KCl ve Fe ile önkastırma yaptığımız dokularda Y27632 gevşeme yanıtlarına baktık. Kontrol ve uvabain ile hipertansiyon oluşturulmuş ratlarda KCl EC_{50} değerleri değişmezken, E_{max} değerleri anlamlı olarak artmıştır. Y27632 inkübasyonu sonrası KCl EC_{50} değeri hem kontrol hemde uvabain ile hipertansiyon oluşturulmuş ratlarda anlamlı olarak artmıştır. Uvabain ile hipertansiyon oluşturulmuş ratlarda E_{max} değerleri Y27632 inkübasyonu sonrası anlamlı olarak artmıştır. Fe kontraktıl EC_{50} cevapları Y27632 inkübasyonu sonrası anlamlı olarak artmıştır.

Bu sonuçlar; uvabain ile indüklenmiş hipertansiyonda, aortta ROCK aktivasyonunun bu hipertansiyon modelinde rolünün olabileceğini göstermektedir.

7. SUMMARY

Several studies have shown that chronic administration of ouabain induces hypertension, an effect that seems to be linked to the inhibition of the Na⁺-K⁺-ATPase. The smooth muscle contractions by agonists (e.g., 5-HT, phenylephrine) and KCl involve the Ca⁺²-dependent activation of myosin light chain kinase, and Ca⁺² independent rho/rho kinase pathways. Pharmacological manipulation of rho/rho kinase pathway in isolated tissue can be achieved by using fasudil or Y-27632 that inhibits its effector rho-kinase.

In this study, our aims are to investigate the role of rho/rho kinase pathways by Y-27632 in ouabain induced hypertension rat thoracic aorta. For these reason we were evaluated firstly, KCl and phenylephrine-induced contractions before and after Y27632 incubations and secondly Y27623 relaxation responses on precontracted arteries with KCl or phenylephrine. Between control and oubain-induced hypertension rat, KCl EC₅₀ value was not change, but Emax value was significantly increased. After Y27623 incubation KCl EC₅₀ value was significantly increase both control and oubain-induced hypertension rat groups. Oubain-induced hypertension rat Emax value was significantly reduced after Y27632 incubation. Phenylephrine contractile response EC₅₀ value was significantly reduced after Y27632 incubation. Also, After Y27632 incubation Emax value of control and oubain-induced hypertension groups was reduced as before Y27632. Y23632 relaxation responses EC₅₀ value was significantly decreased KCl-precontracted arteries as a control group, but significantly increased both EC₅₀ and Emax value in phenylephrine-precontracted arteries.

These results suggest that oubain induced hypertension in aorta, ROCK activation may have a role in this hypertension model.

9. KAYNAKLAR

1. Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, Ducharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludens JH. Identification and characterization of a uvabain-like compound from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 6259–6263.
2. Somlyo AP and Somlyo AV. Ca^{+2} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003;83:1325-1358.
3. Gottlieb SS, Rogowski A, Weinberg M, Krichten CM, Hamilton BP, Hamlyn JM. Elevated concentrations of endogenous uvabain in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1992; 86: 420–425
4. Manunta P, Messaggio E, Ballabeni C, Sciarrone MT, Lanzani C, Ferrandi M, Hamlyn JM, Cusi D, Galletti F, Bianchi G. Plasma uvabain-like factor during acute and chronic changes in sodium balance in essential hypertension. *Hypertension*.2001; 38:198–203
5. Rosoni LV, Xavier FE, Moreira CM, Falcochio D, Amanso AM, Tanoue CU, Carvalho CRO, Vassallo DV. Uvabain-induced hypertension enhances left ventricular contractility in rats. *Life Sciences* 2006;79:1537-1545.
6. Manunta P, Stella P, Rivera R, Ciurlino D, Cusi D, Ferrandi M, Hamlyn JM, Bianchi G. Left ventricular mass, stroke volume, and

uvabain-like factor, in essential hypertension. *Hypertension* 1999;34:450-456

7. Ferrandi M, Barassi P, Molinari I, Torielli L, Tripodi G, Minotti G, Minotti E, Bianchi G, Ferrari P. Uvabain Antagonists as Antihypertensive Agents. *Current Pharmaceutical Design* 2005;11, 3301-3305
8. Rossoni LV, Cunha V, Franca A, Vassallo DV. The influence of nanomolar uvabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol*1999; 34: 887–892
9. Marin J, Sanchez-Ferrer CF, Salaices M. Effects of uvabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. *Br. J. Pharmacol* 1988; 93:43–52
10. Ark M, Kubat H, Beydagi H, Ergenoglu T, Songu-Mize E. Involvement of rho kinase in the uvabain-induced contractions of the rat renal arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Feb 10;340(2):417-21. Epub 2005 Dec 15.
11. Saunder R, Scheiner-Bobis G. Uvabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. *Eur. J. Biochem* 2004;271: 1054-1062
12. Mita M, Yanaguhara H, Hishinuma S, Saito M, Walsh MP. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. *Biochem. J* 2002;364:431–440, 2002.

13. Sakurada S, Takuwa N, Sugimoto N, Wang Y, Seto M, Sasaki Y, Takuwa Y. Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ. Res* 2003;93:548–556
14. Somlyo AP, Somlyo AV. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta Physiol. Scand.* 1998;164:437–448
15. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J., Maekawa M., Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997; 389:990–994
16. Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, Kaibuchi K and Takeshita A (2001) Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB J* 2001;15:1062-1064.
17. Seko T, Ito M, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Onishi K, Isaka N, Hartshorne DJ and Nakano T. Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res* 2003;92:411-418
18. Moriki N, Ito M, Seko T, Kureishi Y, Okamoto R, Nakakuki T, Kongo M, Isaka N, Kaibuchi K and Nakano T. RhoA activation in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2004;27:263-270

19. Ying Z, Jin L, Dorrance AM and Webb RC. Increased expression of mRNA for regulator of G protein signaling domain-containing Rho guanine nucleotide exchange factors in aorta from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2004;17:981-985.
20. Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S and Takeshita A. Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension* 2001; 38:1307-1310
21. Riento K and Ridley AJ. ROCKs: Multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Review Mol. Cell Biol.* 2003;4:446-456
22. Leung T, Chen XQ, Manser E and Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* 1996;16:5313-5327
23. Wang H, Eto M, Steers WD, Somlyo AP and Somlyo AV. RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization in erectile function. *J Biol Chem* 2002;277:30614-30621
24. Wibberley A, Chen Z, Hu E, Hieble JP and Westfall TD. Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2003;138:757-766
25. Amano M, Fukata Y, Kaubuchi K. Regulation and Functions of Rho-Associated Kinase. *Experimental Cell Research* 2000;261:44-51

26. Kimura K, Manunta P, Hamilton BP, Hamlyn JM. Different effects of in vivo uvabain and digoxin on renal artery function and blood pressure in rat. *Hypertension Research*. 2000;23: 67-76
27. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: structure, regulation and function, *Mol. Cell. Biochem.*2004; 259, (1–2), 197–209
28. Ark M, Kubat H, Beydağı H, Ergenoğlu T, Songu-Mize E. Involvement of rho kinase in the ouabain-induced contractions of the rat renal arteries. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;340:417-421
29. Haddy FJ. Role of ouabain-like humoral agent and the sodium-potassium pump in low-renin hypertension. In: Villarreal,H., Sambhi, MP(Eds.), *Topics in Pathophysiology of Hypertension*. Martinus Nyhoff Publishers. Boston 1984:223-238
30. Finta KM, Fischer MJ, Lee L, Gordon D, Pitt B, Webb RC: Ramipril prevents impaired endothelium-dependent relaxation in arteries from rabbits fed on atherogenic diet. *Atherosclerosis* 1993; 100:149-56
31. Torun E, Bayram F. Endokrin Bir Organ Olarak Endotel Ve Endotelinin Hipertansiyondaki Rolü. *Erciyes Tıp Dergisi*.2004;26:126-131

32. Schiffrin EL, Deng LY, Sventek P, Day R. Enhanced expression of endothelin-1 gene in endothelium of resistance arteries in severe human essential hypertension. *J Hypertens.* 1997;15:57-63.
33. Kayaalp, O. *Tıbbi Farmakoloji.* 10. Ankara: Hacettepe-Taş;2002:429-430
34. Vinkrant S, Tiwari, SC. Essential Hypertension- Pathogenesis and Pathophysiology. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine* 2001;2:141-159
35. Elliott P, Stamler J, Nichols R, et al. Intersalt revisited: further analyses of 24 hour sodium excretion and blood pressure within and across population. Intersalt Cooperative Research Group. *Bone Miner J.* 1996;312:1249-1253
36. Yamori Y, Nara Y, Mizushima S, et al. International cooperative study on the relationship between dietary factors and blood pressure: a report from Cardiovascular Diseases and Alimentary Comparison (CARDIAC) Study. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;16:43-47
37. Haddy F.J., Pamnani M.B. Role of dietary salt in hypertension. *Journal of American Collage of Nutrition* 1995;14:428-438
38. Meneton P, Jeunemaitre X, De Wardener HE, MacGregor GA., Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiol Rev* 2005;85:679-715

39. Weinberger MH, Salt sensitivity of blood pressure in humans. *Hypertension* 1996;27:481-490
40. Fujita T, Henry WL, Bartter FC, et al. Factors influencing blood pressure in salt-sensitive patients with hypertension. *Am J Med*, 1980;69:334-344
41. Haddy, J.F. Rol of dietary salt in hypertension. *Life Science* 2006;79:1585-1592
42. Hamlyn JM, Manunta P, Hamilton BP. Endogenous ouabain in the pathogenesis of hypertension and cardiovascular disorders, In: Laragh JH, Brenner BM(Eds.), *Hypertension, Pathophysiology, Diagnosis and Mannagement*, 2nd ed. Raven Pres, New York 1995:1077-1081
43. Pamnani M, Huot S, Buggy J, Clough D, Haddy FJ. Demonstration of a humoral inhibitor of the Na⁺ - K⁺ pump in some models of experimental hypertension. *Hypertension* 1981;3:96-101
44. Huang S.B, Leenen H.H.F. Brain 'Uvabain' and Desensitization of Arterial Baroreflex by High Sodium in Dal Salt-Sensitive Rats. *Hypertension* 1995;25:372-376
45. Schoner W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroidhormones. *Eur J Biochem* 2002;269:2440-2448.

46. Wasserstrom J.A, Aistrup G.L. Digitalis: new actions for an old drug,.American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 2005;289:1781-1793
47. Murrel J.R, Randall D, Rosoff J, Zhao J, Jensen R.V, Gullans S.R, Hauptert G.T. Endogen Uvabain Upregulation of Steroidogenic Genes in Hypertensive Hypothalamus but Not Adrenal. Circulation 2005;112:1301-1308
48. Iwamoto T, Kita S, Katsuragi T. Salt- Sensitive Hypertension, Na⁺/Ca²⁺ Exchanger, and Vascular Smooth Muscle. TMC 2005; 15: 273-277
49. Li S-Q, Eim C, Kirch U, Lang RE, Schoner W. Bovine Adrenals and Hypothalamus are a Major Source of proscillaridin A- and Uvabain-immunoreactivities. Life Sciences 1998;62:1023-1033
50. Aperia A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. Journal of Internal Medicine 2007;261: 44-52.
51. Manunta P, Hamilton J, Rogowski AC, Hamilton BP, Hamlyn JM. Chronic hypertension induced by Uvabain but not digoxin in the rat: antihypertensive effect of digoxin and digitoxin. Hypertens 2000;23:77-85
52. Huang S.B, Leenen H.H.F. Brain Renin-Angiotensin System and Uvabain-Induced Sympathetic Hyperactivity and Hypertension in Wistar Rats. Hypertension 1999;34:107-112

53. Huang S.B, Leenen H.H.F. Brain 'Uvabain' and Angiotensin II in Salt-Aensitive Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. Hypertension 1996;28:1005-1012
54. Xie Z, Cai T. Na- K- ATP ase- Mediated Signal Transduction: From Protein Interaction to Cellular Function. Molecular Interventions 2003;3:157-168
55. Dostanic-Larson I, Van Huysse J.W, Lorenz J.N, Lingrel J.B. The high conserved cardiac glycoside binding site of Na- K- ATP ase plays a role in blood pressure regulation. PNAS 2005;102: 15845-15850
56. Wettschureck N, Offermans S. Mammalian G Proteins and their cell type specific functions. Physiol Rev 2005;1159-1204
57. Küçükkaya B, Kan B. Heterotimetrik Gproteinleri. Türk Biyokimya Dergisi 2007;32:39-50
58. Ark M, Kubat H, Yılmaz N. Küçük GTP Bağlayıcı Proteinler. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2003;2:161-168
59. Fukata Y, Amano M, Kaubuchi K. Rho- Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskelatal reorganization of non-muscle cells. TRENDS in Pharmacological Science 2001;22:32-39
60. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. Nature 1994;372:231-236

61. Casey PJ, Seabre MC. Protein prenyl transferases J. Biol. Chem.1996;271:5289-5292
62. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol. 2006; 290: 661-668,
63. Chiba Y, Takeyama H, Sakai H, Misawa M. Effects of Y-37632 on acetylcholine-induced contraction of intact and permeabilized intrapulmonary bronchial smooth muscles in rats. European Journal of Pharmacology 2001;427:77-82
64. Ark M, Ozveren E, Yazıcı G, Korkmaz B, Buyukafsar K, Arıkan O, Kubat H, Songu-Mize E. Effects of HA-1077 and Y-27632, two rho-kinase inhibitors, in the human umbilical artery, Cell Biochem. Biophys. 2004;41 (3): 331–342
65. Buyukafsar K, Levent A, Ark M. Expression of Rho-kinase and its functional role in the contractile activity of the mouse vas deferens, Br. J. Pharmacol. 2003;140: 743–749
66. Liao JK, Seto M, Noma K. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors. J. Cardiovasc. Pharmacol 2007;50:17-24
67. Satoh S, Kreutz R, Wilm C, Ganten D, Pfitzer G. Augmented agonist-induced Ca^{+2} sensitization of coronary artery contraction in genetically-hypertensive rats. Evidence for altered signal transduction in the coronary smooth muscle. J. Clin. Invest.1994;94:1397-1403

68. Demiryürek S, Kara AF, Çelik A, Tarakçıoğlu M, Bağcı C, Demiryürek AT. Effects of Y-27632, a selective Rho-kinase inhibitor, on myocardial preconditioning in anesthetized rats. *Biochem. Pharmacol.* 2005;69:49-58
69. Mari'n J and Redondo J. Vascular sodium pump: endothelial modulation and alterations in some pathologic conditions. *Pharmacol Ther* 1999;84:249-271
70. Cargnelli G, Trevisi L, Debetto P, Luciani S, and Bova S. Effect of long-term ouabain treatment on contractile responses of rat aortae. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;35: 538–542
71. Go'mez-Sa'nchez EP, Foecking MF, Sellers D, Blankenships MS, and Go'mez-Sa'nchez CE. Is the circulating-like compound ouabain? *Am J Hypertens*1994; 7: 647–650.
72. Hamlyn JM, Hamilton BP, and Manunta P. Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis. *J Hypertens* 1996;14: 151–171
73. Hamlyn JM, Ringel R, Schaeffer J, Levinson PD, Hamilton BP, Kowarski AA, and Blaustein MP. A circulating inhibitor of (Na-K) ATPase associated with essential hypertension. *Nature* 1982;300: 650–652
74. Rossoni LV, Salaces M, Mari'n J, Vassallo DV, and Alonso MJ. Alterations on vascular reactivity to phenylephrine and Na₊,K₊-

ATPase activity and expression in hypertension induced by chronic administration of ouabain. *Br J Pharmacol* 2002;135: 771–781.

75. Jin L, Ying Z, Hilgers RHP, Yin J, Zhao X, Iming JD, Webb C. Increased RhoA/Rho-Kinase Signaling Mediates Spontaneous Tone in Aorta From Angiotensin II-Induced Hypertensive Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006;318:288-295
76. Rossoni LV, Dos Santos L, Barker LA, Vassallob DV. Ouabain changes arterial blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine in L-NAME-induced hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41(1):105-106.
77. McNamara PJ, Murthy P, Kantores C, Teixeira L, Engelberts D, Vliet T, Kavanagh BP, Jankov RP. Acute vasodilator effects of Rho-kinase inhibitors in neonatal rats with pulmonary hypertension unresponsive to nitric oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294:205-213

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Ayşegül
Soyadı Demirtaş
Doğum Yeri ve Tarihi Konya- Ereğli 15.01.1982

Eğitimi

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2000-2005
Konya Meram Fen Lisesi 1997-2000
Ereğli Anadolu Lisesi 1993-1997
Abdurrahim İlk Öğretim Okulu 1888-1993

Yabancı Dili

İngilizce