

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

**SİGARA DUMANI MARUZİYETİNİN FARE  
UTERUSUNDAKİ RHO/RHO-KİNAZ SİNYAL YOLAĞINA  
ETKİSİ**

**Lale EŞBERK**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ TEZLİ  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK**

**ADANA-2016**

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

**SİGARA DUMANI MARUZİYETİNİN FARE UTERUSUNDAKİ  
RHO/RHO-KİNAZ SİNYAL YOLAĞINA ETKİSİ**

**Lale EŞBERK**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ TEZLİ  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK**

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından  
TF2006YL3 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

**ADANA-2016**

## KABUL ve ONAY

Ç.Ü.TIBBİ FARMAKOLOJİ Anabilim Dalı

TEZLİ Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

“SIGARA DUMANI MARUZİYETİNİN FARE UTERUSUNDAKİ RHO/RHOKINAZ SINYAL YOLAĞINA  
ETKİSİ”

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 02 / 11 / 2016

TEZ SINAV JÜRİSİ

  
PROF. Dr. ERGİN ŞİNGİRİK  
ÇUKUROVA Üniversitesi  
Başkan

  
DOÇ. Dr. PEYMAN ERTUĞ  
ÇUKUROVA Üniversitesi  
Üye

  
YRD. DOÇ. Dr. AKİF HAKAN KURT  
SÜTÇÜ İMAM Üniversitesi  
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve  
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımız için gerekli bilimsel ortamı sağlayan tez yöneticisi ve bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Ergin ŐINGİRİK'e, Doç.Dr. Peyman ERTUĞ'a, Halil Mahir KAPLAN'a, ayrıca emeği geçmiő tüm teknik ve idari personele yardımları ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından, TF2006YL3 no'lu proje olarak desteklenmiştir.



# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÖZET</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Sigara Dumanı.....	3
2.2. Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağı.....	4
2.2.1. Rho proteinleri.....	4
2.2.2. Rho-kinaz.....	7
2.3. Düz kas ile Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağı ilişkisi.....	11
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	15
3.1. Sigara Duman Düzenağı.....	15
3.1.1. Kullanılan kimyasal ajanlar.....	16
3.2. ELISA deneyleri.....	17
3.2.1. Homojenizasyon.....	17
3.2.2. Protein miktar tayini.....	17
3.2.3. ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Testi.....	17
3.2.3.1. ELİSA RhoA Enzim Miktar Tayini.....	17
3.2.3.2. ELİSA Rho-Kinaz Enzim Miktar Tayini.....	18
3.2.3.3. ELİSA Rho-Kinaz Enzim Aktivite Testi.....	18
3.4. Sonuqların değerlendirilmesi.....	18
<b>4. BULGULAR</b> .....	19
4.1. ELİSA RhoA Miktar Tayini.....	19
4.2. ELİSA Rho-kinaz Enzim Miktar Tayini.....	19
4.3. ELİSA Rho-kinaz Enzim Aktivite Tayini.....	20
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	21
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	24

<b>KAYNAKLAR</b> .....	25
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	32



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:	Sayfa No:
Şekil 1. Rho aktivitesinin düzenlenmesi. PKN; protein kinaz N.....	5
Şekil 2. Kontraktıl stimülasyon ve Ca <sup>2+</sup> sensitizasyonu. PKC; protein kinaz C, PKN; protein kinaz N, ILK; integrin-bağlı kinaz, CPI-17; 17kDa protein kinaz C-potentiated inhibitory protein of type 1 of protein fosfataz, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ; sitozolik Ca <sup>2+</sup> konsantrasyonu, DAG; diasilgliserol, RhoK; Rho-kinaz, MYPT-1; miyozin hedef alt ünite, MLCP; miyozin hafif zincir fosfataz. ....	6
Şekil 3. Rho-kinaz ve düzenlenmesi. PH; plekstrin homoloji bölgesi, RB; Rho bağlayıcı bölge, AA; araşidonik asit, GTP-Rho; Rho'nun aktif formu. ....	8
Şekil 4. Düz kas kasılmasının regülasyonu. ZIPK; zipper-interactig protein kinaz, DMPK; miyotonik distrofi protein kinaz, PAK; p21-aktivated protein kinaz , PKC; protein kinaz C, PKN; protein kinaz N, ILK; integrin-bağlı kinaz, CPI-17; 17kDa protein kinaz C-potentiated inhibitory protein of type 1 of protein fosfataz, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ; sitozolik Ca <sup>2+</sup> konsantrasyonu, DAG; diasilgliserol, GPCRs; G protein-bağlı reseptörler, IP3; inozitol-1,4,5- trisfosfat, MLC20; 20-kDa regülatör miyozin hafif zincir, MLCK; Ca <sup>2+</sup> -kalmodülin-bağlı miyozin hafif zincir kinaz, MLCP; miyozin hafif zincir fosfataz, MYPT1; miyozin fosfataz hedef alt ünite, M20; 20-kDa MLCP'nin katalitik olmayan alt ünitesi, PI3K-C2α; sınıf 2 fosfatidilinozitol 3-kinaz'ın α izoformu, PLC; fosfolipaz C, PP1c; katalitik alt ünite 1 protein fosfataz, RhoGEF; GDP-GTP değiştirici faktör, RhoK; Rho-kinaz'ın ROCKI ve ROCK II izoformu . ....	11
Şekil 5. Duman Uygulama Düzenegi.....	16
Şekil 6. Sigara dumanı uygulanan farelerin uterusundaki rhoA protein miktarına etkisi (n=8). İstatistiksel analiz: Student t test. (* : Kontrole göre P<0.05).....	19
Şekil 7. Sigara dumanı uygulanan farelerin uterusundaki rho-kinaz enzim miktarına etkisi (n=8). İstatistiksel analiz: Student t test. (* : Kontrole göre P<0.05).....	20
Şekil 8. Sigara dumanı uygulanan farelerin uterusundaki rho-kinaz enzim ektivitesine etkisi (n=8). İstatistiksel analiz: Student t test. (* : Kontrole göre P<0.05).....	20

# ÇİZELGELER DİZİNİ

**Tablo No:**

**Sayfa No:**

**Tablo 1.** Rho kinaz substratları..... 9



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>HMG-KoA</b>	: 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A
<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b>eNOS</b>	: Endotelyal nitrik oksid sentaz
<b>iNOS</b>	: İndüklenebilir nitrik oksid sentaz
<b>nNOS</b>	: Nöronal nitrik oksid sentaz
<b>ROCK2</b>	: Rho-kinaz enzim izofromu
<b>YDL</b>	: Yüksek dansiteli lipoprotein
<b>DDL</b>	: Düşük dansiteli lipoprotein
<b>Ç-DDL</b>	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
<b>GTP</b>	: Guanozin trifosfat
<b>GDP</b>	: Guanozin difosfat
<b>KCl</b>	: Potasyum klorür
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>COX</b>	: Siklooksijenaz
<b>GAPs</b>	: GTPaz aktive edici proteinler
<b>GDI</b>	: GTPaz ayırıcı inhibitörler
<b>GEF</b>	: Guanin nükleotid değiştirici faktör
<b>ZIPK</b>	: Zipper-interacting protein kinaz
<b>DMPK</b>	: Miyotonik distrofi protein kinaz
<b>PAK</b>	: p21-aktivated protein kinaz
<b>PKC</b>	: Protein kinaz C
<b>PKN</b>	: Protein kinaz N
<b>ILK</b>	: İntegrin-bağlı kinaz
<b>CPI-17</b>	: 17kDa protein kinaz C-potentiated inhibitory protein of type 1 of protein fosfataz
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	: Sitozolik Ca <sup>2+</sup> konsantrasyonu
<b>DAG</b>	: Diasilgliserol
<b>GPCRs</b>	: G protein-kenetli reseptörler
<b>IP3</b>	: İnozitol-1.4.5- trisfosfat
<b>MLC20</b>	: 20-kDa regülatör miyozin hafif zincir

<b>MLCK</b>	: Miyozin hafif zincir kinaz
<b>MLCP</b>	: Miyozin hafif zincir fosfataz
<b>MYPT1</b>	: Miyozin fosfataz hedef alt ünite
<b>M20</b>	: MLCP'nin 20-kDa katalitik olmayan alt ünitesi
<b>PI3K-C2<math>\alpha</math></b>	: Sınıf 2 fosfatidilinozitol 3-kinaz'ın $\alpha$ isoformu
<b>PLC</b>	: Fosfolipaz C
<b>PP1c</b>	: Tip 1 protein fosfatazın katalitik alt ünitesi
<b>RhoGEF</b>	: GDP-GTP değiştirici faktör
<b>NO</b>	: Nitrik oksid
<b>cGMP</b>	: Siklik guanozinmonofosfat
<b>p-MYPT</b>	: Fosforillenmiş miyozin fosfataz hedef alt ünite
<b>MBS</b>	: Miyozin bağlayıcı alt ünite

## ÖZET

### Sigara Dumanı Maruziyetinin Fare Uterusundaki Rho/Rho-Kinaz Sinyal Yolağına Etkisi

Sigara dumanı maruziyeti akciğerleri kardiyovasküler sistemi ve vücutta birçok doku ve organı olumsuz yönde etkilemekte ve bu dokulardan en çok akciğer etkilenmektedir. Rho/rho-kinaz sinyal yolağı uterus düz kas hücrelerinin kontraktilitesinde önemli rol oynamaktadır. Sigara kullanımına bağlı olumsuz etkilerin mekanizmaları moleküler düzeyde yeterince aydınlatılmamıştır. Şimdiki çalışmada sigara dumanı maruziyetinin uterusu Rho/rho-kinaz sinyalizasyon yolağına etkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, 8 haftalık dişi fareler (Swiss albino) duman uygulanan ve kontrol olarak 2 gruba ayrılacaktır. Dumanlı gruba 2 ay boyunca haftada 7 gün sigara dumanı uygulaması yapıldı. Bu sürenin sonunda uygulama yapılan fareler servikal dislokasyon ile öldürüldü ve uterusları alınarak bu dokulardaki rhoA proteini ve rho-kinaz enziminin aktivitesi incelendi. Sigara dumanı maruziyeti rhoA ve rho-kinaz enziminin upregülasyonuna neden olurken rho-kinaz enziminin aktivitesini artırdı. Sonuç olarak sigara dumanı uterusu rho/rho-kinaz sinyal yolağının aktivitesini artırmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Sigara dumanı, rhoA, rho-kinaz, uterus, fare

## **ABSTRACT**

### **Effect Of Cigarette Smoke Exposure On Rho/Rho-Kinase Signalization Pathway In Mouse Uterus**

**Cigarette smoke exposure has side effects lungs, cardiovascular systems and some tissue and organs and most affected organs is lungs. Rho/rho-kinase signalization pathway has important role on uterus smooth muscle contractions. Mechanism of molecular of some side effects due to cigarette smoke exposure has not yet been clearly identified. In the present study we aimed to research effect of cigarette smoke exposure on rho/rho-kinase signalization pathway in uterus. For this propose mice (female age: 8 weeks) separated into two groups as control and smoke exposed. The cigarette smoke application continued 7 days in a week during two mouths. In the end of two mounts, Mice were killed by cervical dislocation and their uterus was isolated. Then rhoA and rho-kinase enzymes expression and rho-kinase enzyme activity have been determined. Cigarette smoke exposure unregulated rhoA and rho-Kinase enzyme expression and elevated rho-kinase enzyme activity. As a result cigarette smoke elevated activity of rho/rho-kinase signalization pathway.**

**Key words: Cigarette smoke, rhoA, rho-kinase, uterus, mice**

# 1. GİRİŞ

Sigara kullanımı tüm dünyada bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Sigara dumanında 7000'den fazla kimyasal bulunmaktadır<sup>1,2</sup>. Sigara kullanımı temel bir halk sağlığı sorunu olduğu gibi global ve bireysel anlamda da topluma yük getirmektedir<sup>3,4</sup>. Kronik obstruktif akciğer hastalığı ve koroner kalp hastalıkları başta olmak üzere sebep olduğu bir çok sağlık sorunları da ülkelerin sağlık sistemlerine ekonomik anlamda da ciddi yük getirmektedir. İnsan doku ve organlarının hemen hepsinde sigaranın yol açtığı olumsuz etkileri araştıran ve belirleyen sayısız makale bulunmaktadır.<sup>5-9</sup>,. Sigara kullanımının zararlı etkileri arasında insan vücudunda görülen kanserlerin etyolojisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir<sup>11-17</sup>. Sigara kullanımının insanda en az 13 çeşit kansere yol açtığı belirlenmiştir<sup>18-19</sup>. Bunlar arasında en önemlileri akciğer, mesane, orafarengeal ve larenks (gırtlak) ve mide kanserleri sayılabilir.<sup>20-22</sup>

Sigaranın kanser biyolojisindeki rolünü araştıran çok sayıda makale vardır. Sigarada bulunan 7000'den fazla kimyasalın 60 kadarının karsinojenik olduğu gösterilmiştir<sup>14-21</sup>. Sigaranın gaz bileşenleri akciğerde esas hasara yol açarken oluşan partiküller dağıldığı dokularda kanserojen etkiden sorumludurlar. Sigara içeriğindeki bileşenler hücre metabolizmasındaki pekçok yolağı etkileyerek kanser oluşumuna katkıda bulunmaktadır. İmmün sistemde yol açtıkları defektler, araşidonik asit metabolizması ürünlerindeki değişiklikler ile enflamatuvar cevabın değiştirilmesi, mitokondrial değişiklikler, antioksidanların etkilenmesi, apoptozisin kısıtlanması, EDRF, VEGF üzerinden anjiogenezin modülasyonu, onkojenlerin aktivasyonu ve tümör supresör genlerin dolaylı inhibisyonu gibi pekçok hücre içi iletişim sisteminin etkilenmesi ve DNA hasarı ile kanser oluşumu tetiklenmektedir<sup>23-26</sup>. Ayrıca sigara dumanındaki benzopirenenler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar ligand olarak arilhidrokarbon reseptörlerine bağlanarak CYP450 enzimlerinin ekspresyonunu artırır. Bu enzimler ile multidrug rezistans ilişkili proteinler ve protoonkogenlerin aktivasyonuna yol açarak potensiyel klonal kanser kök hücrelerinin çoğalmasına ve tümör büyümesine yol açmaktadır<sup>27</sup>.

Sigara dumanının Beta-1 ve Beta-2 Adrenerjik reseptörler aracılığıyla araşidonik asit kaskatını aktive ettiği bilinmektedir. Bu sayede oluşan COX2, 5-lipooksijenaz (5-

LOX) ve matriks metalleproteinazlar (MMK) aracılığıyla hücre içi sinyallerinde modülasyonlar ve COX-2 aracılıklı araşidonik asit metabolitleri olan eikosanoitlerin oluşumu ile hem enflamatuar cevapta azalma hem de DNA hasarına yol açan öncü değişiklikler oluşmaktadır<sup>28-29</sup>. Ayrıca diğer bir eikosanoit olan 5-LOX aktivitesi de proenflamatuar değişikliklere ve DNA hasarına yol açmaktadır. Enflamatuar cevapların değişmesi ile insan doku ve organlarında oluşan değişiklikler çeşitli hastalık durumlarının altta yatan sebeysel ilişkilerine ve kanser gelişimine zemin hazırlayabilmektedir.

Sigara kullanımının üreme sağlığı üzerine negatif etkileri olduğu bilinmektedir. Sigara kullanımı ile gebeliklerde erken doğum eylemi, düşük doğum ağırlıklı bebek, erken membran rüptürü ile doğumun başlaması, plasental ablasyon gibi olumsuz gebelik sonuçlanmaları arasındaki ilişki pekçok epidemiyolojik çalışma ile de gösterilmiştir<sup>29-30,31</sup>.

Sigara kullanımı ile doğurganlığın olumsuz etkilendiğine ait veriler de mevcuttur. Sigara kullanımının infertiliteyi artırdığı ve In Vitro Fertilizasyon (IVF) başarısını azalttığına dair ikna edici düzeyde literatür bilgisi bulunmaktadır.<sup>32-36</sup> IVF’de oluşan embriyoların uterusu implantasyonunda sigara kullanımı ile birlikte bir azalma olduğu gösterilmiştir<sup>37</sup>. Sigara kullanımının insan üreme fizyolojisi üzerindeki negatif etkilerinin altta yatan sebepleri yeterince açıklanamamıştır. İnsan üreme fizyolojisinde sigara dumanının etkilerini araştıran araştırmalar kısıtlıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sigara Dumanı

Sigara genel bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Sigara bağımlılığı bugün için dünyadaki en yaygın bağımlılıktır ve her yıl dünya üzerinde yaklaşık 300 milyon kişi sigara ve ilişkili hastalıklar nedeniyle hastaneye yatmak zorunda kalmaktadırlar. Sigara dumanında hidrokarbonlar, alkoller, fenoller, aldehidler, ketonlar, alkaloidler, asitler ve ağır metaller gibi çok çeşitli kimyasal sınıflara ait 4000 çeşidin üzerinde kimyasal bileşik bulunmaktadır<sup>1,4,17</sup>. Sigara dumanının zararlı içeriğinin en önemli bileşeni nikotindir. Nikotinin absorbe edildikten sonra yarılanma ömrü kısadır ve hızlıca metabolize edilerek kotinin'e dönüşür. Nikotinin yarılanma ömrü yaklaşık 180 dakika iken kotininin yarılanma ömrü ise çok daha uzundur ve yaklaşık 1300 dakika kadardır<sup>35-36</sup>. Nikotin bir alkaloid olup tütünün psikoaktif maddesidir ve bağımlılığın oluşmasına yol açan ana komponentidir. Nikotin nikotidik reseptörlere çok yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Nikotidik reseptörler çok çeşitli organ ve dokularda bulunurlar ve bu nedenle farmakolojik etkileri çeşitli ve karmaşıktır. 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<sup>37-40</sup>. Sigara içimi sırasında çok sayıda serbest radikal ve reaktif oksijen ürünleri açığa çıkmaktadır<sup>41-44</sup>.

Nikotinin kolesterol sentezini artırdığı ve lipoprotein metabolizmasını etkileyerek ateroskleroza yol açtığı gösterilmiştir<sup>45</sup>. Sigaranın içinde ağır metallerden toksik olan kadmiyum da bulunur. Sigara dumanının içerisinde bulunan kadmiyumun uzun süreli maruziyeti bu metalin karaciğerde birikmesine neden olmaktadır. Kadmiyum hepatositlerin apoptozisini indüklemektedir<sup>46-47</sup>. Bu nedenle sigara dumanının uzun süre solunması karaciğer dokusunun yapısını bozmaktadır. Sıçanlarda yapılan çalışmalar sigara dumanının karaciğer hücrelerinde lipid tanecikleri oluşmasına ve sinüzoidlerde genişleme ve düzensizliklere neden olduğu gösterilmiştir<sup>48</sup>.

Sigara dumanı akciğer ve diğer organlarda kanser gelişimi için büyük bir risk faktörüdür. Sigara dumanı maruziyeti dolaşım sistemine semikinon ve p-benzosemikinon gibi suda çözünebilir oksidantların dolaşım sistemine geçmesiyle proteinlerde, lipidlerde ve DNA'da oksidatif hasara neden olur. Artan oksidatif stres

hücreyi kanser gelişimine götürür<sup>49</sup>. Sigara dumanı reaktif oksijen ürünlerini arttırarak mitokondrinin işlevlerini bozar. Bununla birlikte ısı şok proteinleri ve bazı inflamatuvar ajanların gen transkripsiyonlarının artmasına neden olur<sup>45</sup>. Ayrıca artan oksidatif stres rhoA ve fokal adhezyon kinazın aktivitesini azaltarak endotelium duvarının fonksiyonunu bozar<sup>46</sup>. Artan oksidatif stres ve antioksidan sistemlerin bozulmasıyla reaktif oksijen ürünleri nitrikoksit'in inaktivasyonu sonucu endotelial disfonkiyona neden olur. Oluşan reaktif oksijen ürünleri eNOS/NO yolağını bloke ederek endotel hücrelerinin fonksiyonunu bozar<sup>47</sup>. Sigara dumanı vasoproliferatif ajanlar olan endotelin ve vasküler endotelial büyüme faktörü gibi mediyatörlerin artmasına neden olmaktadır<sup>48</sup>.

## **2.2. Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağı**

### **2.2.1. Rho proteinleri**

Rho proteinleri monomerik GTP'azların Ras süperfamilyasının Rho subfamilyası üyeleridir. Rho geni ilk olarak 1985'de bir deniz salyangozu olan *Aplysia*'dan bir Ras homoloğu olarak klonlanmış ve bunu kısa süre sonra üç insan homoloğu RhoA, RhoB, RhoC'nin bulunması izlemiştir<sup>67</sup>.

Küçük molekül ağırlıklı GTP bağlayıcı proteinler, 20-40 kDA'lık monomerik G proteinleridir. Memeli Rho ailesi en az 10 farklı üyeden oluşur. Bunlar: Rho izoformları olan RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoG; Rac izoformları olan Rac1, Rac2; Cdc42 izoformu ve TC10 izoformudur<sup>68</sup>.

RhoA, RhoB ve RhoC'nin efektör bölgeleri aynı aminoasit dizilimine sahiptirler ve bu GTP'az proteinlerin hücrel fonksiyonları benzerdir. Rho'nun açıklanan bir çok fonksiyonu RhoA ile yapılan çalışmalara dayanmaktadır<sup>69</sup>. RhoA, vücutta en fazla bulunan ve en çok çalışılan bir Rho proteini alt tipidir<sup>70,71</sup>.

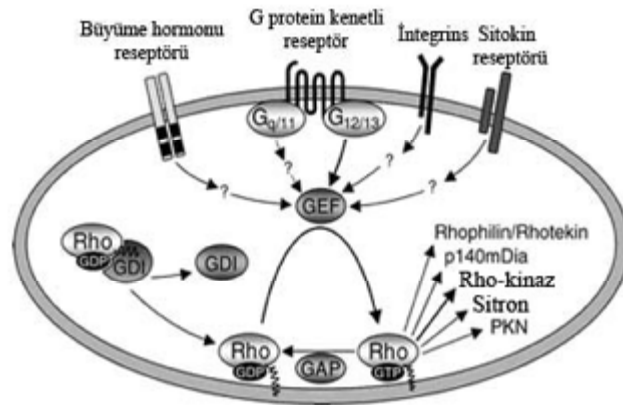
Küçük G proteinleri olan Rho alt tipleri GDP, GTP, GTP'az aktivitesi ve efektörleri ile etkileşmekten sorumlu aminoasit dizilimine sahiptirler. Sentezlendikten sonra lipidler ile posttranslasyonel değişikliklere gereksinim duyarlar. Bu lipid yapıları genellikle, palmitoil (P), farnesil (F) ve geranilgeranil'dir (GG). Küçük G proteinlerinin lipid modifikasyonu, bunların aktivitelerini yerine getirebilmeleri için gereklidir<sup>72</sup>. Rho'nun aktive olabilmesi için geranilgeranile olmuş C-terminal ucu ile membrana

tutunması gerekir. Guanin nükleotid değişiminden sonra, Rho; Rho-kinaz (ROCK), protein kinaz N, rhophilin, rhotekin, citron, p140 mDia ve fosfolipaz D gibi alt efektörlerini aktive eder<sup>73</sup>.

Küçük G proteinlerinin GDP-bağlı inaktif ve GTP-bağlı aktif olmak üzere birbirine dönüşebilen iki formu vardır. Bu dönüşüm üç grup protein tarafından düzenlenir (Şekil 2). Bunlar:

1. GTPaz aktive edici proteinler (GAPs, Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini artırarak GTP bağlı Rho'nun inaktivasyonunu kolaylaştırır).
2. GTPaz ayırıcı inhibitörler (GDIs, bazı Rho ailesi GTPazlarının membrana bağlanmalarını inhibe eder. Nükleotid ayrılmasını ve böylece aktivasyonunu önler).
3. Guanin nükleotid değiştirici faktör(GEF, inaktifGDP-Rho'yu aktif GTP-Rho'ya
4. Dönüştürür)<sup>74-75</sup>.

Rho aktivitesi aynı zamanda çok sayıda G proteini ile kenetli reseptörler tarafından da düzenlenebilir<sup>76</sup>.



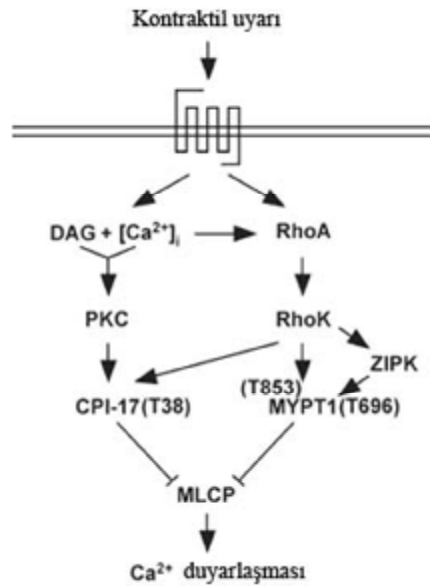
Şekil 1. Rho aktivitesinin düzenlenmesi<sup>77</sup>. PKN; protein kinaz N

İstirahat halindeki hücrelerde, Rho-GDP disosiyasyon inhibitörü (Rho GDI), GDP-Rho'ya bağlanır ve GDP-Rho'nun membrandan sitozole geçmesini sağlar. Hücreler bazı agonistlerle stimüle edildiğinde, GDP-Rho GTP-Rho'ya dönüşür. Bu

dönüşüm GTP-GDP değişim reaksiyonunu stimüle eden guanin nükleotid değişim faktörünün (GEFler) aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir<sup>79</sup>.

GTP-Rho, daha sonra geranil geranillenmiş C terminal kuyruğu aracılığı ile hücre membranına yönlendirilir ve spesifik hedefleriyle etkileşir. GTPaz aktive edici proteinler (GAPs) negatif regülatörler olarak görev yaparlar. Bu proteinler Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini azaltarak Rho'yu inaktif hali olan Rho-GDP'ye dönüştürürler. Rho heterotrimetrik G proteinleri ile kenetli olan reseptörlerin bazı agonistler tarafından uyarılması sonucu bir takım fonksiyonlar görülür<sup>78</sup>.

Rho proteinleri agonist stimülasyonu ile indüklenen  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasından sorumludur ve miyozin fosfataz aktivitesini inhibe ederek fonksiyon gösterir (Şekil 2)<sup>80</sup>. Ayrıca, Rho/Rho-kinaz yolu stres liflerinin oluşumu, trombosit agregasyonu, lenfosit ve fibroblast adezyonu, sitokinez ve hücre migrasyonu, düz kas kasılması, aktin hücre iskeleti reorganizasyonu, hücre şekil değişikliği, proliferasyon ve hipertrofi gibi hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli göreve sahiptir<sup>59-62</sup>.

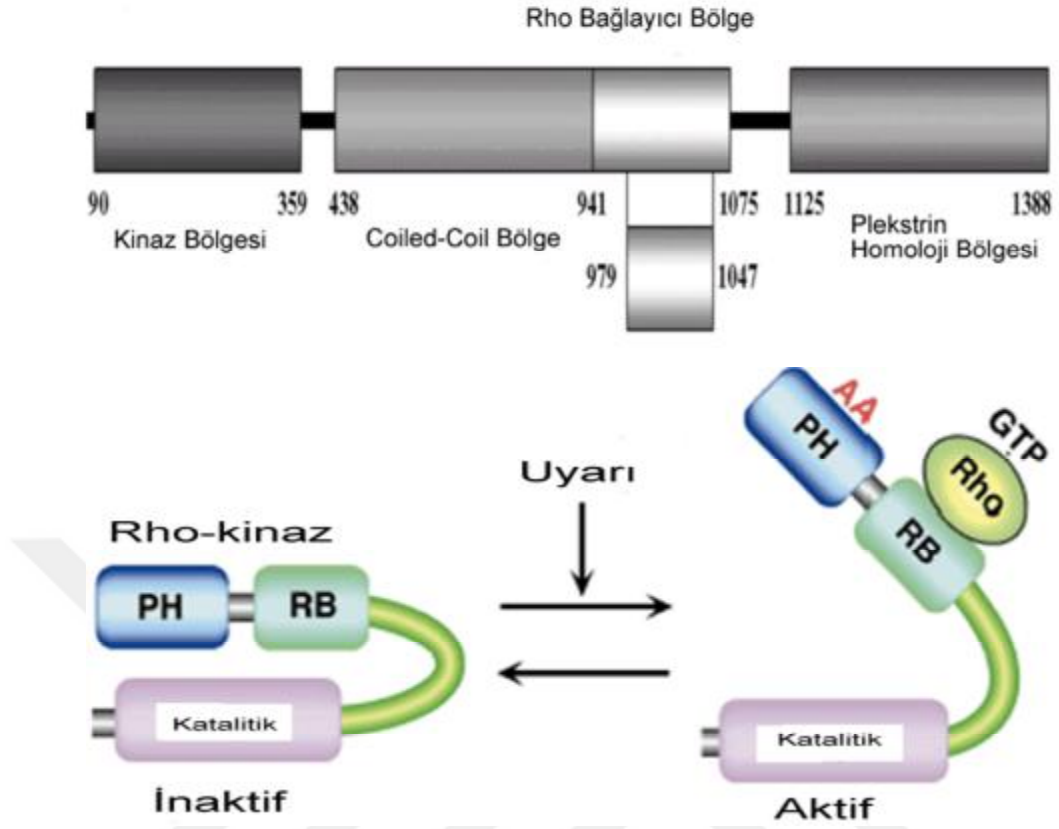


**Şekil 2.** Kontraktıl stimülasyon ve  $Ca^{2+}$  sensitizasyonu<sup>79</sup>. PKC; protein kinaz C, PKN; protein kinaz N, ILK; integrin-bağlı kinaz, CPI-17; 17kDa protein kinaz C-potentiated inhibitory protein of type 1 of protein fosfataz,  $[Ca^{2+}]_i$ ; sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu, DAG; diasilgliserol, RhoK; Rho-kinaz, MYPT-1; miyozin hedef alt ünite, MLCP; miyozin hafif zincir fosfataz.

### 2.2.2. Rho-kinaz

Rho-kinaz yaklaşık 1388 aminoasit dizisinden oluşur. Bu dizide, amino (N) ve karboksil (C) uçları bulunmaktadır. Rho kinaz, aynı zamanda, ROCK $\alpha$  veya ROCK2 olarak isimlendirilir. ROCK $\beta$  (aynı zamanda ROCK1 olarak da bilinir) Rho kinazın bir izoformudur<sup>60,69</sup>. İnsanda ROCK1 ve ROCK2 genleri sırasıyla 18. kromozom (18q11.1) ve 2. kromozomda (2p24) yer almaktadır<sup>91</sup>. Rho-kinaz enziminin vasküler düz kas hücrelerinde Ca<sup>2+</sup> duyarlılığında rol aldığı bildirilmiştir<sup>62</sup>. ROCK2'nin beyin ve kalpte, ROCK1'in akciğer karaciğer, dalak, böbrek ve testiste daha fazla ekprese edildiği bildirilmiştir. Rho-kinaz enziminin hemen hemen her dokuda varlığı gösterilmiştir<sup>60,69,80,81,82</sup>.

Rho kinazın N-terminalinde kinaz bölgesi vardır. Orta bölgesinde kuramsal olarak kangal gibi kıvrılmış (coiled-coil) bölge ve C-terminal bölgesinde plekstrin homoloji bölgesi bulunur (Şekil 3). Aktive olmuş Rho, Rho-kinazın kangal gibi kıvrılmış bölgesinin C-terminal parçasıyla etkileşerek kinaz bölgesini aktive eder<sup>83</sup>. Bu olay sonucu aktive olan Rho-kinaz aşağıda, tablo I'de, gösterilmiş olan substratları fosforile ederek çeşitli hücre içi olaylara katkıda bulunur<sup>79,84-88</sup>.



**Şekil 3.**Rho-kinaz ve düzenlenmesi. PH; plekstrin homoloji bölgesi, RB; Rho bağlayıcı bölge, AA; araşidonik asit, GTP-Rho; Rho'nun aktif formu.

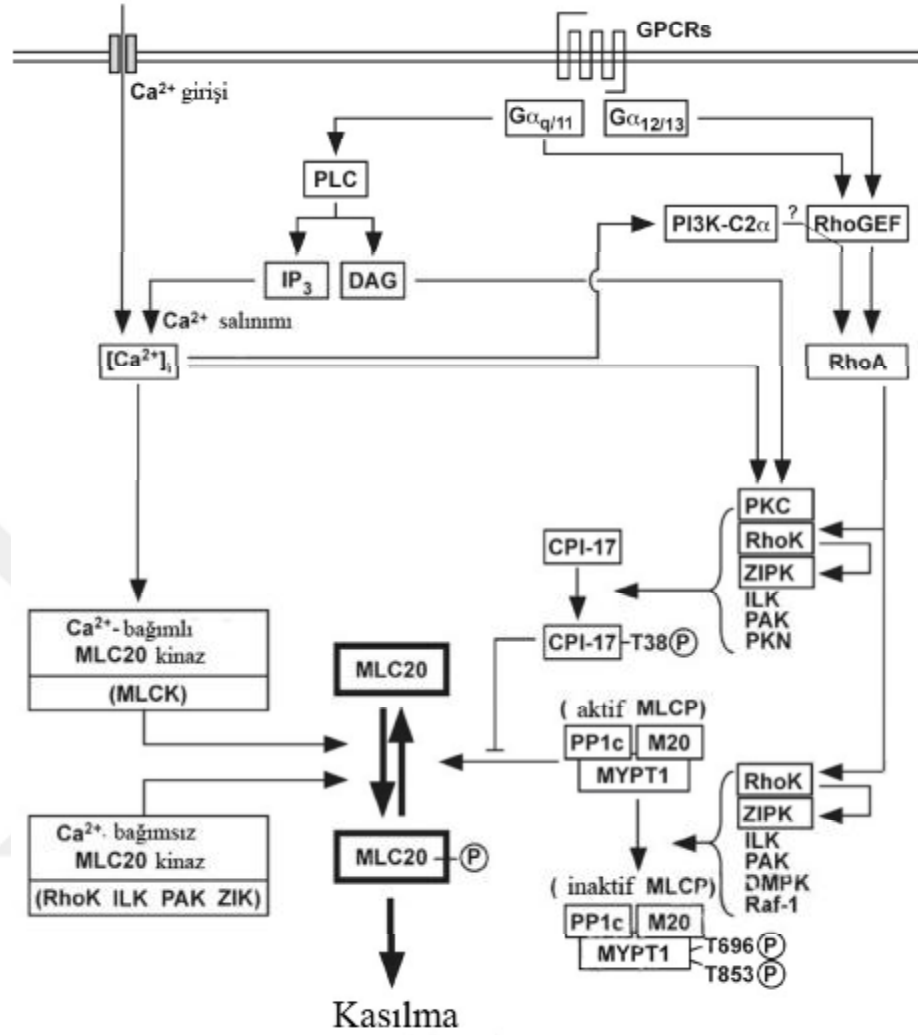
**Tablo 1.**Rho kinaz substratları

<b>Substratlar</b>	<b>Fonksiyonları</b>	<b>Hüresel Yanıtlar</b>
Miyozin fosfatazın miyozin bağlayıcı alt ünitesi	Miyozin fosfatazın inhibisyonu	Düz kas kasılmasında $Ca^{2+}$ duyarlaşması
Miyozin hafif zinciri	Miyozinin F-aktine bağlanmasında artış	Stres lifleri oluşumu, fokal adezyon oluşumu, nörit retraksiyonu, hücre kasılması, hücre motilitesi
CPI-17 proteini	Miyozin fosfatazın inaktive edici aktivitesinin aktivasyonu	Düz kas kasılmasında $Ca^{2+}$ duyarlaşması
Kalponin	F-aktine bağlanmada azalma	Düz kas kasılmasında $Ca^{2+}$ duyarlaşması
Ezrin Radiksin Moesin (ERM)	Ezrin Radiksin Moesin aktivasyonu	Mikrovillus oluşumu
Addusin	F-aktine bağlanmada artış	Membranal olaylar (ruffling), hücre motilitesi
İntermediyer filamentler (GFAB, vimentin)	Flamentlerin dağılımı	Flamentlerin sitokinez için ayrılması
$Na^+/H^+$ değiştiricisi	Değiştirici aktivitenin aktivasyonu	Stres lifleri oluşumu
LIM kinaz	Kinaz aktivitesinde artış	Kofilinin fosforilasyonu
CRMP-2	---	Büyüme konisi kollapsı
ZİPK(zipper interacting kinaz)	Miyozin fosfatazın inhibisyonu	Düz kas kasılmasında $Ca^{2+}$ duyarlaşması

Vasküler düz kas hücrelerinin agonistle indüklenen kasılmasında Rho-kinazın bir substratı olan miyozin hafif zincirinin (MLC) fosforilasyon derecesi kasılma gücünün belirleyicisidir. MLC fosforilasyonun miktarı  $Ca^{2+}$ /kalmodulin bağımlı miyozin hafif zincir kinaz (MLCK) ve miyozin fosfataz (MYPT) arasındaki dengeye bağılıdır<sup>89</sup>. Miyozin fosfataz (MP) üç alt üiteden oluşur:

1. Miyozin bağlayan alt ünite (myosin binding subunit, MBS). Bu alt ünite miyozin fosfataz target, MYPT, olarak da bilinir,
2. 37 kDA tip 1 fosfataz katalitik alt ünite,
3. 20 kDA katalitik olmayan alt ünite.

Miyozin fosfataz, miyozin bağlayıcı alt ünite üzerinden fosforillenmiş miyozin hafif zincirine bağlanır ve onu defosforile eder. Rho kinaz MBS'i fosforile ederek miyozin fosfataz (MP)'i inhibe eder. Bu enzim MBS'i çeşitli bölgelerinden fosforile eder bunlardan treonin 696 (T696) ve treonin 853 (T853) major olan bölgelerdir ve T853'ü T696'dan üç kat daha fazla fosforile eder<sup>89</sup>. Rho kinaz aynı zamanda miyozin hafif zinciri (MLC)'ni de fosforile ederek kasılma işlemine katkıda bulunur<sup>84</sup>.



**Şekil 4.** Düz kas kasılmasının regülasyonu. ZIPK; zipper-interactig protein kinaz, DMPK; miyotonik distrofi protein kinaz, PAK; p21-aktivatad protein kinaz , PKC; protein kinaz C, PKN; protein kinaz N, ILK; integrin-bağlı kinaz, CPI-17; 17kDa protein kinaz C-potentiated inhibitory protein of type 1 of protein fosfataz, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; sitozolik Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonu, DAG; diasilgliserol, GPCRs; G protein-bağlı reseptörler, IP3; inozitol-1,4,5- trisfosfat, MLC20; 20-kDa regülatör miyozin hafif zincir, MLCK; Ca<sup>2+</sup>-kaldomodülün-bağumlu miyozin hafif zincir kinaz, MLCP; miyozin hafif zincir fosfataz, MYPT1; miyozin fosfataz hedef alt ünite, M20; 20-kDa MLCP'nin katalitik olmayan alt ünitesi, PI3K-C2α; sınıf 2 fosfatidilinozitol 3-kinaz'ın α izoformu, PLC; fosfolipaz C, PP1c; katalitik alt ünite 1 protein fosfataz, RhoGEF; GDP-GTP değiştirici faktör, RhoK; Rho-kinaz'ın ROCK I ve ROCK II izoformu<sup>79</sup>.

### 2.3. Düz kas ile Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağı ilişkisi

Trombin, anjiyotensin II, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve serotonin gibi çeşitli vazoaktif ajanlar düz kasta bulunan Rho/Rho-kinaz sinyal yolağını aktive ederler. Fasudil ile uzun süre tedavi sonucunda vasküler düz kas hücrelerinin kasılabilirliğini,

fibroblast proliferasyon ve migrasyonunu, inflamatuvar hücrelerin vasküler duvara göçü gibi kritik basamakların inhibe edilebileceği düşünülmektedir. Rho kinaz ile aracılık edilen sinyal yolağı vasküler hastalıkların patolojisinde büyük önem taşır<sup>62</sup>.

NO, cGMP bağımlı protein kinaz aracılığıyla damar düz kasında gevşeme oluşturur. Yapılan bir çalışmada rekombinat cGMP ile cGMP-bağımlı protein kinazın RhoA'yı fosforilleyerek inhibe ettiği gösterilmiştir. Sıçan aortasında yapılan bu çalışmada, bir Rho-kinaz inhibitörü olan Y-27632'nin endotelyumlu dokularda fenilefrin ile oluşturulan kasılmaları endotelyumsuz olanlara göre nispeten daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca sodyum nitroprusiyatın fenilefrinle indüklenen RhoA translokasyonunu geri çevirdiği bulunmuştur. Buna karşın, endoteli sağlam aorta ringlerinde, nitrik oksid sentaz inhibitörleri ve guanilat siklaz inhibitörleri varlığında, fenilefrin kasılmalarının Y-27632'ye verdiği gevşeme yanıtları küntleşmiştir<sup>90</sup>. Bütün bu bulgular, intakt sıçan aortasında, nitrik oksidin Rho-kinaz'ın kastırıcı etkinliği üzerinde inhibitör bir etkisi olduğunu telkin etmektedir.

Sıcaklık düşürülerek oluşturulan mikrotübül depolimerizasyonunun, Rho kinaz aktivasyonu aracılığıyla sıçan aortasında kasılmaları arttırdığı hücrel mikrotübül ağının veziküler transport, sinyal iletimi ve hücre bölünmesi gibi çeşitli hücrel olaylarda görev aldığı bildirilmiştir<sup>91</sup>.

RhoA ve mitojenle-aktive olan kinaz gibi intrasellüler sinyalizasyon yollarının, sfingozin 1-fosfat (SIP) ile aktive edildiği bulunmuştur. SIP, aktive olmuş trombositlerden salıverilen bir lipiddir. Vasküler düz kas hücre kültürlerinde SIP sinyalinin, hücre proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir<sup>92</sup>. Diğer taraftan Rho kinaz ile aracılık edilen  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasında sfingozil fosforilkolinin ayrı bir sinyal yolağı olduğu bildirilmiştir<sup>93</sup>.

Tavşan baziler arterinde yapılan bir çalışmada, Rho-kinaz enziminin selektif bir inhibitörü olan Y-27632 endotelin-1 ile indüklenen kasılmaları inhibe etmiştir<sup>62</sup>. Ek olarak Rho/Rho-kinaz yolağı sığır serebral arterindeki  $Ca^{2+}$  duyarlığından da sorumludur<sup>45</sup>. Rho kinaz enzimini ve kısmen protein kinazı da inhibe eden fasudilin in vivo olarak hayvanlara verildiğinde vazodilatör etki oluşturduğu gösterilmiştir. Bu ajan, günümüzde, serebral vazospazmın tedavisinde denenmektedir. Aynı zamanda, bu bileşik, izole vasküler düz kaslarda agonistle olan kasılmaları inhibe eder. Naguma ve ark. in vivo olarak uygulanan fasudilin Rho kinazı inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aynı

ekip yaptıkları çalışmada fasudilin saflaştırılmış Rho kinaz için güçlü bir in vitro inhibitör olduğunu göstermiştir<sup>94</sup>.

Aortokoroner ya da infrainguinal bypass ameliyatı yapılan hastalardan alınan safen veni in vitro ortamda arteriyel basınç koşullarında perfüze edildiğinde fenilefrin ve serotonine duyarlılığın arttığı görülmüştür. Bu duyarlılık Y-27632 ile önlenebilmiştir<sup>95</sup>.

Trombinin insan umbilikal veninde hızlı ve geçici bir RhoA aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Buna artmış miyozin hafif zincir fosforilasyonu, F-aktin stres lifleri oluşumu ve artan permeabilite eşlik etmiştir. Y-27632 ile Rho kinazın inhibisyonu, bütün bu etkileri belirgin olarak azaltmıştır<sup>96</sup>.

Bir bakteri toksini olan lipopolisakkaritin kastırıcı reseptörlerin sinyalizasyon yolağında bir etki yapacağı düşünülmüş ve Büyükafşar ve arkadaşları tarafından bu toksinle muamele edilen sıçanların mezenter arterinde ROCK2'nin kontrole göre daha fazla eksprese edildiği ve bu artışın endotelin-1 ile indüklenen vasokonstriksiyonun güçlenmesine aracılık edebileceği bildirilmiştir<sup>102</sup>.

Koroner bypass ameliyatı yapılan 15 hastadan izole edilen endoteli uzaklaştırılmış internal torasik arterlerde serotonin ve histamin ile oluşturulan kasılmalar hidroksifasudil ile belirgin olarak inhibe edilmiştir. Serotoninle indüklenen kasılmalar süresince MBS (miyozin fosfatazın miyozin bağlayıcı alt ünitesi) ve CPI-17 (C-kinaz ile aktive olan fosfataz inhibitörü) fosforilasyonu belirgin olarak artmıştır. Hidroksifasudil MBS fosforilasyonunu inhibe ederken CPI-17 fosforilasyonunu inhibe etmemiştir<sup>97</sup>.

Vasküler düz kas hücrelerinin medyadan subendotelyal bölgeye göçü (migrasyonu), balon anjiyoplasti ve ateroskleroz sonucu gelişen intimal kalınlaşmada önemli rol oynar. Aktive olmuş trombosit ve hücrelerin bir ürünü olan lizofosfatidik asid (LPA), düz kas hücre büyümesine ve çeşitli hücrelerin göçüne neden olur. LPA ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü aracılığıyla oluşan düz kas göçü Rho/Rho-kinaz aracılığıyla olmaktadır. Bununla birlikte söz konusu göçte Rho/Rho-kinazın farklı alt inici sinyal yolları yer almaktadır. LPA aracılı düz kas göçü MLC fosforilasyonu ile bağlantılı iken trombosit kaynaklı düz kas göçü MLC fosforilasyonundan bağımsız olarak bulunmuştur<sup>98</sup>.

Rho/Rho-kinaz yolağı bozuklukları sıklıkla ölüme neden olan hipertansiyon, vasküler spazm ve arteriyosklerozun patolojisinde yer almaktadır. Rho-kinaz

aktivitesini spesifik olarak inhibe eden problemlerin kullanılması bu patolojik durumların tedavisinde yararlı olacaktır. İlk olarak,  $Ca^{2+}$ -bağımlı kastırıcı mekanizmaları hedef alan  $Ca^{2+}$  kanal blokerlerine ek olarak, spesifik Rho-kinaz inhibitörleri ile Rho/Rho-kinaz yolağının modüle edilmesi düz kası gevşetmek için gelişmiş bir metod olabilir. İkincisi, birçok iskemik hastalık patogenezi ve vasküler bozuklukla bağlantılı olan ateroskleroz geri dönüşümlüdür ve Rho-kinaz inhibisyonu ile tedavi edilebilir<sup>69</sup>.

Korpus kavernozum düz kasının kasılmasında, Rho'nun  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasında rol aldığı gösterilmiştir. Wang ve ark. direk olarak permeabilize edilmiş tavşan ve insan korpus kavernozumunda  $Ca^{2+}$  duyarlaşmasını göstermişlerdir ve onu bu yolağın fazlaca eksprese edilen moleküler komponenti olarak belirlemişlerdir. Yapılan bir çalışmada Y-27632, fenilefrinle kastırılmış kavernozaal şeritleri doza bağımlı bir şekilde gevşetmiştir. Bu bulgular, kastrasyonu takiben Rho/Rho-kinaz yolağının korpus kavernozumda aktive olduğu ve testosteron kaybı sonucu erektil disfonksiyona katkıda bulunduğunu telkin etmektedir. Hem ROCK $\alpha$  (ROCK II) hem de ROCK $\beta$  izoformlarının korpus kavernozumda varlığı gösterilmiştir<sup>51</sup>. İn vivo sıçan modelinde bir Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632 korpus kavernozum basıncını artırmıştır, yani ereksiyona neden olmuştur<sup>100</sup>.

Yapılan bir başka çalışmada, Rho-kinaz enziminin fare vas deferensinde eksprese edildiği gösterilmiş ve bu enzimin inhibitörü olan Y-27632'nin erektil disfonksiyonun tedavisinde yararlı olabileceği bildirilmiştir<sup>82</sup>.

Diğer bir çalışmada, korpus kavernozumda NO aktivitesindeki artışın Rho-kinaz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Buna göre NO'nun erektil fonksiyonu kısmen Rho/Rho-kinaz aracılı  $Ca^{2+}$  duyarlılığını inhibe ederek sağladığı düşünülmektedir. Y-27632 ile tedavi edilen deney hayvanlarından elde edilen korpus kavernozum preparatları düşük voltajdaki elektriksel saha stimülasyonu ile potansiyalize edilmiş cevaplar oluşturmuştur<sup>52</sup>. Bu bulgular Rho/Rho-kinaz inhibisyonunun NO aktivitesini artırdığını gösterir. Ayrıca, diğer vasküler yatlardan elde edilen verilerle uyumlu olarak, sıçan korpus kavernozumunda da Rho-kinazın  $\alpha$ -adrenerjik ve endotelin-1 ile indüklenen kasılmalara aracılık ettiği gösterilmiştir<sup>101</sup>.

### 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 dişi fareler kullanıldı.

#### 3.1. Sigara Duman Düzeneği

Fareler 2 deney grubuna ayrıldı.

1. Kontrol (Dumansız, n=8)

2. Duman Uygulanan (n=8)

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 5). 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 hergün 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 mesane içinden alındı ve ELISA testinde kotinin miktarları tayin edilmek üzere -20°C'de saklandı.

Farelerin karın boşluğu açılarak uterus bir bütün olarak çıkarıldı. Çıkarılan doku Krebs solüsyonu bulunan petri içerisinde çevre dokulardan temizlendi ve kantitatif tayin deneylerinde kullanılmak üzere -20°C'de dondurularak eppendorf içinde saklandı.



**Şekil 5.**Duman Uygulama Düzeneği

### **3.1.1. Kullanılan kimyasal ajanlar**

Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF). Sığır serum albumini, THC Sigma firmasından temin edildi. Bioscience, bradford protein assay solüsyonu Biorad'dan, Ripa-buffer ELISA kitleri Calbiotech'ten temin edildi.

### **3.2. ELISA deneyleri**

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

#### **3.2.1. Homojenizasyon**

Eppendorf 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. Altta çökeltiler (pelletler) atıldı. Üstte ayrılan kısımlar (süpernatantlar) ELISA testlerinde kullanılmak üzere alındı.

#### **3.2.2. 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.

#### **3.2.3. ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Testi**

##### **3.2.3.1. ELİSA RhoA Enzim Miktar Tayini**

Homojenatlardan 100'er µl ELISA kuyucuklarına eklendi. Kuyucukların üstü alüminyum 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 rhoA miktarları tayin edildi.

### **3.2.3.2. ELİSA Rho-Kinaz 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 rho-kinaz enziminin miktarları tayin edildi.

### **3.2.3.3. ELİSA Rho-Kinaz Enzim Aktivite Testi**

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 rho-kinaz enziminin aktivitesi tayin edildi.

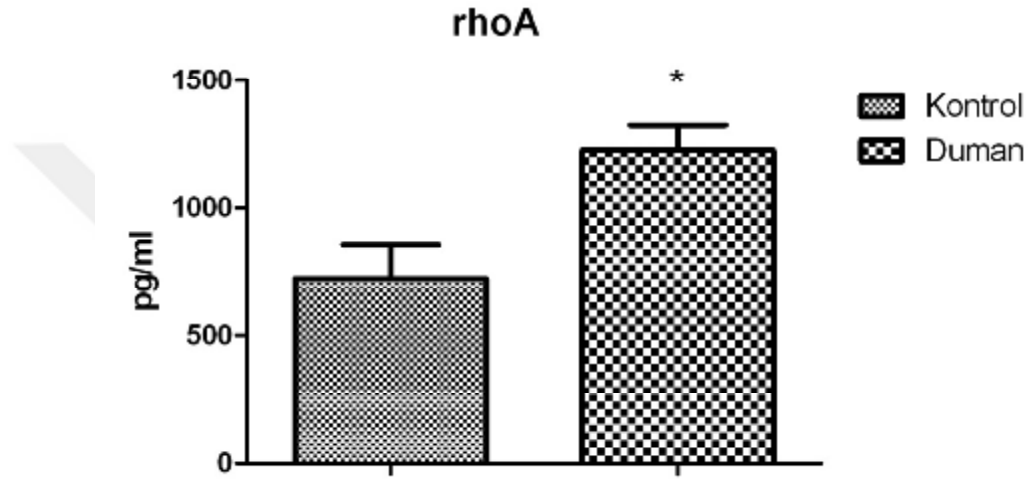
## **3.4. Sonuçların değerlendirilmesi**

Gruplar arasındaki farkı karşılaştırmak için student *t* testinden faydalanıldı. 0.05'den küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. ELİSA RhoA Miktar Tayini

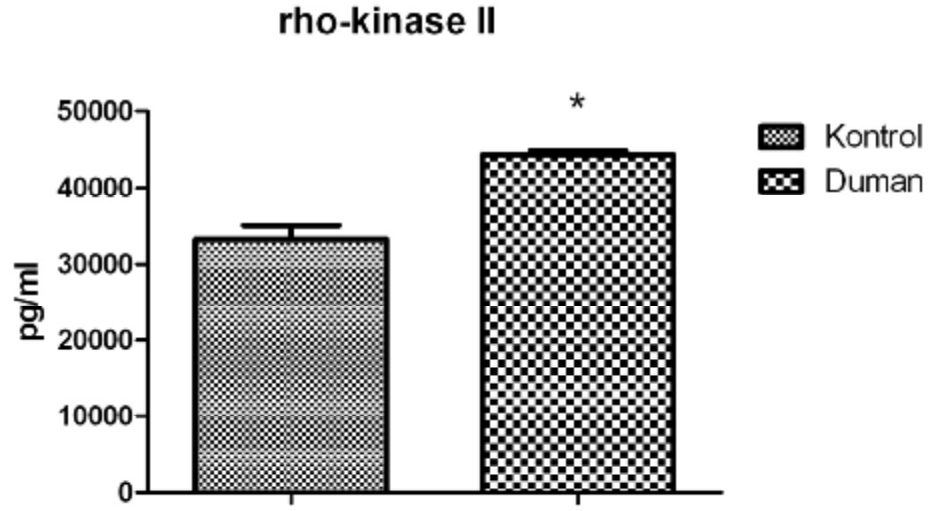
Farelerde sigara dumanı uygulaması uterusunda Rho-A proteinin ekspresyonunda artışa neden oldu(Şekil 6).



Şekil 6. Sigara dumanı uygulanan farelerin uterusundaki rhoA protein miktarına etkisi (n=8). İstatistiksel analiz: Student t test. (\* : Kontrole göre P<0.05).

### 4.2. ELİSA Rho-kinaz Enzim Miktar Tayini

Farelerde sigara dumanı uygulaması uterusunda Rho-kinaz enziminin ekspresyonunda artışa neden oldu (Şekil 7).



Şekil 7. Sigara dumanı uygulanan farelerin uterusundaki rho-kinaz enzim miktarına etkisi (n=8). İstatistiksel analiz: Student t test. (\* : Kontrole göre P<0.05).

### 4.3. ELİSA Rho-kinaz Enzim Aktivite Tayini

Farelerde sigara dumanı uygulaması uterusunda Rho-kinaz enziminin aktivitesinde artışa neden oldu (Şekil 8).



Şekil 8. Sigara dumanı uygulanan farelerin uterusundaki rho-kinaz enzim aktivitesine etkisi (n=8). İstatistiksel analiz: Student t test. (\* : Kontrole göre P<0.05).

## 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. Nikotinin absorbe edildikten sonra yarılanma ömrü kısadır ve hızlıca metabolize edilerek kotinine dönüşür. Kotininin yarılanma ömrü nikotinden daha uzundur.

Sigara dumanının insan dokuları üzerindeki etkilerine dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sigara kullanımının yol açtığı olumsuz etkiler arasında solunum yolları hastalıkları (Kronik obstrüktif akciğer Hastalığı) ilk sırada yer almaktadır<sup>120</sup>. Kardiyovasküler hastalıkların etyolojisinde de sigara önemli rol oynamaktadır. Sigara dumanında bulunan benzopirenler ve polisiklik aromatik hidrokarbonların DNA bütünlüğünü bozarak kanser oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir.<sup>101-104</sup> Sigara dumanında bulunan maddelerin zararlı etkileri daha pek çok dokuda karşımıza çıkmaktadır. Yapılan epidemiyolojik araştırmalar sigara ile ilişkili hastalıkların yukarıda sayılanlardan çok daha çeşitli ve yaygın olduğunu ortaya koymaktadır.<sup>105-107</sup>

Sigara kullanımının dokularda enflamatuar süreçleri aktive ettiği gösterilmiştir. Kanser dahil sigara dumanı maruziyetinin insanlarda enflamatuar süreçleri değiştirdiği ve bu değişen etkilerin hastalık süreçlerini artırdığı bilinen bir durumdur. Araşidonik asit metabolitlerinden olan siklooksijenaz yolağının kanser başlangıcında ve DNA hasarında rolü olduğu gözlenmiştir. Siklooksijenaz 2 (COX-2) indüklenebilir olan poliansatüre yağ asitlerini okside edebilen bir enzimdir. Araşidonik asitin oksidatif metabolizması ile önemli sinyal mekanizmalarında rolü olan prostaglandinler oluşabilmektedir. Öncelikle oluşan PGG<sub>2</sub> ve devamında PGH<sub>2</sub> pek çeşitli prostaglandinlere dönüşebilmektedirler ve bu PG'ler enflamasyonun regülasyonunda, ovülasyon oluşumunda, doğum eyleminin başlamasında dolaşım sisteminde ve pıhtılaşmada rol oynamaktadırlar. COX2 ekspresyonlarındaki değişiklikler hastalık süreçlerinde belirleyici roller oynayabilirler. Kanserli dokularda artmış COX2 aktivitesi daha agresif kanser progresyonu ile birliktelik gösterir.

Sigara kullanımının reproduktif çağıdaki kadınlarda üreme potansiyeli açısından negatif etkileri gösterilmiştir. Gebelik ve sigara kullanımının kötü gebelik sonlanmalarına yol açtığı bilinmektedir. Sigara kullanan annelerin bebeklerinde erken

doğum eylemi ve gebelikte erken su gelmesi gibi riskler daha yüksek olarak görülür. Ayrıca vaktinde oluşan doğumlarda bile sigaranın bebeğin doğum ağırlığının düşük kalmasına yol açtığı ve bebeklerin anne karnında gelişme geriliğine maruz kalabildiği bilinmektedir. Yardımcı üreme tekniklerinin uygulandığı hasta grubunda da sigara kullanan kadınlarda çeşitli olumsuzluklar daha sık olarak gözlenmektedir. Bu hastalarda kabaca IVF başarısının azaldığına dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Bu bulgular da göstermektedir ki sigara kullanımının kadın sağlığı ve üreme üzerine negatif etkileri bulunmaktadır. Üreme fizyolojisi ve gebelikte görülen bu negatif etkilerin altta yatan mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir ve bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda hücre içi haberleşme mekanizmalarından biri ve hücre proliferasyonu ve gelişiminde önemli rolü olan rhoA/rho-kinaz sinyal yolağına kronik sigara dumanı uygulamasının nasıl bir etki oluşturacağını araştırdık. Rho proteinlerinin açıklanan bir çok fonksiyonu RhoA ile yapılan çalışmalara dayanmaktadır<sup>10</sup>. RhoA, vücutta en fazla bulunan ve en çok çalışılan bir Rho proteini alt tipidir<sup>11-12</sup>. RhoA, G proteinleri ile kenetli olan reseptörlerin bazı agonistler tarafından uyarılması sonucu bir takım fonksiyonlar görür<sup>13</sup>. Rho-kinaz enzimini rhoA proteini aktive eder<sup>7-9</sup>. Aktive olan rho-kinaz hücre içi birçok faaliyete katılır. Sonuçlarımızda sigara dumanı maruziyeti uterusu rhoA proteininde upregülasyona neden olduğunu görülmüştür. İnvitro yapılan bir çalışmada sigara dumanı ekstraktı uygulanan farelerin hava yolu düz kas hücrelerinde rhoA'nın upregüle olduğu gösterilmiştir<sup>21</sup>. Bizim çalışmamızda sigara dumanı inhalasyon yoluyla verilmiştir. Yine bu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da rhoA proteini upregüle olmuştur. RhoA proteininin aktivitesindeki artışa sigara dumanında bulunan süper oksit radikalleri neden olmuş olabilir. Yapılan bir başka çalışmada süper oksit radikallerinin rhoA proteinin aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir<sup>102</sup>. Bu durum da bizim bulgularımızı desteklemektedir. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz diğer bir enzim olan rho-kinaz rhoA proteininin alt efektörüdür. Elde ettiğimiz sonuçlar sigara dumanı maruziyetinin rho-kinaz enziminin ekspresyonunda ve aktivitesinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda süper oksit radikallerinin rho-kinaz enziminin aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir<sup>103</sup>. Sigara dumanının içerisinde süper oksit radikallerinin dışında birçok etken madde vardır bu maddelerde süper oksit radikallerinin neden olduğu rho/rho-

kinaz sinyal yolağını aditif şekilde aktifleştirmiş olabilir. Sonuç olarak rho/rho-kinaz sinyal yolağının aktivasyonu uterus düz kasının kasılma mekanizmasını etkileyecektir. Ayrıca yapılan çalışmalarda bu yolaktaki aktivasyon artışının hücre ölümü olarak bilinen apoptozun başlamasına neden olduğu gösterilmiştir<sup>104-105</sup>. Yapılan çalışmalarda rho/rho-kinaz sinyal yolağının aktive olması kanser hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonunu artırdığı bildirilmiştir<sup>106-107</sup>. Sigara dumanı kanserin en büyük nedenlerinden biridir. Sonuç olarak çalışmamız sigara dumanı maruziyetinin rho/rho-kinaz sinyal yolağını aktive ettiğini göstermiştir. Sigara dumanı ile bu yolağın aktivasyonu uterus düz kasının kasılma mekanizmasını etkileyeceği için gebeliğin olması, gebelik sırasında ve doğum anında komplikasyonlara neden olacaktır.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

**Çalışmamızda** 8 haftalık balb/c albino türü dişi fareler kullanıldı.  
Fareler 2 deney grubuna ayrıldı.

1. Kontrol (Dumansız, n=8)
2. Duman Uygulanan (n=8)

Çalışmamızda hücre içi haberleşme mekanizmalarından biri ve hücre proliferasyonu ve gelişiminde önemli rolü olan rhoA/rho-kinaz sinyal yolağına kronik sigara dumanı uygulamasının nasıl bir etki oluşturacağını araştırdık.

Sonuçlarımızda sigara dumanı maruziyetinin uterusu rhoA proteininde upregülasyona neden olduğu görülmüştür. İnvitro yapılan bir çalışmada sigara dumanı ekstraktı uygulanan farelerin hava yolu düz kas hücrelerinde rhoA'nın upregüle olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda sigara dumanı inhalasyon yoluyla verilmiştir ve rhoA proteini upregüle olmuştur. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz diğer bir enzim olan rho-kinaz rhoA proteininin alt efektörüdür. Elde ettiğimiz sonuçlar sigara dumanı maruziyetinin rho-kinaz enziminin ekspresyonunda ve aktivitesinde artışa neden olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak çalışmamız sigara dumanı maruziyetinin rho/rho-kinaz sinyal yolağını aktive ettiğini göstermiştir. Sigara dumanı kanserin en büyük nedenlerinden biridir ve sigara dumanı ile bu yolağın aktivasyonu uterus düz kasının kasılma mekanizmasını etkileyeceği için gebeliğin olması, gebelik sırasında ve doğum anında komplikasyonlara neden olabileceğini düşündürmekte ve bu yolağın tam olarak aydınlatılması ve inhibasyonu için çalışmalara devam edilmesi önerilmektedir.

## 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, Seleci 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
36. ultrastructural study. *Atherosclerosis* **1987**; 63: 33-41.
37. **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.
38. **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.
39. **Cotran RS, Kumar V, Robbins SL.** Robbins Pathologic Basis of Disease. *Philadelphia, WB Saunders Comp*, **1994**: 473-476.
40. **Pittilo RM.** Cigarette smoking and endothelial injury: a review. *Adv Exp Med Biol* **1991**; 273: 61-78.
41. **Halliwell B.** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special referenceto atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* **1989**; 70: 737-757.
42. **Church DF, Pryor WA.** Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Healt Perspect* **1985**; 64: 111-126.
43. **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.
44. **Orrenius S, McConkey DJ, Nicotera P.** Role of calcium in toxic and programmed cell death. *Biol React Intermed* **1991**; 283: 419-425.
45. **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
46. **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
47. **Lu Q, Sakhatskyy 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.
48. **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

49. **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
50. **Besler HT, Coşkun T;** Uzun Zincirli Yağ Asitlerinin Kimyasal Özellikleri ve Sağlıkla Olan Etkileşimi. *Katkı Pediatri Dergisi*, Vol:28, Sayı:1; 5-20, 2006.
51. **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.
52. **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.
53. **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.
54. **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.
55. **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.
56. **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.
57. **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.
58. **Watkins, B. A.,** 1991. Importance of essential fatty acids and their derivatives in poultry. *J. Nutr.*,121:1475-1485.
59. **Molica F, Burger F, Thomas A, Staub C, Tailleux A, Staels B, Pelli G, Zimmer A, Cravatt B, Matter CM, Pacher S, Steffens S.** Endogenous cannabinoid receptor CB1 activation promotes vascular smooth-muscle cell proliferation and neointima formation. *J Lipid Res.* 2013 May;54(5):1360-8. doi: 10.1194/jlr.M035147. Epub 2013 Mar 11.
60. **Hillard CJ.** Endocannabinoids and vascular function. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Jul;294(1):27-32.
61. **Manitiu ML.** The endocannabinoid system and its role in the pathogenesis and treatment of cardiovascular disturbances in cirrhosis. *Acta Gastroenterol Belg.* 2013 Jun;76(2):195-9.
62. **Lake KD, Compton DR, Varga K, Martin BR and Kunos G** (1997) Cannabinoid induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB1-like cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 281:1030–1037.
63. **Niederhoffer N and Szabo B** (1999) Effect of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on sympathetic cardiovascular regulation. *Br J Pharmacol* 126:457– 466.

64. **Plane F, Holland M, Waldron GJ, Garland CJ and Boyle JP** (1997) Evidence that anandamide and EDHF act via different mechanisms in rat isolated mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 121:1509–1511.
65. **Randall MD, Alexander SPH, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, Kemp PA, McCulloch AI and Kendall DA** (1996) An endogenous cannabinoid as an endothelium- derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Comm* 229:114–120.
66. **Mills TM, Chitaley K, Lewis RW, et al.** Nitric oxide inhibits RhoA/Rho-kinase signaling to cause penile erection. *Eur J Pharmacol* 2002; (439): 173-174.
67. Chitaley K, Bivalacqua TJ, Champion CJ et al. Adeno-associated viral gene transfer of dominant negative RhoA enhances erectile function in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; (298): 427-432.
68. **Madaule P.,Axel R.** A novel ras-related gene family. *Cell* 1985;(41):31-40.)b
69. Takai Y, Sasaki T, Matzaki T. **Small GTP-Binding Proteins.** *Physiol Rev*2001; (81): 1, 153-208.
70. Fukata Y, Amano M and Kaubuchi K. **Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells.** *Trends Pharmacol Sci* 2001; (22): 1, 32-39.
71. Miao L, Calvert JW, Tang J et al. **Upregulation of small GTPase RhoA in the basilar artery from diabetic (mellitus) rats.** *Life Sci* 2002; (71): 1175-85.
72. Boettner B, Aelst LV. **The role of Rho GTPases in disease development.** *Gene* 2002; (286): 155-174.
73. Casey PJ, Seabra MC. **Protein prenyl transferases.** *J Biol Chem* 1996;(271):5289-5292.
74. **Bishop AL, Hall A.**Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* 2000; (348):241-255
75. **Olofsson B.** Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cell signaling. *Cell Signal* 1999;(11):545-554
76. **Zheng Y.** Db1 family guanine nucleotide Exchange factors. *Trends Biochem Sci.* 2001; (26):724-732.
77. **Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Brown JH.** The role of Rho in G-protein coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;(40):459-489.
78. **Wetschurck N, Offermans S.** Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J. Mol. Med;* 2002; (80):629-638
79. **Yoshioka K, Matsumura F, Akedo H, Itoh K.** Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells. *J Biol Chem,* 1998; (273): 146-154.
80. **Hirano K.** Current topicks in the regulatory mechanism underlying the Ca<sup>+2</sup> sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2007; (104): 109-115
81. **Büyükaşar K,Levent A.** Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and neurotransmitter release in the mouse gastric fundus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; (303), 777– 781.

82. **Büyükafşar K, Ün İ.** Effects of the Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil on the corpus cavernosum from diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2003; (472): 235-238.
83. **Büyükafşar K, Levent, A, Ark M.** Expression of Rho-kinase and its functional role in the contractile activity of mouse vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 2003; (140): 743– 749.
84. Amano M, Fukata Y and Kaibuchi K. **Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by the small GTPase Rho and its targets.** *Trends Cardiovasc Med* 1998; (8): 162-168.
85. Buhl AM, Johnson NL, Dahanasekaran N, et. al. **G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly.** *J Biol Chem*, 1995;(270):24631-24634
86. **Dhanasekaran N, Dermott JM.** Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal*, 1996;(8):235-245.
87. **Gohla A, Harhammer R, Schultz G.** The G-protein G13 but not 12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *The J Biol Chem*, 1998;(273):4653-4659.
88. **Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S.** Involvement of rho p21 in the GTP enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem*, 1992;(267):8719-8722.
89. **Miura Y, Kikuchi A, Musha T, et al.** Regulation of morphology by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*, 1993;(268):510-515.
90. Mukai Y, Shimokawa H, Mataba T et al. **Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease—a novel therapeutic target in hypertension.** *The FASEB J* 2001 10.1096/fj.00-0735
91. Chitaley K, Webb RC. **Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of Rho-kinase signaling.** *Hypertension* 2002; (39): 2, 438-442.
92. Chitaley K, Webb RC. **Microtubule depolymerization facilitates contraction of rat aorta via activation of Rho-kinase.** *Vasc Pharmacol*, 2002;(38):157-161.
93. Coussin F, Scott RH, Wise A. Et al. **Comparison of sphingosine 1-phosphate-induced intracellular signaling pathways in vascular smooth muscles differential roles in vasoconstriction.** *Circ Res* 2002;( 91): 151-157.
94. Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Et al. **Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C.** *Circ Res* 2002;( 91): 112-119.
95. Nagumo H, Sasaki Y, Ono Y et al. **Rho kinase inhibitor HA-1077 prevents Rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells.** *Am Physiol Cell Physiol* 2000; (278): 57-65.
96. McGregor E, Gosling M, Beattie DK, et al. **Circumferential stretching of saphenous vein smooth muscle enhances vasoconstrictor responses by Rho kinase-dependent pathways.** *Cardiovasc Res* 2002;(53): 219-216.
97. **Amerongen GPN, Delft A, Vermeer MA et al.** Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability role of Rho kinase and protein tyrosine kinase. *Circ Res* 2000; (87): 335-340

98. Kandabashi T, Shimokawa H, Mukai Y, et al. **Involvement of rho-kinase in agonist-induced contractions of arteriosclerotic human arteries.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;(22): 243-248.
99. Ai S, Kuzuya M, Koike T et al. **Rho-Rho kinase is involved in smooth muscle cell migration through myosin light chain phosphorylation-dependent and independent pathways** *Atherosclerosis* 2001; (155): 321-327.
100. Wang H, Eto M, Steers WD et al. **RhoA-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization in erectile function.** *J Biol Chem* 2002; (277): 34, 30614-30621.
101. Mills TM, Chitaley K, Lewis RW, et al. **Nitric oxide inhibits RhoA/Rho-kinase signaling to cause penile erection.** *Eur J Pharmacol* 2002; (439): 173-174.
102. **Aghajanian A1, Wittchen ES, Campbell SL, Burrige K.** Direct activation of RhoA by reactive oxygen species requires a redox-sensitive motif. *PLoS One.* 2009 Nov 26;4(11):e8045
103. **Knock GA1, Snetkov VA, Shaifta Y, Connolly M, Drndarski S, Noah A, Pourmahram GE, Becker S, Aaronson PI, Ward JP.**Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca(2+) sensitization. *Free Radic Biol Med.* 2009 Mar 1;46(5):633-42. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.015. Epub 2008 Dec 6
104. **Coleman ML, Sahai AE, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olsan MF,** Membrane blebbing during apoptosis result from caspase-3-madiated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001;3:339-45.
105. **Sebbagh M, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J.** Caspase-3-madiated cleavage of ROCK I induced MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001;3:346-52.
106. **Yang X1, Zheng F1, Zhang S1, Lu J2.** Loss of RhoA expression prevents proliferation and metastasis of SPCA1 lung cancer cells in vitro. *Biomed Pharmacother.* 2015 Feb;69:361-6. doi: 10.1016/j.biopha.2014.12.004. Epub 2014 Dec 12.
107. **Li B1, Zhao WD, Tan ZM, Fang WG, Zhu L, Chen YH.** Involvement of Rho/ROCK signalling in small cell lung cancer migration through human brain microvascular endothelial cells. *FEBS Lett.* 2006 Jul 24;580(17):4252-60. Epub 2006 Jun 30.

## ÖZGEÇMİŞ

13 Ağustos 1976 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladıktan sonra Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden 1999 yılında eczacı ünvanı ile mezun oldu. Mezun olduktan sonra 6 yıl serbest eczacılık yaptı.2008 yılından bu yana İncirlik Amerikan üssünde Amerikan Hava Kuvvetlerine eczacı olarak hizmet vermektedir. İyi derecede İngilizce ve orta seviyede İspanyolca bilmektedir.2012 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında tezli yüksek lisans programına başladı.

