

**SIÇANLARDA PERİFERİK İSKEMİ/REPERFÜZYON
ZEDELENMESİNE ARACILIK EDEN İNFLAMATUVAR YANIT
VE OKSİDATİF/NİTROZATİF STRES SÜREÇLERİNDE
mTOR'UN KATKISININ MEK1/ERK1/2 ETKİNLİĞİ İLE
İLİŞKİLENDİRİLEREK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ECZ. ÇAĞLA AKINCI UYSAL

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ECZACILIK FARMAKOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

**MERSİN
HAZİRAN - 2019**

**SIÇANLARDA PERİFERİK İSKEMİ/REPERFÜZYON
ZEDELENMESİNE ARACILIK EDEN İNFLAMATUVAR YANIT VE
OKSİDATİF/NİTROZATİF STRES SÜREÇLERİNDE mTOR'UN
KATKISININ MEK1/ERK1/2 ETKİNLİĞİ İLE
İLİŞKİLENDİRİLEREK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ECZ. ÇAĞLA AKINCI UYSAL

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ECZACILIK FARMAKOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

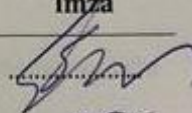
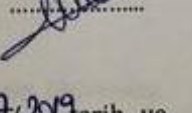
**Danışman
Prof. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT**

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2018-2-TP2-2984 nolu proje olarak desteklenmiştir.

**MERSİN
HAZİRAN - 2019**

ONAY

Çağla AKINCI UYSAL tarafından Prof. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT danışmanlığında hazırlanan "Sıçanlarda Periferik İskemi/Reperfüzyon Zedelenmesine Aracılık Eden İnflamatuvar Yanıt ve Oksidatif/Nitrozatif Stres Süreçlerinde mTOR'un katkısının MEK1/ERK1/2 Etkinliği ile İlişkilendirilerek Araştırılması" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 27 Haziran 2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT	
Üye	Doç. Dr. Hacer Sinem BÜYÜKNACAR	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Nalan TİFTİK	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18.07/2019 tarih ve 16...../283 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

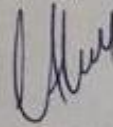
ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

27 Haziran 2019 / 27 June 2019

İmza / Signature



Çağla AKINCI UYSAL

ÖZET

Bu çalışmada, rapamisinin memelilerdeki hedefinin (*mammalian target of rapamycin*; mTOR) selektif inhibitörü olan rapamisin kullanılarak, sıçanlarda periferik iskemi/reperfüzyon (İ/R)'a bağlı ortaya çıkan hedef ve uzak organ zedelenmelerine aracılık eden inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif strese mTOR'un katkısı, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (*mitogen-activated protein kinase*; MEK)1/ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (*extracellular signal-regulated kinase*; ERK)1/2 etkinliğindeki değişiklikler ile ilişkilendirilerek araştırıldı. Sıçanlar 4 gruba ayrıldı: (1) Kontrol, (2) İ/R, (3) Rapamisin (1 mg/kg, i.p.), (4) İ/R+rapamisin grubu. Kontrol grubundaki hayvanlara serum fizyolojik enjeksiyonu dışında herhangi bir işlem uygulanmadı. İ/R ve İ/R+Rapamisin gruplarındaki sıçanların her iki bacağına *trochanter* major düzeyinde 4 saat iskemi ve ardından 4 saat reperfüzyon uygulandı. Deneyler sonunda kurban edilen sıçanlardan kan, gastrokinemius kası ve böbrek dokuları izole edildi. İzole edilen bu dokulardan hazırlanan doku homojenatlarında ribozomal protein S6 (*ribosomal protein S6*; rpS6), MEK1, ERK1/2, tümör nekroze edici faktör (*tumor necrosis factor*; TNF)- α , indüklenabilir nitrik oksit sentaz (*inducible nitric oxide synthase*; iNOS), p22^{phox}, gp91^{phox}, nitrotirozin protein ekspresyonları ve/veya fosforilasyonları ile miyeloperoksidaz (MPO) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz etkinlikleri ölçüldü. Ayrıca, doku örneklerinde ve serumda nitrit düzeyleri ölçüldü. İ/R uygulaması ile rpS6, MEK1 ve ERK1/2 protein ekspresyonları değişmezken fosforilasyonlarında artmanın yanı sıra TNF- α , iNOS, p22^{phox}, gp91^{phox} ve nitrotirozin protein ekspresyonları ile MPO ve NADPH oksidaz etkinliklerinde de artma gözlemlendi. Ayrıca, İ/R ile dokularda ve serumda nitrit düzeyleri arttı. İ/R'nin neden olduğu tüm bu değişiklikler rapamisin ile geri çevrildi. Bulgularımız, periferik İ/R zedelenmesinde sıçanlarda hedef organ gastrokinemius kası ve uzak organ böbrekte görülen inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif strese, mTOR ile birlikte MEK1/ERK1/2 etkinliğindeki artışın aracılık ettiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: mTOR, MEK1/ERK1/2, oksidatif/nitrozatif stres, iskemi/reperfüzyon.

Danışman: Prof.Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT, Mersin Üniversitesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

In this study, we investigated changes in mitogen-activated protein kinase (MEK)1/extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 activity, in relation to mammalian target of rapamycin (mTOR) activity that contributes to oxidative/nitrosative stress induced by hindlimb (ischemia/reperfusion) I/R injuries by using a selective mTOR inhibitor rapamycin in rats. In the context of this project, the rats were divided into 4 groups: (1) Control, (2) I/R, (3) Rapamycin (1 mg/kg, i.p.), (4) I/R + Rapamycin. The animals in the control group did not undergo any treatment other than saline injection. I/R and I/R+rapamycin groups, both legs of rats were applied at trochanter major level for 4 hours and then, reperfusion for 4 hours. In control and rapamycin groups, any procedure was not applied. After the experiments, blood, gastrocnemius muscle and renal tissues were isolated from sacrificed rats. By preparing tissue homogenates from isolated tissues, ribosomal protein S6 (rpS6), MEK1, ERK1/2, tumor necrosis factor (TNF)- α , inducible nitric oxide synthase (iNOS), p22^{phox}, gp91^{phox} and nitrotyrosine protein expressions and/or phosphorylation and nitrite levels and myeloperoxidase (MPO) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activity were measured. While rpS6, MEK1 and ERK1/2 protein expressions did not change with I/R administration, their phosphorylation increased, TNF- α , iNOS, p22^{phox}, gp91^{phox} and nitrotyrosine protein expressions and MPO and NADPH oxidase activity increased. Additionally, I/R administration showed increased serum and tissue nitrite levels. All these changes caused by I/R were reversed with rapamycin. Our results show that the inflammatory response and oxidative/nitrosative stress seen in peripheral I/R injury are mediated by the increase in MEK1/ERK1/2 activity together with mTOR.

Keywords: mTOR, MEK1/ERK1/2, inflammatory response, oxidative/nitrosative stress, ischemia/reperfusion.

Advisor: Prof. Seyhan SAHAN FIRAT, Mersin University, Department of Pharmacology, Mersin.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bana bilimsel düşünme ve çalışma yolunda rehberlik ederek, ufkumu açan, sabretmeyi öğreten, her konuda desteğini esirgemeyen danışman hocam ve Ana Bilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Sn. Seyhan ŞAHAN FIRAT'a bana vermiş olduğu emeklerden ötürü teşekkürlerimi sunuyorum. Bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen Ana Bilim Dalımız öğretim üyeleri Prof. Dr. Sn. Bahar TUNÇTAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Sn. A. Nihal SARI'ya teşekkür ediyorum. Her konuda deneyimlerini ve bilgilerini benimle paylaşan, tez deneylerim sırasında benden yardımlarını esirgemeyen, en çok da manevi desteklerinden ötürü başta Arş. Gör. Meryem TEMİZ REŞİTOĞLU olmak üzere Arş. Gör. Demet Sinem GÜDEN ve Arş. Gör. Şefika Pınar ŞENOL'a çok teşekkür ederim. Varlığı ile lisansüstü eğitimimi renklendiren, dostluluğunun yanı sıra yaptığı destek ve yardımlarla her daim yanımda olan sevgili Zarife PİRE'ye sonsuz teşekkürler. Hayatımın bu en zorlu döneminde desteğini benden esirgemeyen tezimin yazım aşamasında en az benim kadar emeği olan sevgili eşim Alpay UYSAL'a, gösterdiği sabır ve anlayış için canım oğlum Güney'e ve bana hayatım boyunca pes etmemeyi öğreten sevgili aileme çok teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. İskemi/ Reperfüzyon (İ/R)	3
2.1.1. Genel Özellikleri	3
2.1.2. Patofizyolojisi	4
2.1.3. İ/R ve İnflamasyon	8
2.1.4. İ/R ve Oksidatif Stres	13
2.1.4.1. NADPH Oksidaz Aracılıklı ROT Üretimi	14
2.1.4.2. NOS Aracılıklı ROT Üretimi	16
2.1.4.3. İmmün Hücre Aracılıklı ROT Üretimi	17
2.1.4.4. Mitokondriyal İşlev Bozukluğu ile ROT Üretimi	18
2.1.4.5. KO Aracılıklı ROT Üretimi	18
2.2. Rapamisin'in Memelilerdeki Hedefi (mTOR)	20
2.2.1. Yapısı ve Özellikleri	20
2.2.2. Etkinliğinin Düzenlenmesi	23
2.2.3. Ekspresyonu ve Patofizyolojik Olaylardaki Rolü	26
2.2.3.1. İnflamasyon Patolojisinde mTOR'un Rolü	27
2.2.3.2. Metabolik Hastalıkların Patolojisinde mTOR'un Rolü	29
2.2.3.3. Nörodejeneratif Hastalıkların Patolojisinde mTOR'un Rolü	30
2.2.3.4. Kanser Patolojisinde mTOR'un Rolü	31
2.2.4. mTOR İnhibitörleri	33
2.2.4.1. Rapamisin ve Analogları	33
2.2.4.2. Dual PI3K/mTOR İnhibitörleri	34
2.2.4.3. mTOR Kinaz İnhibitörleri (TORKIs)	34
2.2.4.4. Diyet Türevi Doğal Ürünler	35
2.2.4.5. RapaLink-1	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM	36
3.1. Materyal	36
3.1.1. Deney Hayvanı	36
3.1.2. Sarf Malzemesi	36
3.1.3. Teçhizat	39
3.2. Yöntem	40
3.2.1. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	40
3.2.2. Serum Örneklerinin Hazırlanması, Dokuların Homojenize Edilmesive Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması	41
3.2.3. Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Toplam Protein Düzeyinin Belirlenmesi	41
3.2.4. Serum ve/veya doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda nitrit düzeyi ile MPO ve NADPH oksidaz etkinliğinin ölçülmesi	42

	Sayfa
3.2.5. Doku örneklerinde rpS6, fosforile rpS6, MEK1, fosforile MEK1, ERK1/2, fosforile ERK1/2, TNF- α , iNOS, p22 ^{phox} , gp91 ^{phox} , nitrotirozin ve aktin protein ekspresyonlarının ölçülmesi	42
3.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1. İ/R ve/veya Rapamisinin rpS6 Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi	45
4.2. İ/R ve/veya Rapamisinin MEK1 Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi	48
4.3. İ/R ve/veya Rapamisinin ERK1/2 Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi	51
4.4. İ/R ve/veya Rapamisinin TNF- α Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	54
4.5. İ/R ve/veya Rapamisinin iNOS Protein Ekspresyonu ve Nitrit Düzeyi Üzerindeki Etkisi	56
4.5.1. İ/R ve/veya Rapamisinin iNOS Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	56
4.5.2. İ/R ve/veya Rapamisinin Nitrit Düzeyi Üzerindeki Etkisi	58
4.6. İ/R ve/veya Rapamisinin Doku MPO Etkinliği Üzerindeki Etkisi	60
4.7. İ/R ve/veya Rapamisinin Doku NADPH Oksidaz Etkinliği, gp91 ^{phox} , p22 ^{phox} ve Nitrotirozin Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	62
4.7.1. İ/R ve/veya Rapamisinin Doku NADPH Oksidaz Etkinliği Üzerindeki Etkisi	62
4.7.2. İ/R ve/veya Rapamisinin gp91 ^{phox} Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	64
4.7.3. İ/R ve/veya Rapamisinin p22 ^{phox} Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	66
4.7.4. İ/R ve/veya Rapamisinin Nitrotirozin Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	68
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	70
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. İskemik dönemde gelişen patolojik olaylar	6
Şekil 2.2. MAPK etkinliğinin başlattığı hücresel yanıtlar	10
Şekil 2.3. İ/R'de fagositik hücrelerin iskemik alana göçüyle meydana gelen "solunum patlaması" olayı	12
Şekil 2.4. NADPH oksidaz ailesinin yapısı	15
Şekil 2.5. NOX2 enzim kompleksinin şematik gösterimi	16
Şekil 2.6. İskemi/Reperfüzyon'da NO sentezi	17
Şekil 2.7. İ/R'de KO aracılığıyla ROT üretimi	20
Şekil 2.8. mTOR'un temel yapısı	21
Şekil 2.9. mTORK1 ve mTORK2	22
Şekil 2.10. mTOR etkinliğinin düzenlenmesi	25
Şekil 4.1. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında rpS6 protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	46
Şekil 4.2. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında rpS6 protein fosforilasyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	47
Şekil 4.3. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında MEK1 protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	49
Şekil 4.4. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında MEK1 protein fosforilasyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	50
Şekil 4.5. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında ERK1/2 protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi.	52
Şekil 4.6. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında ERK1/2 protein fosforilasyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	53
Şekil 4.7. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında ölçülen TNF-α protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	54
Şekil 4.8. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında iNOS protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	55
Şekil 4.9. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) gastrokinemius kası ve (C) serumlarında nitrit düzeyleri üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	57
Şekil 4.10. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında MPO etkinliği üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	59
Şekil 4.11. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında NADPH Oksidaz etkinliği üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	61
Şekil 4.12. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında gp91 ^{phox} protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	63
Şekil 4.13. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında p22 ^{phox} protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	65

	Sayfa
Şekil 4.14. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında ölçülen nitrotirozin düzeyleri üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi	67
Şekil 5.1. Sıçanlarda periferik iskemi/reperfüzyon zedelenmesine aracılık eden inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif stres süreçlerinde mTOR'un katkısının MEK1/ERK1/2 etkinliği ile ilişkilendirilerek araştırılması kapsamında yapılan çalışmaların özeti	69

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
4EBP1	<i>eIF4E binding protein 1</i>
ADP	Adenozin difosfat (<i>adenosine diphosphate</i>)
AMP	Apopitoz indükleyici faktör
AMPK	<i>Protein kinase B</i>
ANOVA	Adenozin monofosfat (<i>adenosine monophosphate</i>)
ATP	AMP-ile etkinleştirilen protein kinaz (<i>AMP-activated protein kinase</i>)
ATPaz	Varyans analizi (<i>analysis of variance</i>)
Ca ²⁺	Kalsiyum iyonu
COX	Siklooksijenaz (<i>cyclooxygenase</i>)
DEPTOR	<i>DEP domain containing mTOR-interacting protein</i>
DNA	Deoksiribonükleik asit (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGCG	<i>Epigallocatechingallate</i>
eIF3	<i>Eukaryotic initiation factor 3</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
eNOS	Endotelial nitrik oksit
ERK	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (<i>extracellular signalregulated kinase</i>)
Fe ²⁺	Demir iyonu
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FAT	<i>The rapamycin-associated protein ataxia telangiectasia mutated transformation/transcription domain-associated protein</i>
FATC	<i>FAT carboxy-terminal homology domain</i>
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (<i>United States Food and Drug Administration</i>)
FRAP	<i>FKBP12-rapamycin-associated protein</i>
FRB	<i>FKBP12-rapamycin binding</i>
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
H ⁺	Hidrojen iyonu
H ₄ B	Tetrahidrobiopterin
HEAT	<i>Huntington, elongation factor3, the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A, and Tor 1p</i>
H ₂ O	Dihidrojen monooksit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HM	<i>Hydrophobic motif</i>
HOCl	Hipokloröz asit (<i>hypochlorous acid</i>)
hVps34	<i>Human vacuolar protein sorting 34</i>
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüs (<i>human immunodeficiency virus</i>)
İκB	κB inhibitörü (<i>inhibitor of κB</i>)
ICAM	İntraselüler adezyon molekülü (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFR	<i>IGF-1 receptor</i>
IKKβ	İκB-α kinaz kompleks β (<i>IkB-α kinase complex β</i>)
IL	İnterlökin (<i>interleukin</i>)
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
iNOS	indüklenebilir NOS
İ/R	İskemi/reperfüzyon
i.p.	İntraperitoneal (<i>intraperitoneal, intraperitoneally</i>)
JAK/STAT	<i>Janus kinase/signal transducer and activator of transcription</i>
JNK	Jun N-terminal kinaz

Kısaltma/Simgesi	Tanım
K ⁺	Potasyum
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilodalton
KDH	Ksantin dehidrogenaz
KO	Ksantin oksidaz
L	Litre
Lkb11	Serin treoninkinaz 11
LOO ⁻	Lipit peroksit radikali
LPS	Lipopolisakkarit (<i>Lipopolysaccharide</i>)
LT	Lökotrien (<i>leukotriene</i>)
MAO	Monoamin oksidaz (<i>monoamineoxidases</i>)
MAPK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MDA	Malondialdehit (<i>malondialdehyde</i>)
MEK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
mg	Miligram
ml	Mililitre
mLST8	<i>Mammalian lethal with sec-13 protein 8</i>
MODS	Çoklu organ işlev bozukluğu sendromu (<i>Multiple organ dysfunction syndrome</i>)
MPO	Miyeloperoksidaz (<i>myeloperoxidase</i>)
mPTP	Mitokondriyal geçiş poru (<i>mitochondrial permeability transition pore</i>)
mRNA	Haberci ribonükleik asit (<i>messenger RNA</i>)
mSin 1	<i>Mammalian stress-activated mapkinase-interacting protein 1</i>
mTOR	Rapamisinin memelilerdeki hedefi (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
mTORK	Rapamisinin memelilerdeki hedef kompleksi (<i>mammalian target of rapamycin complex</i>)
n	Sıçan sayısı
Na ⁺	Sodyum iyonu
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit (<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NED	<i>N-1-Naftiletildiamin dihidroklorür (N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride)</i>
NF-κB	Nükleer faktör κB (<i>nuclear factor κB</i>)
nNOS	Nöronal NOS
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz (<i>nitric oxide synthase</i>)
NOX	NADPH oksidaz
N ₂ O ₃	Nitrojen trioksit
O ₂	Moleküler oksijen
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
OH ⁻	Hidroksil radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit
P	İstatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi (<i>probability</i>)
p53	Protein 53 veya TP 53
PAF	Trombosit etkinleştirici faktör (<i>platelet activating factor</i>)
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PECAM	Platelet-endotel adezyon molekülü (<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
pH	Hidrojen iyonu derişiminin negatif logaritması
PI3K	Fosfatidil inozitol-3-kinaz (<i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>)
PIP2	Fosfatidilinozitol 4,5- bifosfat (<i>phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</i>)
PIP3	Fosfatidilinozitol3,4,5-trifosfat (<i>phosphatidylinositol3,4,5-triphosphate</i>)

Kısaltma/Simge	Tanım
PLA ₂	Fosfolipaz A ₂ (<i>phospholipase A₂</i>)
PKC	Protein kinaz C
PMNL	Polimorfonükleer lökosit (<i>polymorphonuclear leukocyte</i>)
PMSF	Fenilmetansülfonilflorit
PRAS40	<i>Proline-rich Akt substrate 40 kDa</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog on chromosome 10</i>
RAFT	<i>rapamycin and FKBP12 target</i>
RAPA	Rapamisin
RAPT 1	<i>rapamycin target 1</i>
Raptor	<i>Regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin</i>
REDD	<i>Regulated in development and DNA damage response</i>
Rheb	<i>Ras-homolog enriched in brain</i>
Rictor	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RNA	Ribonükleik asit (<i>ribonucleic acid</i>)
RNT	Reaktif nitrojen türleri (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROT	Reaktif oksijen türleri (<i>reactive oxygen species</i>)
rpS6	Ribozomal protein S6 (<i>ribosomal protein S6</i>)
S6K	S6 kinaz (<i>S6 kinase</i>)
SA	Sülfanilamit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEP	<i>sirolimus effector protein</i>
Ser	Serin
SGK	<i>Serum and glucocorticoid-induced protein kinase</i>
SIRS	Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>)
SOD	Süperoksit dizmutaz (<i>superoxide dismutase</i>)
SSA	Sığır serum albümini
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>
Thr	Treonin (<i>threonin</i>)
TNFR	Tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptör
TNF- α	Tümör nekrozlaştırıcı faktör alfa (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TOR	Rapamisin hedefi (<i>target of rapamycin</i>)
TORKIs	ATP-yarışmalı mTOR kinaz inhibitörleri
TRRAP	<i>Transformation/transcription domain associated protein</i>
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i>
TTÇ	Tris tampon çözeltisi
VCAM	Vasküler adezyon molekülü (<i>vascular cell adhesion protein</i>)
YKST	Yağsız kurutulmuş süt tozu
μ l	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Mevcut kan akımının kısıtlanması ile ortaya çıkan iskeminin ardından yeniden kan akımının sağlanması olarak tanımlanan reperfüzyon ile gelişen iskemi/reperfüzyon (İ/R) zedelenmesi daha çok organ transplantasyonları, kardiyopulmoner bypass, arteriyel sisteme klemp uygulanması, trombolitik tedavi ve koroner anjiyoplasti gibi medikal ve cerrahi işlemler sırasında ortaya çıkmaktadır. İ/R zedelenmesi, sadece doğrudan etkilenen organ ile sınırlı kalmayıp uzak organlarda da zedelenmeye neden olabilmektedir ve iskemi sonrasında dokuda ortaya çıkan inflamatuvar reaksiyonlar, uzak organdaki reperfüzyona bağlı zedelenmeyi açıklamaktadır. İ/R'deki uzak etkiler çoğunlukla kardiyovasküler sistem, böbrek ve akciğerde gözlenmekte olup sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ve çoklu organ işlev bozukluğu sendromu ile sonuçlanabilmektedir [1].

Arteriyel ya da venöz kan akımının azalmasına bağlı olarak doku ve organların yetersiz perfüzyonu sonucu oksijenden yoksun kalmaları olarak tanımlanan iskemik dönemde oksijen yetersizliği nedeniyle anaerobik metabolizma devreye girmekte, laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimine neden olmaktadır. Laktik asit birikimine bağlı olarak ortaya çıkan asidoz, enzimlerin etkinliklerini değiştirip yüksek enerjili fosfat bağlarının oluşumunu azaltmakta ve hücre, homeostazi için gerekli olan enerjiden yoksun kalmaktadır. Hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesiyle sonuçlanan bu olaylar hücre ölümüne yol açmaktadır [2, 3]. İskemik dokuya kan akımının yeniden sağlanması olarak tanımlanan reperfüzyonun doku nekrozunu önlediği ve organ işlevlerinin geri kazanımında etkili olduğu bilinmektedir. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar reperfüzyonun hücreyi daha fazla nekroz riskine sokabileceğini ve hücresel işlevlerin geri kazanılmasını kısıtlayabileceğini göstermiştir [1, 4].

İskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanması, organların işlevlerini geri kazanmasında ve doku nekrozunun önlenmesinde etkili olmakla birlikte, reperfüzyonun dokuda sadece iskemi ile oluşan zedelenmeye göre çok daha ciddi bir zedelenmeye yol açtığı gösterilmiştir ve bu durum "İ/R zedelenmesi" olarak tanımlanmaktadır. İnflamasyon İ/R zedelenmesinde çok önemli bir faktördür ve İ/R'de rol oynayan inflamatuvar mediyatörlerin sistemik dolaşıma salıverildiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır [1, 5, 6, 7]. Reperfüzyonla birlikte oluşan reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT), nekroz ve apoptoz gibi hücresel olayların başlamasına aracılık etmektedir. Bununla birlikte, proinflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonunu uyaran ROT, inflamatuvar yanıtlara yol açmaktadır [8].

Rapamisinin memelilerdeki hedefi (*mammalian target of rapamycin*; mTOR), fosfatidilinositol-3-kinaz (*phosphatidylinositol-3-kinase*; PI3K)/Akt ailesine ait bir serin/treonin

kinaz enzimidir. PI3K/Akt yolunun hücre büyümesi, metabolizması ve canlılığının düzenlenmesi ile immün sistem hücrelerinin işlevleri gibi pek çok biyolojik sürecin yanı sıra sistemik inflamatuvar yanıt gelişimi, nörodejeneratif, metabolik ve kardiyovasküler hastalıklar gibi inflamatuvar yanıt ile belirgin patolojilerde de önemli rolünün olduğu bilinmektedir [9]. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, mTOR sinyal ileti yolunun, hem *in vivo* hem de *ex vivo* İ/R modellerindeki inflamatuvar yanıtta rol aldığı gösterilmiştir [10, 11]. Bununla birlikte, daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmada, sıçanlara zimosan uygulanması ile oluşturulan hipotansiyon, inflamasyon ve oksidatif/nitrozatif stres ile belirgin non-septik şokta gelişen sistemik inflamatuvar yanıt ve buna bağlı doku zedelenmesine, mTOR/ mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (*mitogen-activated protein kinase*; MEK)1/ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (*extracellular signal-regulated kinase*; ERK)1/2 /*inhibitör kappa B* kinaz (*IκB-α kinase complex* ; IKKβ)/κB inhibitörü (*inhibitor of κB*; IκB-α)/*nükleer faktör κB* (NF-κB) sinyal ileti yolu etkinliğindeki artmaya bağlı olarak oluşan proinflamatuvar mediyatör oluşumu ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*; NADPH) oksidaz sistemi etkinliğindeki artmanın aracılık ettiği gösterilmiştir. Zimosan ile oluşturulan ve mTOR'un aracılık ettiği bu etkiler rapamisin ile geri çevirilmiştir. Daha önce yapmış olduğumuz bir başka çalışmada, sıçanlarda İ/R'nin neden olduğu hedef ve uzak organ zedelenmelerinde oluşan inflamasyon ve oksidatif/nitrozatif strese mTOR'un mTOR/IκB-α/NF-κB yolu etkinliğinde artışa yol açarak katkıda bulunduğu gösterilmiştir. İ/R zedelenmesinin mTOR sinyal ileti yolunda artmaya bağlı olarak gelişen bu etkisi seçici bir mTOR inhibitörü olan rapamisin ile geri çevirilmiştir. Ancak, sıçanlarda oluşturulan periferik İ/R zedelenmelerinde, mTOR/MEK1/ERK1/2 sinyal ileti yolunun inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif stres üzerindeki katkısı tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu tez çalışmasında, seçici bir mTOR inhibitörü rapamisin kullanılarak sıçanlarda oluşturulan, inflamasyon ve oksidatif/nitrozatif stresle belirgin İ/R zedelenmesinde, mTOR etkinliğinde oluşabilecek değişikliklerin neden olduğu MEK1 ve ERK1/2 etkinliğine bağlı proinflamatuvar mediyatörlerin oluşumu ile birlikte oksidatif/nitrozatif strese neden olan mediyatörlerin üretiminin ne yönde değiştiği araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. İSKEMİ/REPERFÜZYON (İ/R)

2.1.1. Genel Özellikleri

İskemi/reperfüzyon (İ/R), başlangıçta dokulara giden kan akımının kısıtlanmasının ardından kan akımının yeniden sağlanması ve eşzamanlı reoksijenasyonun yeniden yapılandırması ile karakterize patolojik bir durumdur [12]. Kan akımının kesilmesi metabolik arz ve talep dengesizliğine neden olan doku hipoksisine yol açmaktadır. Ancak, kan akımının yeniden sağlanması ve reoksijenasyon doku zedelenmesinin alevlenmesi ve derin inflamatuvar yanıt ile ilişkilidir ve bu durum iskemi/reperfüzyon zedelenmesi olarak adlandırılmaktadır. İ/R'ye bağlı doku zedelenmesine çok çeşitli patolojik süreçler katkıda bulunmaktadır [13].

Doku ve organların yetersiz perfüzyonu sonucunda oksijenden yoksun kalmaları olarak tanımlanan iskemi ile hücrelerde yapısal ve metabolik değişiklikler gözlenmektedir [14]. Bu dönemde dokuya gelen kan akımının azalması ile birlikte hücresel işlevlerin gerçekleşmesi için temel yakıt olan oksijenin yetersiz kalması nedeniyle hücresel oksidatif fosforilasyon olayları ve adenosin 5'-trifosfat (*adenosine-5'-triphosphate*; ATP) ile fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat türevlerinin sentezi azalmaktadır. Hücresel işlevler için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanırken iskemi gibi oksijen yetersizliği durumlarında anaerobik metabolizma devreye girmekte, laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimine neden olmaktadır. Laktik asit birikimi sonucu ortaya çıkan asidoz, enzimlerin etkinliklerini değiştirip yüksek enerjili fosfat bağlarının oluşumunu azaltmakta ve hücre, homeostazı için gerekli enerjiden yoksun kalmaktadır. Hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesiyle sonuçlanan bu olaylar hücre ölümüne yol açmaktadır [2, 3].

İskeminin ardından yeniden kan akımının sağlanması "reperfüzyon" olarak adlandırılmaktadır. İskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması, hücrelerin rejenerasyonu ve toksik metabolitlerin temizlenebilmesi için yeniden kan akımı gerekmektedir ancak reperfüzyonunun, iskeminin neden olduğu doku zedelenmesinin genişlemesine yol açtığı da bilinmektedir. Kan akımının yeniden sağlanmasıyla iskemiyle oluşan zedelenmeye göre daha ileri derecede hücresel nekroz oluşabilmekte ve dolayısıyla hücresel işlevlerde iyileşmeyi sınırlandırabilmektedir [1, 14].

İskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanması, organların işlevlerini geri kazanmasında ve doku nekrozunun önlenmesinde etkili olmakla birlikte, reperfüzyonun dokuda sadece iskemi ile oluşan zedelenmeye göre çok daha ciddi bir zedelenmeye yol açtığı gösterilmiş olup, bu durum "İ/R zedelenmesi" olarak tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmalar reperfüzyon

döneminde hücre içerisine yeniden giriş yapan moleküler oksijen ile birlikte oluşan serbest oksijen radikalleri, inflamatuvar mediyatörlerin oluşumu, polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) etkinleşmesi ve kompleman sistem etkinliği gibi inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif strese neden olan moleküler ve biyokimyasal mekanizmaların İ/R zedelenmesinde rol oynadığını göstermektedir [1, 15].

İ/R, kalp, beyin, karaciğer, akciğer, iskelet kası ve böbrek gibi organlarda zedelenmeye neden olan patolojik bir durumdur ve görüldüğü veya etkilediği organa göre, hepatik, kardiyak, serebral, intestinal, periferik ve renal İ/R türleri oluşmaktadır. Kemik ve deri dokuları İ/R'nin neden olduğu zedelenmeye karşı intestinal doku ve iskelet kasına göre daha dirençlidir [16].

Özellikle medikal ve cerrahi işlemler sırasında gözlenen İ/R zedelenmesi, önemli bir sorun olarak tanımlanmaktadır. İ/R zedelenmesi, doğrudan etkilenen organın yanı sıra uzak organlarda da zedelenmeye neden olabilmektedir ve iskemi sonrasında dokuda ortaya çıkan inflamatuvar yanıtlar, reperfüzyona bağlı uzak organda meydana gelen zedelenmeyi açıklamaktadır. İ/R'deki uzak etkiler çoğunlukla kardiyovasküler sistem, böbrek ve akciğerde gözlenmekte olup sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (*systemic inflammatory response syndrome*; SIRS) ve çoklu organ işlev bozukluğu sendromu (*multiple organ dysfunction syndrome*; MODS)'na neden olabilmektedir [1]. İ/R zedelenmesinin lokal etkileri tüm organlarda ortak bir nedenden kaynaklanmasına rağmen sonuçları organa özgüdür. Sistemik etkiler sızıntılı kapiller yatakların yol açtığı sıvı ekstrasvazasyonu ve doku ödemi ile karakterize iken uzak etkiler, akut respiratuvar yetersizlik ve renal yetmezlik ile gelişen MODS ile sonuçlanabilen karmaşık süreçlerin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır [1, 17].

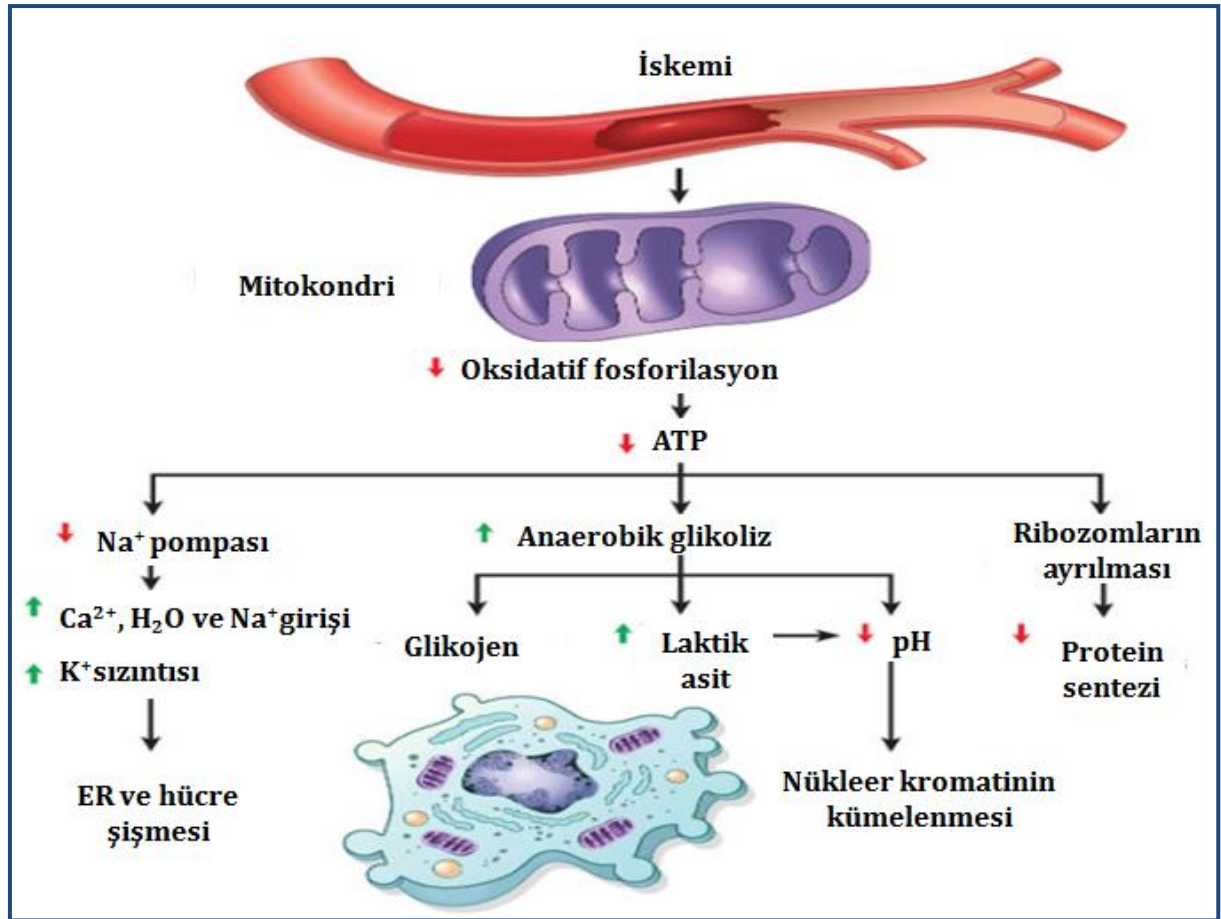
2.1.2. Patofizyolojisi

İ/R zedelenmesinin fizyopatolojisi, birbiriyle ilişkileri karmaşık hücrel ve humoral olaylar dizisinden oluşmaktadır. İ/R zedelenmesinin nedenleri arasında özellikle serbest oksijen radikalleri, endotel hücreler, PMNL ve kompleman sistem yer almaktadır [18,8]. Reperfüzyon döneminde oluşan reaktif oksijen türleri (ROT) ile reaktif nitrojen türleri (RNT), inflamatuvar yanıt, nekroz ve apoptoz gibi hücrel olayların başlamasına aracılık etmektedir. Tümör nekrozlaştırıcı faktör (*tumor necrosis factor*; TNF)- α ve interlekin (IL)-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonunu uyaran ROT [19-23], güçlü kemotaktik etkilere sahip diğer inflamatuvar mediyatörlerin de oluşumuna ve salıverilmesine aracılık ederek inflamatuvar yanıtlara neden olmaktadır. İnflamatuvar mediyatörler ise endotelial adezyon molekülünün ekspresyonuna, lökositlerin etkinliğine ve vasküler endotelial zedelenmeye neden olmaktadır [24, 25]. Bunun yanı sıra, protein, lipit ve nükleik asitlerle reaksiyona giren ROT, biyolojik membranlarda lipit peroksidasyonuna bağlı doğrudan zedelenmeye neden

olmaktadır [1].

İskemik dönemde hücrelerin yapısal özelliklerinde ve metabolizmasında geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz değişiklikler meydana gelmektedir. Hücrede oksidatif fosforilasyonun bozulmasıyla ATP ve fosfokreatin gibi fosfat türevlerinin sentezinin azalması bu değişikliklerden birisidir. Oksijen, organizmada hücrelerin var olması ve bütünlüğü için temel bir molekül olup organizmanın fizyolojisi için oksijen homeostazı çok önemlidir. Bu nedenle dokuya giden oksijenin azalması, enerji ihtiyacının karşılanması için mitokondriyal transport zincirinde yüksek enerjili fosfat olan ATP ve fosfokreatinin sentezinin sağlanabilmesi yönünden kritik bir durumdur [26-28].

İskemi sırasında görülen oksijen yetersizliğinden dolayı aerobik solunumdan anaerobik solunuma geçmek zorunda kalan hücrede laktik asit ve inorganik fosfat birikimi hücre içi pH değerinin düşmesine yol açmaktadır. İskemik dokuda ATP'nin üretimi azalırken tüketimi devam etmekte, hidrojen (H^+)/ATPaz, sodyum (Na^+)/potasyum (K^+)/adenozin trifosforaz (*adenosine triphosphatase*; ATPaz) ve kalsiyum (Ca^{2+})/ATPaz gibi ATP bağımlı iyon kanallarının işlevleri bozularak hücre içi Na^+ , Ca^{2+} ve su girişi artmaktadır [Şekil2.1]. Hücre içi Ca^{2+} artışı kalpain, fosfolipaz (*phospholipase A₂*; PLA₂) ve diğer sitoplazmik proteazların etkinliğine yol açmakta, H^+ /ATPaz iyon kanallarının işlev bozukluğu ve hücre içi pH değerinin düşmesi ise hücre organellerini zedeleyen lizozomal enzimleri etkinleştirmektedir [26-28]. Hücre içi Ca^{2+} düzeylerinin artışı sitokinlerin ve pro-inflamatuvarların birikmesine, çeşitli enzimlerin etkinleşmesine, hücre iskeleti organizasyonunun ve membran bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır [26-28].



Şekil 2.1. İskemik dönemde gelişen patolojik olaylar [29]. *ATP*, adenozin trifosfat (adenosine triphosphate); *Na⁺*, sodyum; *Ca²⁺*, kalsiyum; *H₂O*, dihidrojen monooksit; *K⁺*, potasyum; *ER*, endoplazmik retikulum (endoplasmic reticulum).

Ca^{2+} bağımlı sitozolik proteaz olan kalpain, reperfüzyon zedelenmesinde önemli bir rol oynayan ksantin dehidrojenaz (KDH)'ın ksantin oksidaz (KO)'a dönüşümüne yol açmaktadır. Bunun yanısıra devam eden ATP tüketimi nedeniyle, hücre içinde, ROT'un öncül molekülü olan hipoksantin düzeyleri artmaktadır. Fizyolojik koşullarda hipoksantin KDH tarafından metabolize olmaktadır. Ancak iskemi ile artan hücre içi Ca^{2+} düzeyleri, kalpaine etkinleştirerek KDH'nin KO'ya dönüşmesine aracılık etmektedir. Reperfüzyonun sağlanması ile birlikte hipoksantin, KO tarafından metabolize olmakta, bu tepkime sırasında da ROT üretilmektedir [26-28].

Hücrede membran transport sisteminin bozulması ile artan Ca^{2+} nedeniyle etkinleşen PLA_2 , prostaglandin, tromboksan ve lökotrien gibi inflamatuvar mediyatörler olan araşidonik asit metabolitlerinin oluşmasına neden olmakta, oluşan mediyatörler ise trombosit agregasyonunu, nötrofil etkinleşmesini ve kemotaksisi tetiklemektedir [26-28]. İskemiye bağlı sınırlı oksijen kullanımı sonucu ortaya çıkan bozulmuş endotelial hücre bariyeri işlevi ve kan damarlarının endotelial duvarı üzerindeki olumsuz etkiler, vasküler geçirgenlikte artışa ve

bununla birlikte dokularda sızıntılara neden olmaktadır [26-28].

İskemi sırasında makrofajlardan salıverilen proinflamatuvar sitokinler, PMNL'lerin etkinleşmesine ve dokuya girerek yayılmasına neden olmaktadır. İskemi döneminde endotel hücrelerde adezyon moleküllerinin artışı görülmektedir. İskemi döneminin ardından reperfüzyonun gerçekleşmesiyle salıverilmiş veya etkinleştirilmiş inflamatuvar mediyatörlerin iskemik alana ulaşımı kolaylaşmakta, inflamatuvar moleküller ve etkin lökositler ile lokal olan iskemi zedelenmesi daha da genişlemektedir. Tüm bu olaylar, reperfüzyon ile birlikte daha da şiddetlenen doku zedelenmesinde, iskeminin proinflamatuvar bir duruma neden olduğunu göstermektedir [26-28]. İskeminin ardından dokulara yeniden oksijenin sağlanması için reperfüzyon gerekli olmakla birlikte iskemi ile oluşan zedelenmeye göre çok daha ciddi zedelenmeye yol açtığı da gösterilmiştir [1, 14].

Reperfüzyon ile gelişen olayların temelini, iskem sırasında KDH'nin KO'ya dönüşmesi ve devam eden ATP tüketimi ile artan hipoksantin oluşturmaktadır. Fizyolojik koşullarda KDH tarafından ürik asite dönüştürülen hipoksantin, iskemik dönemde KDH KO'ya dönüştüğünden, KO tarafından metabolize edilmektedir. Bunun yanı sıra reperfüzyon ile hücrelere yeniden giriş yapan moleküler oksijen (O_2) elektron alıcı olarak kullanılmakta ve bu tepkime sonucu ROT oluşmaktadır [15]. ROT tarafından İ/R'nin sistemik etkileri tetiklenmekte, sitokinler ve nitrik oksit (NO) gibi vazoaktif mediyatörler oluşmakta ve nötrofiller etkinleşmektedir. Ayrıca iskemi, pH azalmasına yol açan hücre içi Ca^{2+} , Na^+ ve hidrojen (H^+) iyonlarının birikimine neden olmaktadır. İskemide asidik pH genellikle koruyucu olmakta, reperfüzyon ile birlikte pH değeri düzeyinde oluşan ani düşme ise sitotoksiteyi artırmaktadır.

Oksidatif fosforilasyonla ATP üretmek mitokondrinin birincil işlevidir. İskemik dönemde oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu fizyolojik işlevlerin bozulmasına yol açmaktadır ve bu bozulma, mitokondrinin iç membranında mitokondriyal geçiş poru (*mitochondrial permeability transition pore*; mPTP) olarak bilinen selektif olmayan bir por tarafından gerçekleştirilmektedir. Fizyolojik koşullarda ve iskemi boyunca kapalı olan bu por reperfüzyon fazında oksidatif stres, hızlı gelişen pH değişimi ve mitokondriyal Ca^{2+} seviyelerinin artması ile açılmakta ve 1.5 kilodalton (kDa)'dan küçük moleküllerin serbest geçişine izin vermektedir. Membrandan serbestçe geçiş yapan proteinler dışındaki küçük moleküller, mitokondride koloidal osmotik basıncın oluşmasına neden olmaktadır. Mitokondri içerisindeki molekül birikimi mitokondrinin dış membranının bozulmasına neden olmakta, sitoplazmaya apoptotik yolların etkinleştiricisi olan sitokrom enzim C salıverilmektedir. Seçici olmayan iç mitokondriyal membran geçirgenliği, ATP'nin sentezi yerine hidrolizinin gerçekleşmesine neden olan protonların geçişine karşı serbest olmakta ve oksidatif fosforilasyonun tamamen bozulmasına yol açmaktadır. Sonuçta bu durum iyonik ve metabolik dengenin bozulmasına, hücre içi ATP derişimin hızla azalmasına, yıkımda görev alan enzimlerin etkinleşmesine ve hücre zedelenmesi

ile nekrotik ölüme neden olmaktadır [30-37].

2.1.3. İ/R ve İnflamasyon

İ/R zedelenmesinde önemli bir rol oynayan inflamasyonun mekanizmalarının anlaşılması klinik açıdan çok önemlidir. Steril inflamasyon olarak nitelendirilen İ/R kaynaklı inflamasyon da patojen kaynaklı inflamasyonda olduğu gibi sitokinler, kemokinler, nötrofil artışı ve diğer proinflamatuvar uyarıcıların üretimi ile karakterizedir [38].

İskemik dokunun reperfüzyonu, kapillerde lökosit tıkaçlarının oluşması, sıvı filtrasyonunda artışı, arteriyollerde endotele bağımlı dilatasyonun bozulması ve postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına çıkmasıyla mikrovasküler işlevlerin bozulmasına neden olmaktadır [15].

İskemi sırasında makrofajlardan salıverilen proinflamatuvar sitokinler aracılığıyla etkinleşen PMNL'ler dokuya yayılmaktadır. Etkin lökositlerin dokuda başlattığı yanıtlar 3 mekanizma ile gerçekleşmektedir, bunlar; ROT üretimi, PLA₂ etkinliği sonucu araşidonik asit metabolitleri oluşumu ve degranülasyon sonucu lizozomal enzimlerin salıverilmesidir. Zedelenmeye yol açan etkeni ortadan kaldırmaya yönelik gelişen bu yanıtlar, inflamatuvar uyarının ve endoteldeki zedelenmenin daha da güçlenmesine neden olurken ödem, tromboz, mikrovasküler geçirgenlikte artış ve parankim hücre ölümüne kadar gidebilen yıkıcı durumlar gelişebilmektedir. Görevlerini tamamlamalarıyla birlikte apoptotik hücre ölümüne uğrayan lökositler makrofajlar aracılığıyla lenfatik dolaşıma girerek uzaklaştırılmaktadırlar [5, 39, 40].

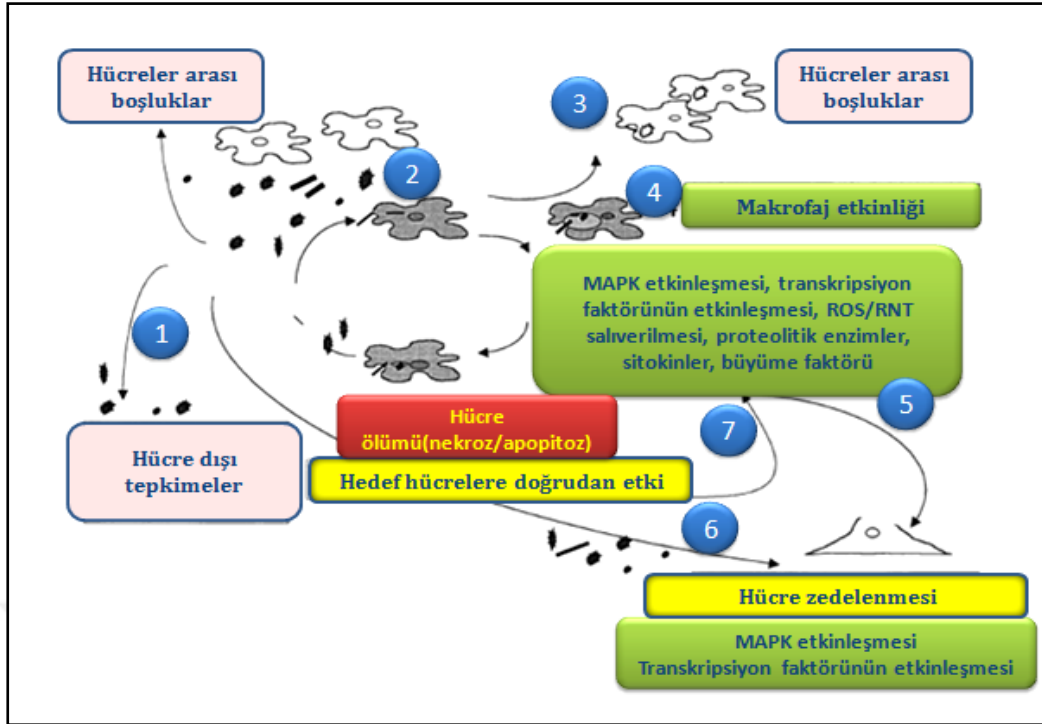
İskemik dönemde hücre içi Ca²⁺ düzeyi artışı ile etkinleşen PLA₂ tromboksan, lökotrien ve prostaglandin gibi mediyatörlerin oluşmasına neden olarak trombosit agregasyonuna, nötrofil etkinliğine ve kemotaksise yol açmaktadır [15]. ROT oluşumuyla gelişen nekrotik hücreler ve mediyatörlerin üretimine karşı inflamatuvar yanıt olarak gelişen nötrofil infiltrasyonu, postkapiler venüllerde lökosit adezyonunu ve dokuda lökosit göçünü desteklemektedir. Nötrofiller parenkimal hücrelerde sitotoksik rezervuarların salıverilmesini yönetmekte, iskemi kaynaklı doku zedelenmesini tetikleyen reperfüzyon zedelenmesine neden olmaktadır [38].

İskemik dokuya yeniden oksijen akışının sağlanması hücrel metabolizma için temel bir ihtiyaç olmasına rağmen immün hücrelerin sekestrasyonu oksijen geçişinin ilk olarak sağlandığı reperfüzyon sırasında gerçekleşmekte, KO ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz gibi enzimler ile ROT üretimi tetiklenmektedir. Fizyolojik koşullarda hücre çoğalması ve migrasyonu gibi çeşitli hücrel süreçleri düzenleyen ROT üretimi, NADPH oksidaz sistemi tarafından kontrol edilen ve mantarlar gibi patojenlere karşı konak savunmasında kritik bir rol oynayan sinyal ileti yollarında yer almaktadır. NADPH oksidaz enzimlerinin, ROT

indüksiyonu yoluyla proinflamatuvar roller oynadığı düşünülmektedir [41, 42]. İnflamasyona yanıt olarak artan NADPH oksidaz etkinliği sonucu oluşan aşırı ROT'un neden olduğu oksidatif stres endotel hücrelerde işlev bozukluğuna katkıda bulunmaktadır. Artan ROT'un neden olduğu oksidatif stres ise İ/R patojenezinde yer alan farklı mekanizmalardan biridir. NADPH oksidaz enziminin etkinliği ile oluşan süperoksit radikalının NO ile tepkimesi sonucu oluşan ve güçlü oksidan özelliğe sahip peroksinitritin endotel hücreleri ve damar düz kas hücrelerinde lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, protein nitrasyonu ve hücre ölümüne neden olarak inflamatuvar yanıtlara aracılık ettiği bilinmektedir [43, 44].

Artan ROT üretimi, etkin olan nötrofillerden *pore-forming* moleküllerin saliverilmesi hidrolitik enzimlerin saliverilmesi ve iskemik dokuda parenkimal hücrelerin zedelenmesi ile sonuçlanmaktadır. Endotel hücrelerinden süperoksit radikali oluşumunun arttığı reperfüzyonun başlangıç döneminde, NO oluşumunun azalması endotel hücrelerinden TNF- α ve trombosit etkinleştirici faktör (*platelet activating factor*; PAF) gibi inflamatuvar mediyatörlerin saliverilmesine ve adezyon moleküllerinin biyosentezinin artışıyla lökosit-endotel hücre adezyonuna neden olmaktadır [15, 38].

TNF- α ve IL-1 β gibi pro-inflamatuvar stokinler, kendi reseptörleri aracılığı ile hücre içi sinyalizasyonu başlatarak mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (*mitogen-activated protein kinase*; MAPK) ların etkinleşmesine, ardından da protein ilişkili transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesi olan ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (*inducible nitric oxide synthase*; iNOS) gibi çeşitli enzimlerin genlerinin ekspresyonunu başlatan *nükleer faktör κ B* (NF- κ B)'nin etkinleşmesine neden olmaktadır [45]. Etkinleşen NF- κ B, IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler ile vasküler hücre adezyon molekülü (*vascular cell adhesion molecule*; VCAM)-1, interselüler adhezyon molekülü (*intracellular cell adhesion molecule*; ICAM)-1 ve E-selektin gibi adezyon molekülleri ile siklooksijenaz (*cyclooxygenase*; COX)-2 ve iNOS gibi enzimlerin de dahil olduğu inflamatuvar ve immün yanıtlardan sorumlu çok sayıda genin transkripsiyonunu başlatmaktadır [46-49].



Şekil 2.2. MAPK etkinliğinin başlattığı hücresel yanıtlar. MAPK, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (mitogen-activated protein kinase).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, etkinleştirilmiş ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (extracellular signal-regulated kinase; ERK)1/2 ve p38 gibi MAPK'lerin ekspresyonunun proinflamatuvar sitokinlerin ve serbest radikallerin üretiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [50]. MAPK'ler hem doğal hem de kazanılmış immün yanıtlarda temel düzenleyici rol oynayan ve evrimsel olarak korunmuş bir sinyal ileti yoludur [51]. Birçok hücre dışı ve hücre içi uyaranlara duyarlı olan MAPK'ler, diğer sinyal transdüksiyon yollarıyla birlikte gen ekspresyonunu ve hücrenin işlevlerini düzenlenmektedirler [52]. Çevresel etkenler ve proinflamatuvar sitokinler tarafından etkinleştirilebilen MAPK'lerin inflamatuvar yanıt ile belirgin astım ve otoimmün hastalıkların gelişmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. İnflamatuvar durumlarda en çok etkinleşen sinyal transdüksiyon yolları içerisinde yer alan MAPK'ler NF- κ B gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini etkinleştirerek ve NF- κ B'nin nükleer translokasyonunu artırarak inflamatuvar yanıtlarda rol oynayan çok sayıda mediyatörün gen ekspresyonunu uyarmaktadır [53-58]. Memelilerde 3 farklı MAPK ailesi bulunmaktadır: ERK1/2, p38 MAPK ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) [59-62]. İnflamatuvar yanıtın aracılık ettiği birçok hastalığın patojenezinde rol oynayan MAPK'lerin ana alt familyasına ait ERK1/2 upstream kinazı olan mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (mitogen-activated protein kinase; MEK)1 tarafından treonin ve tirozin bölgelerinden fosforile olarak etkinleşmektedir [63, 64, 65].

ERK1/2 ve p38 MAPK'nin fosforilasyon yolu ile etkinleşmelerinin, NF- κ B etkinliği

aracılığıyla TNF- α ve NO gibi proinflatuvar mediyatörlerin ekspresyonlarını arttırdıkları gösterilmiştir [66, 67].

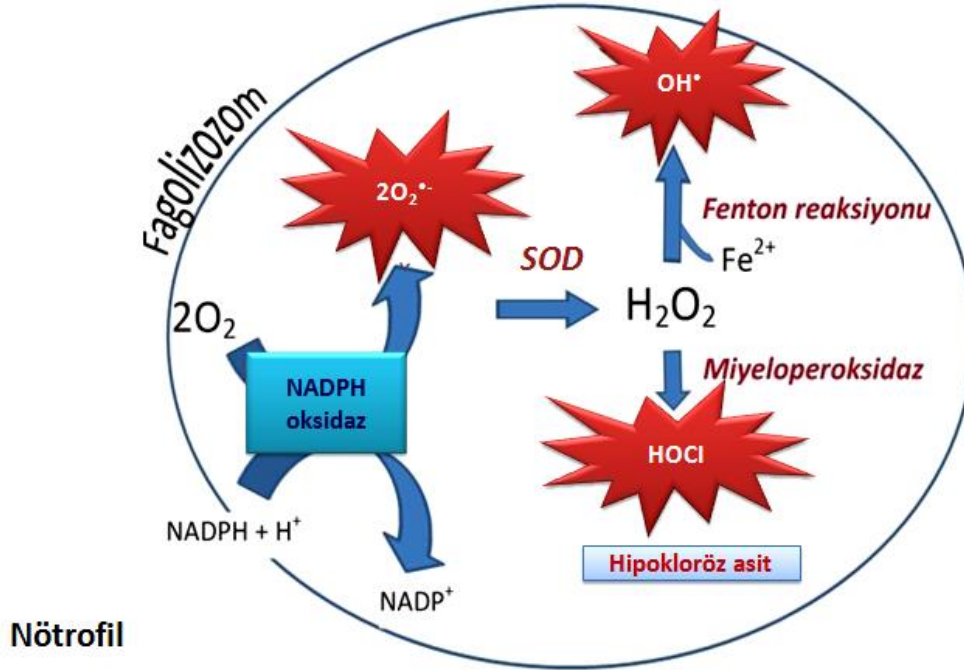
Rel domaini içeren protein ilişkili transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesi olan NF- κ B, inflamatuvar sitokinler ile inflamatuvar ilişkili diğer mediyatörlerin genlerinin düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadır. NF- κ B, ERK1/2, JNK ve *inhibitör kappa kinaz* (*I κ B- α kinase complex*; IKK) ile κ B inhibitörü (*inhibitor of κ B*; I κ B- α)'nın fosforilasyonu ile etkinleşebilmektedir. Trimerik kompleks olarak sitozolde yer alan NF- κ B, p50/p65 protein dimerine ve inhibitör protein I κ B'ye bağlı halde bulunmaktadır. ROT'a bağlı redoks değişiklikleri I κ B'nin alt biriminin fosforilasyonu yoluyla proteolitik parçalanmasına neden olmaktadır. İnhibitör altbirimin ayrılması ile NF- κ B nükleusa geçip deoksiribonükleik asit (*deoxyribonucleic acid*; DNA)'e bağlanmakta ve transkripsiyonu başlatmaktadır [46-49].

İ/R zedelenmesinde önemli rol oynayan bir proinflatuvar sitokin olan TNF- α , birçok hücrede üretilmesi ile birlikte İ/R'deki en büyük kaynağı makrofajlardır. Sentezlendiği makrofajlardan salıverilmesinin ardından tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörleri TNFR-II (p75) ve (TNFR)-I (p55) gibi spesifik reseptörlerine bağlanarak NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin etkinleşmesi ile birlikte gelişen ROT üretimi, adezyon moleküllerinin ve kemokinlerin ekspresyonunu başlatmakta, bu değişiklikler ile postiskemik dokuda nötrofiller güçlenmekte ve etkinliği artmaktadır [38, 40].

Proinflatuvar sitokinlerin üretimini destekleyen ROT, KO ve diğer enzimler tarafından üretilmektedir. Endotel hücreler ve lökositlerin yüzeyindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttıran ROT, adezyon önleyici etkisi olan NO düzeylerini azaltmaktadır. İskemi sonrası endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) etkinliği ve guanilil siklaz oksidasyonundaki düşüş ile daha da artan bu etkiler ise İ/R ile ortaya çıkan inflamatuvar yanıtın büyümesine aracılık etmektedir. Bunun yanı sıra mast hücreleri ve makrofajlar gibi perivasküler hücreler etkinleşmekte, TNF- α gibi inflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesi gerçekleşmekte ve sonuçta bu olaylar ile lökositler postkapiller venül endoteliumu ile adezif etkileşimlere başlamaktadır. Trombositler, postiskemik mikrovasküleritede lökositlerin adezyonunda önemli rol oynamakta, etkinleşen lökositler dokuya göç ederken, hidrolitik enzimler ve oksidanların salıverilmesiyle mikrovasküler işlev bozukluğu oluşmaktadır. Ayrıca lökositler arteriyollerde endoteliuma bağımlı işlev bozukluğuna neden olmakta, lökosit/endotel hücre adezif etkileşimi, mikrosirkülasyonda kapiller, postkapiller ve arteriyoller venül işlev bozukluklarına zemin hazırlamaktadır [71].

Nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili elastaz, miyeloperoksidaz (*myeloperoxidase*; MPO) ve NADPH oksidaz enzimlerini içeren ve serbest radikal oluşumuna neden olan bir kaynaktır. Nötrofillerin etkinleşmesiyle artan KO ile ROT, solunum patlaması olayını gerçekleştirmektedir. İskeminin ardından reperfüzyon ile dokuya giren oksijenin büyük

kısmı NADPH oksidaz ile süperoksit radikallerine dönüşmektedir. Süperoksit radikali hidrojen peroksit'e dönüşmektedir. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında MPO aracılığı ile çok güçlü bir oksidan olan hipokloröz asite indirgenmektedir [Şekil 2.3] [14, 72, 73].



Şekil 2.3. İ/R’de fagositik hücrelerin iskemik alana göçüyle meydana gelen “solunum patlaması” olayı. NADPH, Nikotinamit adenin dinükleotit fosfat; NAD, Nikotinamit adenin dinükleotit; SOD, süperoksit dismutaz; H^+ , hidrojen iyonu; $O_2^{\bullet-}$, oksijen radikali; $OH^{\bullet}$, hidroksil radikali; Fe^{2+} , demir iyonu; H_2O_2 , hidrojen peroksit.

Nötrofillerin dokuya girebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler C3a, IL-1, PAF, lökotrien B4 (LTB4) ve prostaglandin türevleridir ve lökositler tarafından üretilen serbest radikaller ile etkileşen bu maddeler, mast hücrelerinden selektin ve ICAM gibi adezyon moleküllerini mobilize eden TNF- α ve IL gibi inflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesine yol açmaktadırlar [14, 74]. Etkinleşen nötrofillerin sekonder granüllerinden salıverilen plazminojen etkinleştiricisi, apolaktoferrin, komplemanı etkinleştiren enzim ve jelatinaz elastaz ve kolajenaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde zedelenmeye yol açmaktadır. Proteolitik enzimlerin etkinleşmesi ile damar duvarı yapısının değişmesi ve bozulması nötrofillerin dokuya göçünü daha da kolaylaştırmaktadır. Bu enzimler etkinleşen trombositler ve damar içinde oluşturdukları agregatlar ile damar endoteline yapışarak, salıverildikleri dokularda yol açtıkları zedelenmenin yanı sıra mikrovasküler tıkanmaya da yol açmaktadırlar [14, 74].

Bunların yanı sıra İ/R ile gelişen oksidatif stres endotel hücrelerinin etkinliğine ve işlevlerinin bozulmasına neden olmakta, bunun sonucunda ise kompleman sistem etkinleşmekte ve proinflamatuvar mediyatörler oluşmaktadır. Kompleman sistemden

anaflatoksik etkili C3a ve C5a, lökosit etkinliğini sağlamaktadır. Kompleman sistem, TNF- α , IL-1, IL-6, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a ve MIP-1b üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı artırırken E-selektin, P-selektin, VCAM-1 ve ICAM-1 gibi lökosit adezyon moleküllerinin sentezini de uyarmaktadır [15].

2.1.4. İ/R ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, aşırı ROT üretimi ve antioksidanlar arasındaki dengesinin prooksidanlar yönünde bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Hücrede antioksidan sistemin oksidanların etkisini tamamen önleyememesi durumunda oksidatif stres ortaya çıkmakta ve bununla birlikte oluşan reaktif oksijen türleri özellikle lipid, protein ve DNA yapılarına zarar vermektedir [75-80]. Ateroskleroz, insan bağışıklık yetmezlik virüsü (*human immunodeficiency virus*; HIV) enfeksiyonu, malignite, kronik inflamasyon, yaşlanma, kanser, kas hastalıkları ve *dibetes mellitus* gibi birçok klinik durumun patolojisinde yer alan oksidatif stres, İ/R zedelenmesinde de önemli rol oynamaktadır [81-94].

İ/R sırasında aşırı ROT üretimi, oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres hücre içi kalsiyum düzeyleri, membran fosfolipit proteazlar, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, ve ATP tüketiminde değişikliğe neden olmaktadır [81-94].

Direkt olarak hücreleri etkileyen iskemi, oksijen yetersizliği nedeniyle farklı yoğunluktaki hücresel olayları, sitotoksik enzimlerin etkinliğini ve hücre ölümleri ile sonuçlanan ciddi olayları tetiklemektedir [81-94].

İskemi boyunca yaşanan oksijen eksikliği nedeniyle mitokondride oksidatif fosforilasyon gerçekleşmemekte, hücre için gerekli enerji anaerobik metabolizma ile sağlanmaktadır. Ancak ATP'nin yeniden sağlanması için bu durum yeterli değildir ve ATP eksikliği membranda iyonların aktif transportunu etkileyerek Ca ve Na birikimine yol açmaktadır. Difüzyonla hücrelerde biriken su nedeniyle gerçekleşen dengesizlik organel içinde şişliğe, mitokondride ayrışmaya, endoplazmik retikulumda veziküllerin oluşumuna ve genişlemesine neden olmaktadır. Sitotoksik enzimlerin salıverilmesi ve lizozomlardaki parçalanma ise hücreyi ölüme götüren son olayların göstergesidir [81-94].

Endotelial hücrelerin sitoskeletal morfolojilerini değiştiren hipoksi ile birlikte küçük hücre içi porlar gelişmektedir. Bu porlar doku ödemeine yol açan, endotelium geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır. Kan akışındaki bozulma vazokonstriktör ve vazodilatör moleküllerin üretiminde dengesizliğe neden olmaktadır. Oksijen yetersizliği nedeniyle endoteliumda endotelin 1, 2 ve 3 gibi güçlü vazokonstriktör mediyatörlerin üretimi artarken, NO gibi vazodilatör mediyatörlerin üretimi azalmaktadır. Özellikle endotelial hücreler ve lökositlerde iskemi ile başlayan bu değişiklikler, reperfüzyon ile birlikte doğrudan ROT üretimi, nötrofil ve

trombosit etkinliği, vasküler geçirgenlikte artış, kompleman sistem, sitokinler ve endotelial hücre zedelenmesi ile ilişkili daha ileri zedelenmeye yol açmaktadır [81-94].

ROT üretimi, moleküler oksijenin süperoksit radikale indirgenmesi ile mitokondriyal matrikste elektron transport zinciri yoluyla gerçekleşmektedir. İskemi ile birlikte dokuda bir dizi kimyasal tepkime başlamaktadır. Toksik oksijen metabolitlerinin birikiminin ve enerji azalmasının hücre ölümüne katkıda bulunduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Reperfüzyon hızlıca enerji ihtiyacını sağlayarak, toksik metabolitleri uzaklaştırmakta ve organ zedelenmesini önlemektedir ancak iskemik doku zedelenmesine neden olan mekanizmaların güçlenmesine de katkı sağlamaktadır [81-94].

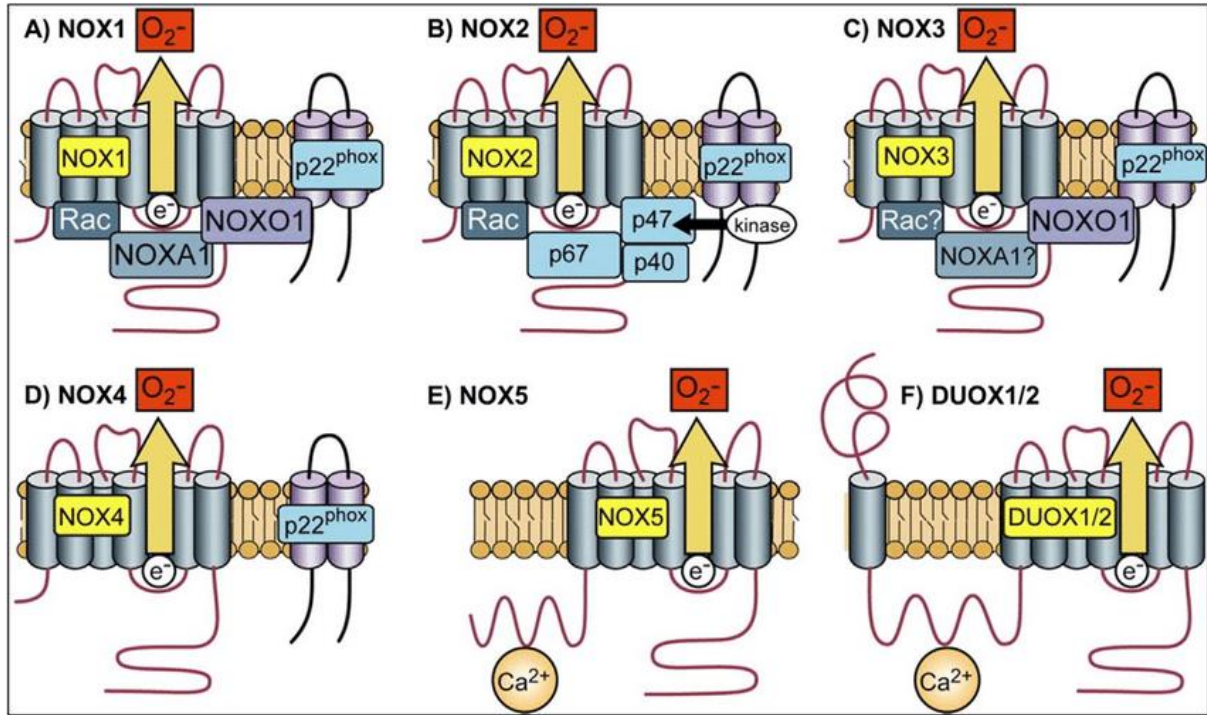
Serbest oksijen radikallerinin oluşmasıyla organizmada bir dizi radikal tepkime oluşmakta ve bu radikaller ortaklaşmamış elektronlarından dolayı hücreler olarak çok önemli karbonhidrat, protein, lipid ve DNA gibi yapılarda oksidatif zedelenmelere neden olmaktadır [95-96].

İ/R zedelenmesinden sorumlu olan ROT'ların üretimi genel olarak, NADPH oksidaz, nitrik oksit sentaz (NOS), immün hücreler, mitokondriyal işlev bozukluğu ve KO aracılığıyla gerçekleşmektedir [97].

2.1.4.1. NADPH Oksidaz Aracılıklı ROT Üretimi

İ/R sırasında çeşitli hücrelerde aşırı miktarda süperoksit oluşumuyla sonuçlanan NADPH oksidazlar etkinleşmektedir [98]. İskemiyi takiben reperfüzyonun başlaması ile dokuya sunulan oksijenin büyük kısmı NADPH oksidaz etkinliği sonucunda süperoksit radikallerine dönüşmektedir [97, 72, 73].

NADPH oksidaz (NOX) enzim ailesi, NADPH oksidaz (NOX)1-5 ve dual etkili NADPH oksidaz (DUOX)1-2'den oluşmaktadır. Santral ve periferik sistemlerde bulunan ana izoformları NOX-1, NOX-2 (gp91^{phox}) ve NOX-4 olarak bilinmektedir [99]. NOX ve DUOX yapıları benzer olmakla birlikte hem, flavin adenin dinükleotid (FAD) ve NADPH bağlanma bölgeleri içermektedirler. Ayrıca DUOX enzimleri 7 transmembran heliks yapı ve peroksidaz etkinliğine sahiptir [100]. NADPH oksidaz enzim kompleksi etkinleştğinde sitozolik NADPH'den kopan 1 elektron ekstraselüler kısımda bulunan oksijene taşınmaktadır. DUOX ve NOX enzimlerinin vücutta dağılımı izoform çeşidine göre değişmektedir.



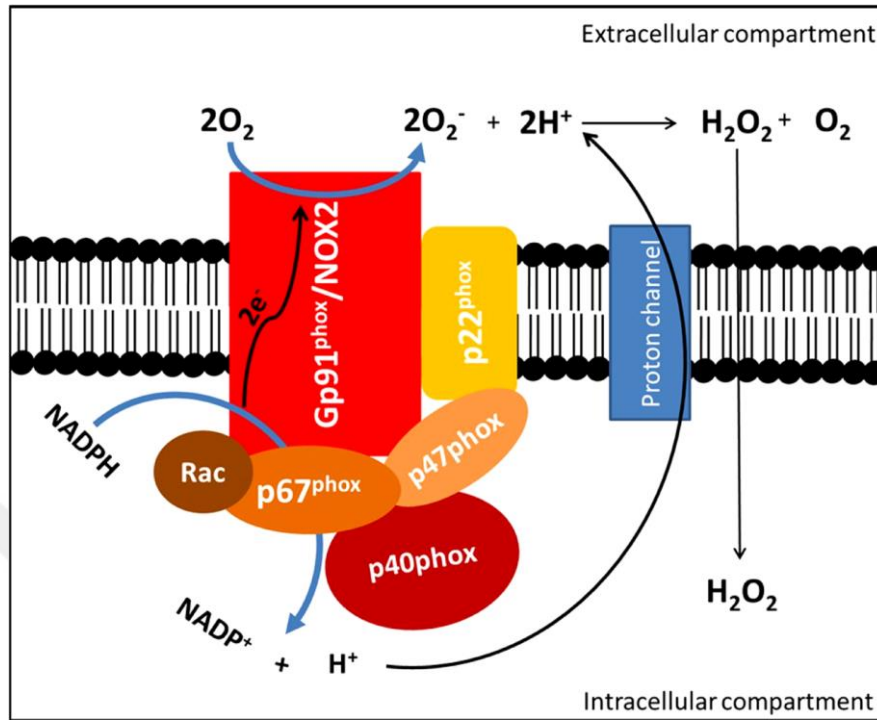
Şekil 2.4. NADPH oksidaz ailesinin yapısı [101]. *NOX*, NADPH oksidaz; *phox*, phagocytes oxidase; *DUOX*, dual oksidase.

NADPH oksidaz, ROT üretiminden sorumlu başlıca enzim olup oksidan üretimini yaklaşık 50-100 kat arttırabilmektedir [102]. NOX enzim kompleksi, substrat nikotinamid adenin dinükleotit fosfatını (NADPH) NADP'ye oksitleyerek bir elektronu sitoplazmadan fagositik bir vaküole transfer etmektedir [103]. Fagozom olarak da adlandırılan vakuolün lümeninde, moleküler oksijen bu elektron tarafından büyük miktarlarda süperoksit radikali indirgenmektedir. Bu sistem nötrofiller, makrofajlar ve monositler gibi patojen ölümden sorumlu hücrelerde oldukça aktiftir ve bu durum etkin NOX tarafından üretilen ROT'un bazı patolojileri, özellikle de inflamatuvar ile belirgin hastalıkları kötüleştirebileceğini göstermektedir [104].

İlk olarak nötrofillerde keşfedilen ve çok birimli kompleks altbirimlerden oluşan NADPH oksidazın sitozolik komponentleri $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ ve $p67^{phox}$ iken membranda bulunan komponentleri $p22^{phox}$ ve $gp91^{phox}$ 'tur [105]. $p22^{phox}$ ve $gp91^{phox}$ 'un ko-ekspresyonu NADPH oksidaz enzim kompleksinin etkinleşmesi için temel ihtiyaçtır. Bu komponentler bir araya gelerek NADPH oksidaz enzimini etkinleştirmekte ve elektron transferi ile oksijenin süperoksit iyonuna dönüşümüne aracılık etmektedirler [106].

NADPH oksidaz enziminin etkinleşmesi ile birlikte fosforilasyonu artan $gp91^{phox}$, moleküler oksijenin süperoksit iyonuna dönüşümüne aracılık ederek ROT üretimini arttırmaktadır. $gp91^{phox}$ tarafından üretilen ve güçlü bir oksidan ve nitratlayıcı molekül olan

süperoksit NO ile reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturmaktadır [şekil 2.5.] [106].



Şekil 2.5. NOX2 enzim kompleksinin şematik gösterimi [107]. *NADPH*, Nikotinamit adenin dinükleotit fosfat; *NOX*, NADPH oksidaz; *NAD*, Nikotinamit adenin dinükleotit; *O₂*, moleküler oksijen; *O₂⁻*, oksijen radikali; *H⁺*, hidrojen iyonu; *H₂O₂*, hidrojen peroksit.

Oldukça güçlü bir oksidan olan peroksinitritin toksik etkileri direkt olarak kendisinden veya nitrojen dioksit radikali veya hidroksil radikali benzeri ürün oluşturması ile ortaya çıkmaktadır. Peroksinitrit sülfidril gruplarını okside etmesi, transport proteinleri ile enzimlerini inaktive etmesi, lipid peroksidasyonunu başlatması ve DNA hasarı oluşturmasından dolayı oldukça sitotoksiktir. Peroksinitritin tirozin türevlerini nitratlaması stabil bir ürün olan ve plazmada ve dokuda peroksinitrit oluşumunun bir göstergesi olarak değerlendirilen nitrotirozin oluşumuyla sonuçlanmaktadır [101, 108].

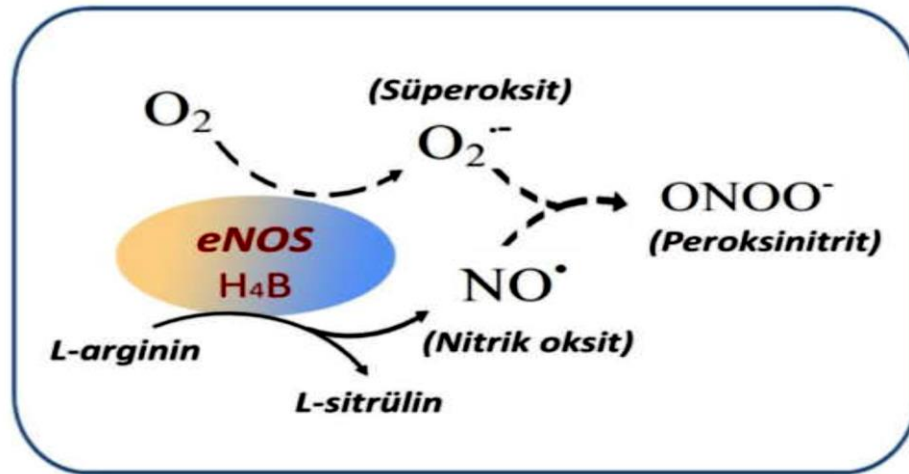
2.1.4.2. NOS Aracılıklı ROT Üretimi

Dokularda oksijen varlığında tetrahidrobiopterin kofaktörü ile arjininin sitrülline oksidasyonundan sentezlenen NO, oldukça kompleks bir etki mekanizmasına sahiptir ve bu etki mekanizması İ/R zedelenmesinde kritik rol oynamaktadır. NO, NOS ailesinden eNOS, iNOS ve nöronal NOS (nNOS) tarafından sentezlenmektedir. NO'nun etkileri üretim yeri ile hızına göre değişiklik göstermektedir. iNOS enzimi, ekspresyonu arttığı durumlarda NO aracılıklı hücre

ölümü ve doku zedelenmesine neden olmaktadır [109, 110]. Fizyolojik koşullarda eNOS tarafından az miktarda üretilen NO düşük konsantrasyonlarda lökosit adezyonunu önleme, trombosit işlevleri ile hücre içi sinyal iletimini düzenleme ve vazodilatasyon gibi çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almakta iken, inflamasyonla tetiklenen aşırı ve kontrolsüz NO sentezi ise hücrede zararlı etkilere yol açarak birçok patolojik duruma neden olabilmektedir [97, 111].

NO, İ/R'de oksidatif stres süreçlerinde oluşan süperoksit radikalleri ile tepkimeye girerek oldukça reaktif ve toksik bir RNT olan peroksinitrit (*peroxynitrite*; ONOO^-) ve nitrojen trioksit (N_2O_3) oluşumuna neden olmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda karbonhidratlar, lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi moleküllerle etkileşmeye girerek oksidasyonlarına yol açan peroksinitrit, inflamasyon, ateroskleroz ve İ/R gibi patolojilerde rol oynamaktadır [112]. Peroksinitrit ve nitrojen trioksit oluşumu NO miktarının azalmasına neden olduğundan NO'nun koruyucu etkilerini de engellemektedir. NO ile birlikte arjininin ve tetrahidrobiopterinin azalması da NOS'un süperoksit radikali üretimine yol açmakta ve *eNOS-uncoupling* olarak adlandırılmaktadır [Şekil 2.5] [97, 111, 112].

NO ayrıca $\text{gp91}^{\text{phox}}$ ve p47^{phox} tarafından üretilen süperoksit ile reaksiyona girerek, nitrotirosin oluşumuna neden olarak kronik inflamatuvar hastalıklarda NO-bağımlı patojenik mekanizmada yer almaktadır [111, 113].



Şekil 2.6. İskemi/Reperfüzyon'da NO sentezi [97]. *eNOS*, endotelial nitrik oksit; *H₄B*, tetrahidrobiopterin; *ONOO⁻*, peroksinitrit; *NO[•]*, nitrik oksit; *O₂⁻*, süperoksit; *O₂*, oksijen.

2.1.4.3. İmmün Hücre Aracılıklı ROT Üretimi

Endotel hücreler ve iskemik dönemin ardından reperfüzyonla bölgeye gelen nötrofiller ile inflamatuvar hücreler arasındaki etkileşim İ/R zedelenmesinde ROT üretiminin kaynaklarındandır. İ/R zedelenmesinde PMNL kaynaklı ROT üretimi önemli rol oynamaktadır

[97, 40, 113-120].

Vasküler yatakta bulunan mast hücreleri ve makrofajlar tarafından salıverilen proinflatuvar mediyatörler, endotel hücreleri ve İ/R sırasında dokuda gelişen inflamasyon PMNL'lerin bölgeye migrasyonuna ve adezyonuna yol açmaktadır. İ/R zedelenmelerinde doku düzeyinde ve sistemik dolaşımda nötrofil artışı yapılan birçok çalışmada gözlenmiştir [97, 39, 113-120].

ROT'un tetiklediği inflamatuvar mediyatörlere yanıt olarak etkinleşen fagositik lökositler solunum patlaması adı verilen mekanizma ile oksidan mediyatör oluşumuna yol açmaktadır. NADPH oksidaz ROT üretiminden sorumlu başlıca enzim olup, NADPH oksidaz aracılığıyla oluşturulan süperoksit radikali süperoksit dismutaz (SOD) ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve daha sonra MPO aracılığıyla hipokloröz asit (*hypochlorous acid*; HOCl)'e ya da Fenton tepkimesi ile OH⁻ radikaline dönüşmektedir [97, 40, 113-120].

Bunların yanı sıra PMNL'den TNF- α ve IL gibi sitokin ve kemokinler ile kolejenaz ve elastaz gibi proteazlar salıverilmekte, bu durum bölgeye inflamatuvar hücre toplanmasına ve ROT oluşumunda artışa neden olmaktadır [97, 40, 113-120].

2.1.4.4. Mitokondriyal İşlev Bozukluğu ile ROT Üretimi

Fizyolojik koşullarda hücre içi süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) radikalinin başlıca kaynağı mitokondriyumdur. Hücrelere giriş yapan oksijenin %90'ı elektron transport zincirinde suya indirgenmekte, %1-2'lik kısmı ise elektron transfer zincirinden elektron kaçışına bağlı olarak süperoksit radikaline dönüşmektedir. Süperoksitler fizyolojik koşullarda SOD tarafından hızla elimine edilmektedirler. İskemi sırasında moleküler oksijenin yokluğuna bağlı olarak elektron transfer zincirinde elektron akışı durmakta, elektron transfer zincirinden sızan elektronlar rezidüel oksijenle tepkimeye girerek $O_2^{\bullet-}$ üretimine yol açmaktadır. Reperfüzyon döneminde artan moleküler oksijen ile elektron sızıntısı ve $O_2^{\bullet-}$ miktarı da artmaktadır. Bunların yanı sıra mitokondriyal membran yapılarında serbest radikallerin oluşturduğu zedelenme ile mitokondilerden daha fazla serbest radikal ortama salıverilmektedir [121].

Mitokondriyal ROT üretimine neden olan diğer bir mekanizma monoamin oksidaz (*monoamine oxidases*; MAO) enzimidir. Mitokondri dış zarında bulunan MAO, nörotransmitter reaminasyonundan sorumlu olup, tepkime sırasında yan ürün olarak oksidan H_2O_2 üretilmektedir [121].

2.1.4.5. KO Aracılıklı ROT Üretimi

KO, çoğu organda ve sistemik damar düzeninde reaktif oksijen türlerinin birincil üretim

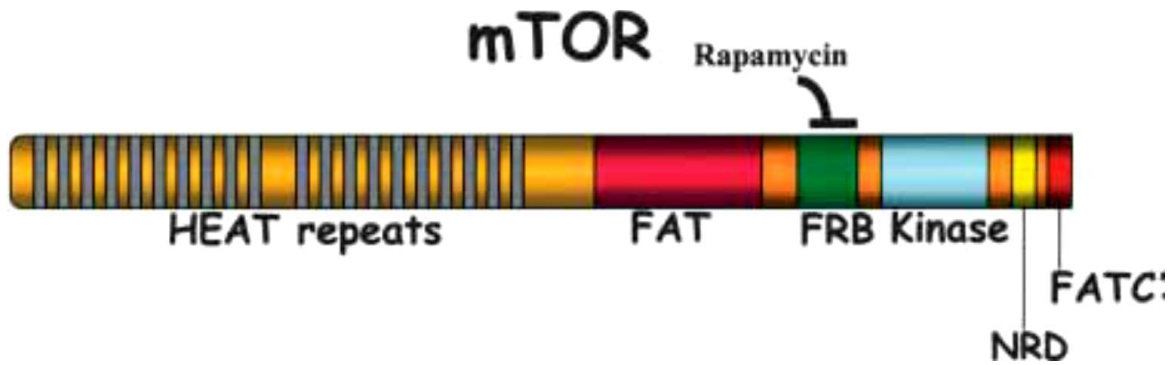
kaynağıdır [121].

İskemik dönemde ATP üretimi durmakta, hücre içerisinde bulunan ATP'nin yıkıma uğramasıyla ise sırasıyla adenosin difosfat (*adenosine diphosphate*; ADP), adenosin monofosfat (*adenosine monophosphate*; AMP), adenosin, inozin ve hipoksantin açığa çıkmaktadır. Mitokondriyal enerji üretiminin durması ile hücrede oluşan enerji kaybı, membrandaki enerji bağımlı iyon pompalarının işlevinin bozulmasına ve hücre metabolizmasının anaerobik faza geçmesine neden olmaktadır. Hücre içerisinde biriken laktat ve hidrojen pH düşmesi ile asidoz oluştururken, artan hücre içi H^+ yükünü dengelemek için Na^+-H^+ pompası ile hidrojen hücre dışına atılmaktadır. Na^+-Ca^{+2} pompası ile de kalsiyum hücre içine geçmektedir. Aynı zamanda zedelenen endoplazmik retikulum da hücre içine kalsiyum salıverilmesine neden olarak hücre içi kalsiyumun artmasına yol açmaktadır. Hücre içi kalsiyum artışı kalsiyum bağımlı sitozolik proteazları etkinleştirmektedir ve etkinleşen proteazlar hücredeki KDH enziminin KO'ya dönüşümüne neden olmaktadır. Bu olay geri dönüşümlü olarak KDH'nin sülfidril gruplarının oksidasyonu ve sitozol içerisinde ve ekstrasellüler ortamda artan kalsiyum tarafından etkinleşen proteazlar yoluyla geri dönüşümsüz olarak gerçekleşen proteolizi ile olmak üzere iki mekanizma ile meydana gelmektedir [97, 81-94, 122-127].

Fizyolojik koşullarda hipoksantin, elektron alıcı olarak nikotinamid adenin dinükleotit (*nicotinamide adenine dinucleotide*; NAD⁺) kullanılarak KDH tarafından ksantin ve ürik aside dönüştürülmekte, İ/R'de ise hipoksantin KO tarafından reperfüzyonla gelen oksijeni kullanarak hipoksantini önce ksantine daha sonra da ürik aside dönüştürmektedir. Son iki basamakta ürün olarak oluşan O_2^- radikali, fizyolojik koşullarda SOD enzimi ile önce H_2O_2 'ye sonra da katalaz enzimi ile H_2O 'e dönüştürülmektedir. Ancak İ/R'de KO etkisiyle artan O_2^- ve H_2O_2 antioksidan kapasiteyi aşmakta ve bu nedenle etkin bir şekilde temizlememektedir. Daha sonra H_2O_2 , süperoksit radikalleri ya da demir (Fe^{2+}) gibi geçiş metalleri ile Fenton ve Haber-Weiss tepkimesine girerek en güçlü radikal olduğu bilinen hidroksil (OH^-) radikalini oluşturmaktadır. ROT miktarındaki bu artış hücre içi proteinlerin yapı ve işlevlerinde bozulma, hücre membranlarındaki lipid yapılarında ve DNA'da yapısal zedelenmeye neden olarak hücre zedelenmesine aracılık etmektedir [97, 81-94, 122-127].

Mayalarda keşfedilmiş olan TOR'un, memelilerin de dahil olduğu ökaryotik canlılara kadar evrimsel olarak korunduğu tespit edilmiştir ve mTOR olarak adlandırılmıştır [9, 133, 134, 135].

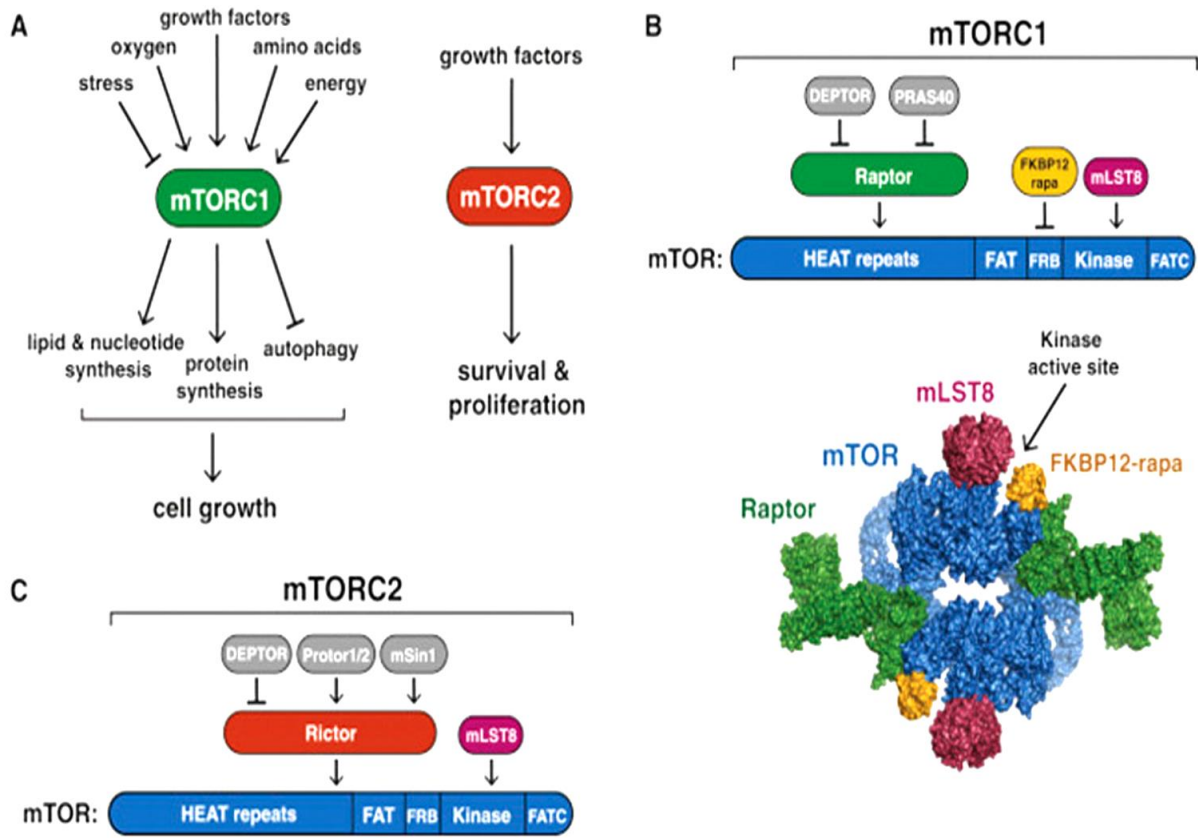
TOR'lar, birbirinden farklı ve yapısal olarak korunmuş alanlar içeren yüksek molekül ağırlıklı proteinlerdir. 2549 amino asit içeren mTOR çok çeşitli etki alanlarından oluşmaktadır [Şekil 2.8] [136]. N-terminal bölgesinde 20 adet birbirini izleyen HEAT (*for Huntingtonton, EF3, A subunit of PP2A, TOR1*) tekrarlarına sahiptir. Her bir HEAT tekrarı, her biri 40 amino asit içeren ikili α sarmalından oluşmaktadır. Tekrarlayan HEAT dizileri birçok proteinin yapısında bulunmakta ve protein-protein etkileşiminde rol oynamaktadır [135]. mTOR'un C-terminal ucu phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) ile katalitik dizi benzerliğine sahip kinaz bölgeleri içeren mTOR PI3K-kinaz-ilişkili kinaz (*PI3K-kinaserelated kinase*, PIKK) olarak adlandırılan kinaz ailesinin bir üyesi olarak değerlendirilmektedir. Katalitik bölgenin hemen ardından FRB alanı gelmektedir. mTOR yapısında bulununan bir diğer alan ise diğer PIKK proteinlerinde de bulunan, nispeten daha büyük FAT (*the rapamycin-associated protein [FRAP]-ataxia telangiectasia mutated [ATM]-transformation/transcription domain-associated protein [TRRAP]*) bölgesidir. C-terminal ucu, FATC olarak adlandırılan başka bir FAT alanı içermektedir. FATC alanı, mTOR etkinliği için gereklidir ve bu alandan tek bir amino asidin bile silinmesi mTOR etkinliğini durdurabilmektedir. FATC ve FAT alanlarının, katalitik alanı ortaya çıkaran bir konfigürasyon sağlamak üzere etkileşime girdiği öne sürülmüştür. mTOR ayrıca, katalitik ve FATC alanları arasında olduğu varsayılan bir negatif düzenleyici alan (*negative regulatory domain*; NRD) içermektedir [135].



Şekil 2.8. mTOR'un temel yapısı [136]. HEAT, *Huntington, elongation factor 3*; FAT, *The rapamycin-associated protein (FRAP)-ataxia telangiectasia mutated (ATM)-transformation/transcription domain-associated protein (TRRAP)*; FRB, *FK506 binding protein (FKBP12)/rapamycin-binding domain*; NRD, *negative regulatory domain*; FATC, *FAT carboxy-terminal homology domain*.

Bir serin/treonin kinaz olan mTOR, mTOR kompleksi 1 (mTORK1) ve mTORK2 olmak üzere iki ayrı protein kompleksi oluşturmak üzere birçok farklı protein altbirimleri ile

etkileşime girmektedir [137]. mTORK1, rapamisine duyarlı bir komplekstir, mTOR'un yanı sıra *regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin* (Raptor), *mammalian lethal with sec-13 protein 8* (mLST8), *proline-rich Akt substrate 40 kDa* (PRAS40) ve *DEP domain containing mTOR-interacting protein* (DEPTOR)'den oluşmaktadır. mTORK1 gibi mTORK2 de mLST8 içermektedir, ancak mTORK2 raptor yerine, *mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1* (mSin1) ve *rapamycin intensive companion of mTOR* (rictor) olmak üzere iki spesifik protein içermektedir. mTORK1'den farklı olarak, mTORK2 rapamisine karşı duyarsızdır [138, 139, 140].



Şekil 2.9. mTORK1 ve mTORK2 (A) mTORK1 ve mTORK2 sinyal ileti yolu (B)mTORK1 alt birimleri ve mTOR'daki ilgili bağlanma bölgeleri (C) mTORK2 alt birimleri ve mTOR'daki ilgili bağlanma bölgeleri [141]. *mTOR*, *mammalian target of rapamycin*; *Depto*, *DEP domain containing mTOR interacting protein*; *PRAS 40*, *proline-rich Akt substrate 40*; *Raptor*, *regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin*; *FKBP12*, *rapamisin*; *mLST8*, *mammalian lethal with sec-13 protein 8*; *mSin 1*, *Protor1/2 mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein*; *Rictor*, *rapamycin insensitive companion of mTOR*; *HEAT*, *Huntington, elongation factor 3, the regulatory a subunit of protein phosphatase 2A*; *FAT*, *The rapamycin-associated protein (FRAP)-ataxia telangiectasia mutated (ATM)-transformation/transcription domain-associated protein (TRRAP)*; *FRB*, *FK506 binding protein (FKBP12)/rapamycin-binding domain*; *HEAT*, *Rictor, rapamycin-insensitive companion of mTOR*; *FATC*, *FAT carboxy-terminal homology domain*.

mTORK1'in etkinleşmesi, *downstream* efektör moleküllerinden *ribosomal protein S6 kinase 1* (S6K1) ve *eIF4E binding protein 1* (4EBP1)'in fosforilasyonu yoluyla, mRNA sentezinde bir artışa ve hücre büyümesi sırasında protein sentezini destekleyen ribozomal proteinlerin translasyonuna yol açmaktadır [141].

mTORK1 hücre büyümesi ve proliferasyonu gibi birçok sürecin düzenlenmesi için gerekli olan hücre içi ve hücre dışı sinyalleri algılayıp bütünleştirerek anabolik hücresel süreçleri artırmakta ve katabolik hücresel süreçleri ise inhibe etmektedir. mTORK1'e bağımlı protein sentezi, hücre büyümesi, çoğalması, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve hücre metabolizması; büyüme faktörleri, aminoasit gibi besin maddeleri ve enerji ile artmaktadır. [138,139,142,143].

mTORK1'in aksine, mTORK2'nin biyolojik etkileri hakkındaki bilgiler sınırlı olmasına rağmen mTORK2'nin hücre yaşamında ve büyüme faktörleriyle hormonlara cevap olarak hücre iskeleti organizasyonunda rol oynadığı kanıtlanmıştır [137].

mTORK2'nin tanımlanan ilk substratı olan Akt, bir serin/treonin kinazdır ve protein kinaz B olarak da bilinmektedir [144]. Büyüme faktörleri tarafından uyarılan mTORK2'nin Akt'yi fosforilleyerek hücre yaşamında rol oynadığı düşünülmektedir. Etkinleşen Akt, hücre döngüsü, büyümesi, proliferasyonu, apoptoz ve glukoz metabolizması gibi farklı hücresel süreçleri düzenlemektedir [137, 145-148].

Büyüme faktörü aracılıklı PI3K sinyal ileti yolunda, Akt'nin etkinleşmesi için Thr³⁰⁸ bölgesinden fosfotidil-3-bağımlı kinaz (*phosphotyrosine-3-dependent-kinase*; PDK) 1 tarafından ve hidrofobik motif olan Ser⁴⁷³ (*hydrophobic motif*; HM) bölgesinin de mTORK2 tarafından fosforillenmesi gerekmektedir [144, 147, 149]. Bunun yanı sıra mTORK2, *serum and glucocorticoid-induced protein kinase* (SGK1)'ı Ser422 bölgesinden, protein kinaz C (*protein kinase C*; PKC) α 'yı da Ser657 bölgesinden fosforillemektedir. mTORK1'in substratı S6 kinaz (S6K)1 ve mTORK2'nin substratları ise Akt, SGK1 ve PC α ; AGC kinazlar olarak tanımlanmaktadır [151-154].

2.3.2. Etkinliğinin Düzenlenmesi

mTOR etkinliği, büyüme faktörleri, enerji ve stresi de içeren *upstream* sinyaller ile düzenlenmektedir [137].

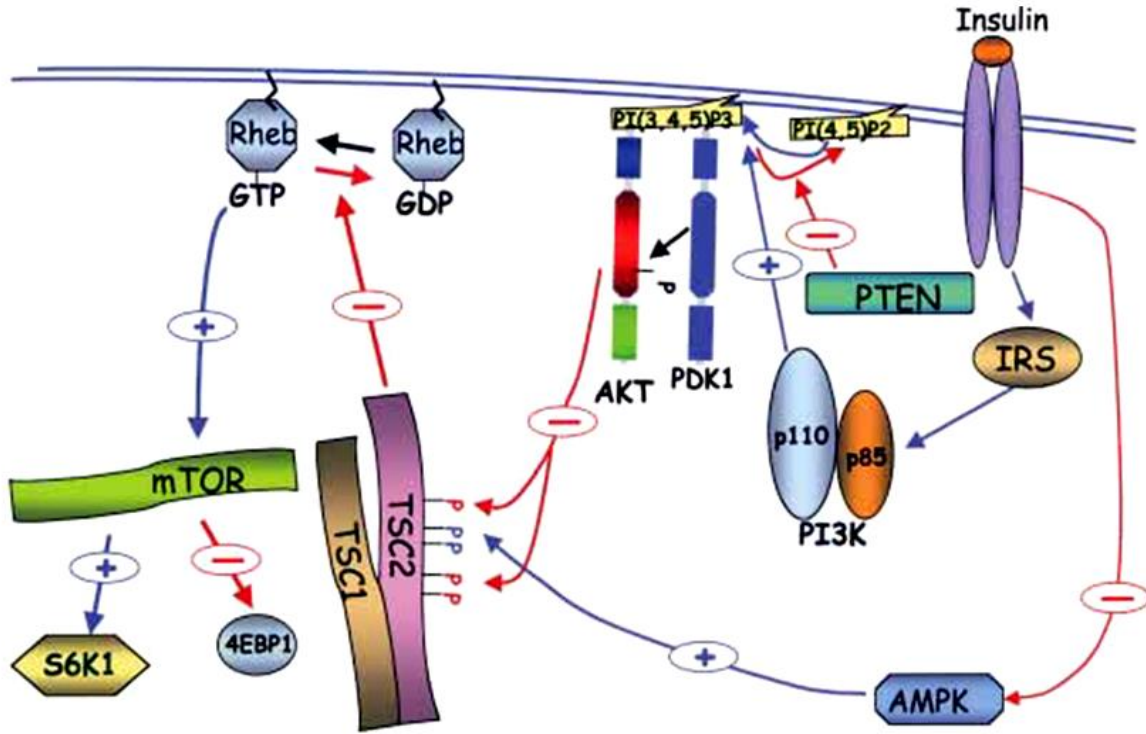
mTOR etkinliğini düzenleyen büyüme faktörlerinden insülin benzeri büyüme faktörü tip 1 (*type 1 insulin-like growth factor* (IGF-1)'in liganda bağlanmasına yanıt olarak transmembran tirozin kinaz olan *IGF-1 receptor* (IGFR) etkinleşmektedir. Etkinleşen IGFR, sırayla *the insulin receptor substrates 1-4* (IRS1-4) ve *src-and collagen-homology* (SHC) adaptör proteinlerini fosforlamaktadır. IRS'in fosforillenmesi, PI3K'nın p85 altbirimini ve p110 katalitik altbiriminin

sinyallerini kuvvetlendirerek PI3K'nın etkinleşmesini sağlamaktadır. Etkinleşen PI3K, fosfatidilinozitol 4,5- bifosfat (*phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*; PIP₂)'ın fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (*phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*; PIP₃)'a dönüşümünü katalizlemektedir. PIP₃ miktarındaki artış ile birlikte Akt etkinliği gerçekleşmektedir. mTOR'un pozitif düzenleyicileri olan PI3K ve Akt'nin etkinleşmesi S6K1 ve 4E-BP1'in fosforilasyonuna yol açmaktadır. Uyarıcı bir etki olmadığında *eukaryotic initiation factor 3* (eIF3) proteinine bağlı halde ve etkisiz olan S6K1 ve 4EBP1, mTORK1'in eIF3'e bağlanması ile fosforile olmaktadır. Fosforile S6K1 eIF3'ten ayrılarak etkinleşmekte ve etkinleşen S6K1 40s ribozomal altbirimi gibi hücrel substratları fosforile ederek translasyona ve büyümeye aracılık etmektedir. İşlevsel olarak *eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E) proteine bağlı halde bulunan 4EBP1, mRNA translasyonunu inhibe etmektedir. 4EBP1'in, mTOR aracılığı ile fosforillenmesi, eIF4E'den ayrılmasına, translasyon üzerindeki inhibitör etkinin azalmasına ve translasyonun uyarılmasına neden olmaktadır [135, 137, 155-157].

Tüberin olarak da adlandırılan *tuberous sclerosis complex* (TSC) heterodimer yapıda olup, TSC1 ve TSC2 altbirimlerini içermektedir. TSC1/2 kompleksi PI3K/Akt sinyal ileti yolundadır ve mTOR işlevlerini baskılayıcı etki göstermektedir. TSC1, bu kompleksi stabilize ederken TSC2, Ras ailesinden olan küçük bir GTPaz molekülü olan *Ras homolog enriched in brain* (Rheb)'e yönelik *GTPase activating protein* (GAP) etkinliğine sahiptir. TSC1/TSC2 heterodimerinin GAP etkinliği, etkin formdaki GTP bağlı Rheb'i etkisiz formdaki GDP'ye bağlı duruma dönüştürerek mTOR etkinliğini azaltmaktadır [158-160].

Fosforile TSC2, fosforile edildiği bölgeye bağlı olarak kendi işlevlerini arttırmakta veya azaltmaktadır [161]. Hücrede enerji miktarının azalmasına bağlı olarak artan AMP ile etkinleştirilen protein kinaz (*AMP-activated kinase*; AMPK) TSC kompleksi etkinleştirebilmektedir. Oksidatif stres, hipoksi ve besin yoksunluğu gibi hücrel ATP düzeyinin düşmesine neden olan herhangi bir stres anında etkinleşen AMPK TSC2'yi Thr1227 ve Ser1345 bölgelerinden fosforilleyerek Rheb'e yönelik GAP etkinliğini artırmakta ve böylelikle mTOR etkinliğini baskılamaktadır [137, 158-160].

Akt'nin, mTORK1 etkinliğini iki farklı şekilde düzenlediği bilinmektedir. Büyüme faktörleri ile etkinleşen Akt, TSC2'yi Thr¹⁴⁶² ve Ser⁹³⁹ bölgelerinden fosforilleyerek TSC2'nin GAP etkinliğini baskılamakta, böylelikle Rheb GTP'ye bağlı etkin formunu sürdürmekte olup TSC1/TSC2'nin mTOR etkinliği üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırmakta ve downstream moleküller olan S6K ve 4E-BP1'i etkinleştirmektedir. Ancak, yüksek enerji düzeylerinde Akt, TSC2'nin Thr1227 ve Ser1345 bölgelerinin AMPK aracılıklı fosforilasyonunu önleyerek mTORK1 etkinliği arttırmaktadır [161-166]. TSC1/2 kompleksini oluşturan TSC1 veya TSC2'den birinin yapısal olarak etkisizleşmesi ile gerçekleşen mTORK1 etkinliği artışı, bu kompleksin mTORK1'in negatif düzenleyici molekülü olduğunu göstermektedir [161].



Şekil 2.10. mTOR etkinliğinin düzenlenmesi [136]. *Rheb*, Ras homolog enriched in brain; GTP, GTPaz-etkinleştirici-protein (guanozin trifosfat), GDP, guanozin difosfat; mTOR, rapamisinin memelilerdeki hedefi (mammalian target of rapamycin); S6K, S6 Kinaz; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E-binding protein; TSC, tuberous sclerosis complex; PIP, fosfotidilinozitol-3,4,5-trifosfat, PTEN, phosphatase and tensin homolog on chromosome 10; IRS, insülin reseptör substrat; PI3K, fosfatidylinositol 3-kinase; AKT, protein kinaz B; AMPK, AMP-ile etkinleştirilen protein kinaz (AMP-activated protein kinase).

mTORK1 etkinliği düşük amino asit düzeyleri ve hipoksi tarafından da negatif olarak düzenlenmektedir. mTORK1'in etkinleştirilebilmesi için özellikle lösin ve arjinin amino asitlerinin, büyüme faktörleri de dahil olmak üzere her *upstream* sinyal yolunda olmaları gerekmektedir. TSC1/TSC2 ekspresyonunun susturulması üzerine amino asit yokluğuna direnç gelişmektedir. Bu durum amino asitler tarafından mTORK1 etkinliğinin düzenlenmesinde TSC1/2'nin de katkıda bulunduğunu göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla the class III PI3K ve *human vacuolar protein sorting 34* (hVps34)'ün amino asitler tarafından etkinleştirildiği ve mTORK1'in amino asit sinyal transdüksiyonuna dahil olduğu gösterilmiştir. Ayrıca mTORK1'in inhibitörlerinden olan RagGTPaz'ın amino asitler tarafından etkinleştirildiği de belirtilmiştir. Sonuç olarak bu farklı çalışmalar mTORK1 üzerinde amino asit sinyal yollarının kompleks ve karmaşık olduğunu göstermektedir [158-167].

TSC1/2 etkinliğini arttıran hipoksi, genotoksik stres, osmotik stres ve mekanik stres durumları mTORK1 etkinliğini azaltmaktadır [168]. mTORK1'in Ser2481 bölgesinin ve 4E-BP1, S6K1, S6 ve eIF4G *downstream* hedeflerinin hızla ve geri dönüşümlü olarak fosforilasyonuna neden olan hipoksinin mTORK1 üzerindeki inhibitör etkisi, hipoksi ve DNA zedelenmesi gibi

stres durumlarına cevap olarak indüklenen *regulated in development and DNA damage response* (REDD)-1 geninin etkinleşmesi ile oluşmaktadır. REDD-1 geni henüz anlaşılamamış bir mekanizma ile TSC işlevlerini etkinleştirerek mTORK1 sinyal iletimini azaltmaktadır [169-175].

mTORK2'nin etkinliğini düzenleyen mekanizmalar ise henüz kesin olarak bilinmemektedir. mTORK1'in upstream düzenleyicisi olarak gösterilen Rheb'in mTORK2'yi negatif ve dolaylı etkilediği gösterilmiştir [156]. İnsülinin, mTORK2'nin *upstream* bölgesinde yer alan PI3K aracılıklı etkilerinde Akt'nin Ser⁴⁷³ bölgesinin mTORK2 aracılıklı fosforilasyonu artmaktadır. Ayrıca PI3K'nın inhibisyonunun mTORK2 etkinliğini azalttığı da gösterilmiştir. mTORK1 etkinliği üzerine baskılayıcı etki gösteren TSC1/TSC2 kompleksinin, mTORK2 etkinliğinin düzenlenmesinde muhtemel efektör moleküller arasında yer aldığı düşünülmekte olup mTORK2 sinyal iletimini arttırmaktadır [168].

mTORK etkinliğinin düzenlenmesinde rol oynayan geri besleme mekanizmaları mTORK etkinliğinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. mTORK1/S6K yolu en az iki farklı geri besleme mekanizması ile PI3K ve mTORC2 etkinliğini baskılamaktadır. IRS proteinlerinin inhibitör Ser/Thr bölgelerinin fosforilasyonuna aracılık eden mTORK1/S6K1 yolu, IRS'nin PI3K'dan ayrılmasına ve böylece PI3K etkinliğinin azalmasına yol açmaktadır. Ayrıca S6K1 mTORK2'nin *rictor* bileşenini Thr¹¹³⁵ bölgesinden fosforilemekte ve mTORK2 etkinliğini azaltmaktadır [168].

2.3.3. Ekspresyonu ve Patofizyolojik Olaylardaki Rolü

İmmün sistem hücrelerinin işlevi ve canlılığının düzenlenmesinde etkili PI3K/Akt/mTOR sinyal ileti yolu; nötrofil hücreleri, mast hücreleri, doğal öldürücü hücreler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi doğal immün sistem hücreleri ile T hücreleri ve B hücrelerinin dahil olduğu kazanılmış immün sistem hücrelerinin etkinliklerinin düzenlenmesinde rol oynamakta ve immün yanıtlar ile organ homeostazında yer almaktadır [176].

mTOR'un, sitokinler tarafından uyarılarak enfeksiyon alanına göç eden nötrofillerin işlevlerindeki katkısı araştırılmış olup, PI3K sinyal iletimi eksik nötrofillerin migrasyon yanıtında bozuklukların olduğu görülmüştür. Bu bulgu nötrofillerin işlevlerinde PI3K ve mTOR'un katkısının olduğunu göstermiştir. Ayrıca IgE reseptörü, FcεRI aracılığıyla mast hücrelerinin uyarılması ile PI3K'ye bağımlı mTORK1 sinyal ileti yolunun etkinleştiği de bulunmuştur [176].

İmmün sistem hücrelerinin yanı sıra kardiyomiyosit hücrelerinde ve damar düz kas hücrelerinde de mTOR ve *downstream* efektörü olan S6K ekspresyonuna rastlanmıştır. Prohipertrofik maddeler olan fenilefrin ve endotelin 1 tarafından oluşturulan protein sentezinin rapamisin tarafından inhibe edilmesiyle mTOR sinyal ileti yolunun kardiyak hipertrofi

gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca mTOR inhibitörü rapamisin, damar düz kas hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği de gösterilmiştir [177-180].

Böbrek dokusunda da mTOR etkinliğinin olduğu gösterilmiştir. Hücre büyümesi ve proliferasyonunu düzenleyici etkisi aracılığıyla renal tübül hücrelerinin proliferasyonuna katkıda bulunan mTORK1, tübüler hücre rejenerasyonu için gerekli olmakla birlikte; akut böbrek zedelenmesi, diyabetik nefropati ve polikistik böbrek hastalıkları gibi patolojilerde de önemli rol oynamaktadır [181].

Hücre büyümesi ve homeostazında rol oynayan mTOR, hücrede pek çok fizyolojik olaya katkıda bulunmasının yanı sıra kanser, metabolik hastalıklar, obezite, tip 2 diyabet, nörodejenerasyon ve enflamasyon gibi patolojik durumlarda da rol oynamaktadır [169].

2.3.3.1. İnflamasyon Patolojisinde mTOR'un Rolü

Rapamisinin immün sistemi baskılayıcı ilaç olarak kullanılması ve mTOR'un immün sistemdeki önemli rolü ile uyumlu olarak, yapılan çalışmalarla düzensiz mTOR sinyalleşmesinin, çeşitli immünolojik hastalıkların ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir [182].

Sinyal ileti yolları, immün sistemde hücrelerin proliferasyonu, yaşamı ve farklılaşmasındaki lenfosit işlevleri için gerekli enerji ihtiyacının sağlanması için gerekli metabolik yolları düzenlemektedir. mTOR sinyal ileti yolunun T hücrelerinin metabolik yollarının bütünleştiricisi olduğu yakın tarihli çalışmalarla gösterilmiştir [182].

İnflamatuvar uyarıları algılamak için özelleşmiş T hücreleri farklı çevresel ve metabolik uyarıları mTOR sinyal ileti yoluyla kontrol etmektedir. İşlevi TSC1/TSC2 tarafından düzenlenen Rheb, çeşitli sinyaller aracılığıyla mTORK1'i etkinleştirmekte, moleküler kapatma düğmesi gibi çalışıp PI3K-Akt ve AMPK gibi birçok sinyal ileti yolundaki sinyalleri aktarmaktadır. Rheb'i silinmiş T hücreleri, T hücre reseptör uyarılmasına bağlı etkinleşen mTORK1'i baskılamaktadır. Bunun yanı sıra TSC1 kaybı bazal ve T-hücre reseptörü aracılığıyla uyarılan mTORK1 etkinliğini arttırmaktadır. Bu bulgular T hücre yanıtlarında TSC-Rheb döngüsünün kritik rolünü göstermektedir [182].

İmmün sistemin uyarılmasıyla nötrofiller, fagositler ve mast hücreleri gibi immün sistem hücreleri aracılığıyla TNF- α ve IL gibi sitokinlerin salıverilmekte ve bu durum inflamatuvar yanıt oluşumunu başlatmaktadır [46]. Oluşan proinflamatuvar sinyaller, iskemi ve miyokart infarktüsü gibi hücre ölümü ile belirgin patolojileri sınırlayamamakla birlikte fibroz ve rejenerasyon yolu ile onarım süreçlerine katkıda bulunmak için hücreler tarafından geliştirilen inflamatuvar yanıtlara neden olmaktadır. TNF- α ve IL gibi proinflamatuvar sitokinler NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerin etkinleşmesine neden olmakta, yüksek ROT düzeyleri gibi stres durumları ile de etkinleşen NF- κ B, TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 ile artmış E-selektin, VCAM-1,

ICAM1 gibi adezyon molekülleri ile karakterize inflamatuvar yanıtı daha da tetiklemektedir [46-49]. mTOR, moleküler düzeyde hücre tiplerinin özelliklerine göre NF- κ B, *signal transducer and activator of transcription-3*(STAT3) ve interferon düzenleyici faktörler(*interferon regulatory factors*; IRF) gibi inflamatuvar transkripsiyon faktörlerinin etkinliğini düzenleyebilmektedir. mTOR sinyal ileti yolunun inhibisyonunun uyarılmış hücrelerde proinflamatuvar yanıtların oluşumunu sağladığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda mTOR sinyal ileti yolunun baskılanması NF- κ B aracılı çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu uyarmaktadır [183].

Yapılan bir çalışmaya göre, NF- κ B'nin transkripsiyonel etkinliği p65 alt birimindeki Ser276 bölgesinin fosforilasyonu ile ortaya çıkmaktadır. mTOR inhibitörü rapamisinin NF- κ B'nin bu bölge üzerinden fosforilasyonunu önleyerek antiinflamatuvar etkisini oluşturduğu gösterilmiştir. Bu durum mTOR'un inflamasyonda rol oynayan mediyatörlerin ve sitokinlerin ekspresyonunda ve salıverilmesinde önemli rol oynadığı göstermektedir. NF- κ B, IL-8 gibi inflamatuvar sitokinlerin, adezyon moleküllerinin, IL-2 reseptörleri gibi reseptörler ile iNOS ve COX-2 gibi enzimlerin de dahil olduğu inflamatuvar ve immün yanıtlardan sorumlu çok sayıda genin transkripsiyonunu başlatmaktadır. Bu çalışmada LPS uygulanan nötrofil hücre kültüründe rapamisin, doza bağımlı olarak TNF- α ve IL-6 oluşumunu azaltmıştır. Farelerde LPS ile oluşturulan akut akciğer zedelenmesinde rapamisinle mTOR'u inhibisyonunun, akciğer doku homojenatlarında, nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olan MPO ile TNF- α ve IL-6 düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgulara göre rapamisinin nötrofil hücrelerinde inflamatuvar sitokinlerin ve akut akciğer zedelenmesinin şiddetini azalttığı belirtilmiştir [142]. Daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmada, sıçanlarda İ/R'nin neden olduğu hedef ve uzak organ zedelenmelerinde oluşan inflamasyon ve oksidatif/nitrozatif strese mTOR'un mTOR/I κ B- α /NF- κ B yolu etkinliğinde artışa yol açarak katkıda bulunduğu gösterilmiştir. İ/R zedelenmesinin mTOR sinyal ileti yolunda artmaya bağlı olarak gelişen bu etkisi seçici bir mTOR inhibitörü olan rapamisin ile geri çevrilmiştir [184].

Ras-ERK ve PI3K-mTOR sinyal ileti yolları, hücrede farklı uyarılara cevap olarak gelişen başlıca mekanizmaların kontrolünde önemli rol oynarlar ve birbirlerinin etkinliklerini olumlu ya da olumsuz olarak etkileyerek, *down-stream* efektörlerini birlikte düzenleyecek şekilde kesişebilirler [185]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda MAPK aracılığıyla etkinleşen NF- κ B'nin, sistemik inflamatuvar yanıtı aracılık eden TNF- α , IL-1 β ve iNOS gibi proinflamatuvar etkili sitokin ve mediyatörleri kodlayan genlerin transkripsiyonlarını düzenlediği gösterilmiştir [19-22]. Daha önce mTOR enziminin inflamasyondaki rolünü araştırdığımız bir çalışmada, sıçanlara zimosan uygulanması ile oluşturulan hipotansiyon, inflamasyon ve oksidatif/nitrozatif stres ile belirgin non-septik şokta gelişen sistemik inflamatuvar yanıt ve buna bağlı doku zedelenmesine, mTOR/MEK1/ERK1/2/I κ B/NF- κ B sinyal ileti yolu etkinliğindeki artmaya bağlı

olarak oluşan proinflatuvar mediyatör oluşumundaki artışın aracılık ettiği gösterilmiştir. Zimosan ile oluşturulan ve mTOR'un aracılık ettiği bu etkiler rapamisin ile geri çevirilmiştir. Bu çalışmada, artmış inflamatuvar yanıtın mTOR/MEK1/ERK1/2/IKK β /I κ B- α /NF- κ B sinyal ileti yolunun etkinliğiyle bağlantılı olduğu gözlenmiştir [186]. mTOR, MEK1 ve ERK1/2 arasındaki karşılıklı pozitif ilişki diğer literatürlerde de bizim çalışmalarımıza benzer biçimde gösterilmiştir [187].

2.2.3.2. Metabolik Hastalıkların Patolojisinde mTOR'un Rolü

Hücrelerin büyümesi ve bölünmesi için protein, lipid ve nükleotit üretimi gibi anabolik metabolizmanın arttırılması, otofaji gibi katabolik süreçlerin ise baskılanması gerekmektedir. mTORK1, tüm bu süreçlerin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamakta ve çevresel koşullara yanıt olarak anabolizma ile katabolizma arasındaki dengeyi kontrol etmektedir [186].

Büyümekte olan hücreler, yeni membran oluşumu ve gelişmesi için yeterli miktarda lipide ihtiyaç duymaktadırlar. mTORK1, *sterol responsive element binding protein* (SREBP) transkripsiyon faktörleri yoluyla yağ asidi ve kolesterol biyosentezine katılan metabolik genlerin ekspresyonunu kontrol eden lipid sentezine aracılık etmektedir [188]. Memelilerde enerji depolayan başlıca doku olan adipoz doku oluşumuna aracılık eden adipojenez, mTORK1 etkinliği ile artarken obezite gelişmesine neden olmakta ve böylece insülin direnci ve tip 2 diyabet gibi risklerin ortaya çıkmasını tetiklemektedir. Hepatik glikoz üretimini ve hepatik trigliserit birikimini arttıran insülin direnci ise hiperglisemi ve hiperlipidemiye neden olmaktadır [169].

Bunun yanı sıra mTORK1 sinyal ileti yolu, insülin salgılanması ve glikoz homeostazında rol oynayan pankreasın β hücrelerinin işlevlerinin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. β hücrelerin insülin salgılamasında pozitif düzenleyici bir rolü olan mTORK1'in, bu β hücreler üzerindeki etkilerine S6K1 aracılık etmekte olup, S6K1'i silinmiş farelerin β hücrelerinin daha küçük olduğu, hipoinsülinemi geliştiği, glukoz intoleransı ile birlikte insülin salgılanmasının bozulduğu görülmüştür [169].

mTORK1 henüz anlaşılamamış bir mekanizma ile kaslarda hipertrofinin sürdürülebilmesi için gerekli protein sentezini uyarmaktadır. mTORK1'in bu etkisi, mTORK1'i silinmiş farelerde kas kütlesinde ve oksidatif işlevlerde azalma ve erken ölümlerin gerçekleştiği bir çalışma ile gösterilmiştir [169]. Kaslardaki mTORK1 eksikliği IRS1'in negatif geri besleme mekanizmalarının yoğunluğunu azaltmakta, Akt etkinliğini ve kaslarda glikojen birikimini ise arttırmaktadır. Kas hücrelerinde yapısal bir etkisi olmayan mTORK2'nin inhibisyonu ise glukoz geri alımında azalma ile sistemik glukoz intoleransına neden olmaktadır [169].

mTOR ile ilişkili sinyal ileti yolları, aterosklerotik lezyonların gelişimi, ilerlemesi ve

komplikasyonların gelişmesine katkı sağlamaktadır. ApoE ve LDL-reseptör yoksun hiperkolesterolemik farelerde ve tavşanlarda çeşitli mTOR inhibitörlerinin ateroskleroza inhibe ettiği gösterilmiştir [189]. Ateroskleroz, arteriyel damar duvarında inflamasyon ve immün etkinliğin artışıyla karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır. mTOR sinyal ileti yolunun ateroskleroz patolojisinde proinflamatuvar özellikte olduğunu destekleyen ve mTOR inhibitörlerinin terapötik etkinliğini değerlendiren birçok çalışma mevcuttur. Farelerde mTOR geninin susturulması makrofaj oranını ve plak instabilitesini sağlayan genlerin ekspresyonunu azaltarak ateroskleroza geriletmiştir. Benzer olarak rapaloglar aracılığıyla mTOR inhibisyonu düz kas hücre proliferasyonunu, makrofaj oranı ve damar duvarına monosit göçünü azaltarak ateroskleroza baskılamıştır. Ayrıca mTOR yolunun *down-regülasyonu* sonucu hücre içi kolesterol birikimi, immün hücrelerin farklılaşması ve IL-10 üretiminin artırılmasını tetikleyen *ATP-binding cassette transporter G1*'in işlevi kaybolmaktadır. Bu sonuçlar ateroskleroz patolojisinde mTOR'un rolünün proinflamatuvar özellikte olduğunu ve bu hastalığın tedavisi için yeni hedef molekül olabileceğini kanıtlamaktadır [183].

2.2.3.3. Nörodejeneratif Hastalıkların Patolojisinde mTOR'un Rolü

Parkinson, *Alzheimer* ve *Huntington* hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz ve frontotemporal demans gibi, kalıcı nöronal yapı ve işlev kaybı ile ilişkili nörodejeneratif hastalıklarda genetik yatkınlık ve yaş başlıca risk etkeni olup, toksik protein agregatlarının birikimi çoğunun ortak patolojik özelliğidir. Nöronlardan yeterince temizlenemeyen toksik ve mutant proteinlerin birikimi, hücre zedelenmesine ve sonuç olarak da hücre ölümüne neden olmaktadır [69].

Günümüzde, nörodejeneratif hastalıklarda otofaji ve ubiquitin-proteazom sisteminin rol aldığı hücre içi protein parçalanma süreçlerinin bozulduğu düşünülmektedir. Otofajinin düzenlenmesinde temel moleküllerden olan mTORK1'in bu süreçteki rolü yakın zamanda yapılan çalışmalarla araştırılmaya başlanmıştır. Otofaji, anormal protein agregatlarının temizlenmesinde görevli temel mekanizmadır. Otofajinin etkinleşmesinde ortaya çıkan bozuklukların nörodejeneratif hastalıklarda yaygın olduğu bulunmuştur. Ayrıca otofaji genlerinden Atg5 veya Atg7'nin fare santral sinir sisteminde eksikliği poliubikuitinlenmiş proteinlerin birikimini başlatmakta ve nörodejenerasyona neden olmaktadır. *In vitro* modellerde rapamisin ile mTORK1 inhibisyonu, birikime yatkın proteinlerin otofajik parçalanmasını başlatmakta ve *in vivo* modellerde ise nörodejenerasyonun şiddetini azaltmaktadır. Diğer taraftan rapamisin yanlış katlanmış proteinlerin birikimini protein sentezini yavaşlatarak azaltmaktadır. Bu amaçla yeni kuşak mTOR kinaz inhibitörlerinin keşfi nörodejeneratif hastalıklar açısından umut verici gelişmelerdendir. İlk kuşak rapaloglara göre

mTOR kinaz inhibitörlerinin otofajiyi başlatması ve protein sentezini bloke etmesi daha etkili bulunmuştur [169].

Yapılan çalışmalarda mTORK1'in rapamisin ile inhibisyonunun, *in vitro* koşullarda anormal protein agregatlarının otofajik degradasyonunu desteklediği ve *in vivo* modellerde şiddetli nörodejenerasyonu azalttığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, rapamisinin mutant proteinlerdeki protein sentezini yavaşlatarak bu proteinlerin agregasyonunu azaltması mTORK1'in diğer *downstream* efektör moleküllerinin nörodejenaratif hastalıkların gelişmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir [169].

2.2.3.4. Kanser Patolojisinde mTOR'un Rolü

Kanserde önemli olduğu saptanan üç temel sinyal ileti yolu; PI3K/Akt, protein kinaz C ailesi (PKC) ve MAPK/Ras olup bu sinyal ileti yollarının bozulması birçok kanser türünün patogeneğinde rol oynamaktadır [190].

mTORK1, PI3K/Akt'nin yanı sıra Ras/Raf/Mek/Erk sinyal ileti yolunu da içeren, çoğunlukla mutasyona uğramış pek çok onkogenik sinyal ileti yolu için bir *downstream* molekül olarak işlev görmektedir ve bu da insan kanserinde yüksek oranda mTORK1 hiperaktivasyonuna neden olmaktadır [141]. Bu nedenle mTOR önemli bir antitümör hedefi durumundadır. Ayrıca, en çok bilinen tümör baskılayıcıları TP53 ve *serine threonine kinase 11* (Lkb1), aynı zamanda ailevi kanser sendromu TSC'nin genetik analizi ile orijinal olarak tanımlanan tümör baskılayıcıları olan, mTORC1'in *upstream* molekülleri TSC1 ve TSC2'nin negatif düzenleyicileridir. Son olarak, mTOR'un kendisindeki mutasyonlar da, mTOR'un tümörögenezdeki rolüyle bağlantılı çeşitli kanser alt tiplerinin patojenezinde yer almaktadır. [191-192].

Antikanser ajanlar olarak mTOR inhibitörlerinin ortaya çıkışı ana molekülden ziyade rapamisin analogları ile başlamıştır. Güncel olarak bu analoglar temsirolimus, everolimus, ridaforolimus ve deforolimustan oluşmaktadır. mTOR inhibitörleri ile yapılan klinik çalışmalar uzun süreli objektif tümör yanıtı sağlamış olup kanserli hastalarda güvenilirlikleri ve etkinlikleri kanıtlanmıştır. Bu nedenle de temsirolimus ve everolimusa FDA ve EMEA tarafından renal hücreli kanser tedavisinde endikasyon verilmiştir. mTOR inhibitörü ilaçların meme, lenfoma, akciğer, mide ve sarkom kanserlerini içine alan çeşitli solid tümörlerde etkinliği gösterilmiştir [193].

mTORK1, *downstream* molekülleri; 4EBP1 ve S6K aracılığıyla hücre büyümesini, hücre siklusunun devamlılığını ve hücre metabolizması için gerekli proteinlerin translasyonunu sağlamaktadır [194]. mTORK1 kaynaklı birçok süreç tümör oluşumuna katkıda bulunurken, 4EBP'in fosforilasyonu ile başlatılan translasyon süreci muhtemelen en kritik olanıdır [195-

196]. 4EBP1 proteini, hücre çoğalmasının olmadığı fazda fosforillenmemiş ve eIF4E' ye bağlı haldedir, böylece mRNA translasyonunun başlamasını inhibe etmektedir . Büyüme faktörleri gibi uyarıcılar aracılığıyla mTOR yolu üzerinden 4EBP1 proteini fosforile edildiğinde ise 4EBP1'in eIF4E'ye olan ilgisi azalmaktadır ve baskılayıcı proteinin ayrılmasıyla proteinlerin mRNA translasyonu başlamaktadır. Ayrıca 4EBP1'in fosforilasyonu hipoksik durumlarda tümörün büyümesini sağlayan, angiogenez gelişiminde rol oynayan hipoksi ile indüklenmiş faktörlerin (HIF-1a vb.) sentezinde de artışa neden olmaktadır. Bununla paralel olarak, çeşitli Akt ve Erk kaynaklı kanser hücre dizileri de 4EBP fosforilasyonuna bağlıdır [197-198]. mTORK1'in diğer bir *downstream* molekülü olan S6K1'in fosforilasyonu da mRNA translasyonunu başlatmakta ve S6K1/eIF4E aşırı ekspresyonu da onkojeneze katkıda bulunabilmektedir [199].

Kanserde mTOR etkinliğine neden olan bir diğer durum ise etkinleşen p53'ün mTOR negatif düzenleyicisi olarak görev yapmasıdır. p53 geni DNA hasarı ve düşük besin seviyeleri gibi hücrede stresi uyaran şartlar altında etkinleşen kritik bir tümör baskılayıcı proteini kodlamaktadır. Bu proteinler sıklıkla malignitelerde eksikliğe veya mutasyona uğramışlardır ve fonksiyonlarını kaybetmeleri kemoterapiye dirençle ilişkilidir. Yakın zamandaki bulgular mTOR sinyalinin p53 tarafından inhibe edildiğini ve p53'deki fonksiyon kaybının mTOR etkinliği ile sonuçlandığını göstermektedir [137].

Bunların yanı sıra mTOR, apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde de önemli etkilere sahiptir. Apoptotik ölümde p53, B-hücreli lenfoma 2 (BCL2), BCL2-antagonisti (BAD), p21, p27 ve c-myc gibi sinyal iletim hedefleri belirleyicidir. mTOR etkinliği hücre ölümünü düzenleyen bu molekülleri inhibe etmektedir [190]. Yapılan çalışmalarda mTOR'un tümör hücre motilitesinde, anjiyogenezinde ve kanser metastazlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [137]. Kanser hücrelerinde pek çok farklı mekanizmada PI3K/AKT/mTOR sinyal ileti yolunun etkinliği gözlemlenmektedir. mTOR etkinliğindeki artış ile sonuçlanan hücre içi süreçleri PTEN fonksiyonu kaybı, PI3K-p110 katalitik ünitesinin mutasyonu veya amplifikasyonu, PI3K-p85 düzenleyici ünitesinin mutasyonu, AKT1 ve AKT2 enzimlerinden herhangi birisinin amplifikasyonu ve TSC1/TSC2 gibi AKT ile ilişkili mTOR düzenleyici proteinlerin etkinliğini ya da mutasyonlarını içermektedir [190].

mTORK2 de, apoptozu inhibe ederken glikoz geri-alımı ve glikoliz gibi pro-proliferatif süreçleri uyaran Akt'nin etkinleştirilmesindeki rolünden dolayı kanserde yer almaktadır. Bazı PI3K/Akt kaynaklı tümörler mTORC2 etkinliğine dayanıyor gibi görünmektedir, çünkü hem PTEN'siz insan prostat kanseri hücrelerinde hem de PTEN kaybıyla uyarılan prostat kanseri fare modellerinde Rictor bulunması zorunludur [200-201].

İnflamasyon kanserin başlaması ve ilerlemesinde önemli rol oynamakla birlikte mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Kanser ile ilişkili inflamasyonda mTOR sinyal ileti

yolunun rolünü gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Kanseri hücrelerinde mTOR ve NF- κ B sinyal iletilerinin birbirini karşılıklı düzenlediği gösterilmiştir. NF- κ B etkinleşmesinde rol oynayan bir IK β 'nin mTOR kompleksini etkinleştirerek anjiyogenez artırdığı ve tümör gelişimine neden olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde prostat kanseri hücrelerinde diğer kinaz IKK α , mTOR kinaz etkinliğini PTEN aracılığıyla düzenlemektedir [183].

2.2.4. mTOR İnhibitörleri

2.2.4.1. Rapamisin ve Analogları

İlk keşfedilen mTOR inhibitörü olan rapamisin, 1975 yılında antimikrobiyal ajan geliştirme çalışmaları sırasında Güney Pasifik Okyanusu'nda bulunan *Rapa Nui* olarak da bilinen Paskalya Adasının toprak örneğinden elde edilen *Streptomyces hygroscopicus* adlı bakteri tarafından üretilen makrosiklik lakton yapısında bir antibiyotiktir [202, 203]. Rapamisin, diğer adıyla sirolimus, ilk olarak antifungal bir ajan olarak geliştirilmiş olup daha sonra aynı derecede immünosupresif özellikleri olduğu da keşfedilmiştir [202-206]. 1999 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde İlaç ve Gıda Dairesi (Food and Drug Administration; FDA) tarafından immünosupresif ilaç olarak onaylanmıştır [207].

Rapamisin, FKB12 proteinine bağlanarak inhibitör etkili kompleksi oluşturmaktadır ve bu kompleks mTOR'un C terminal ucundaki FRB bölgesine bağlanarak hücre büyümesini inhibe edici ve sitotoksik etkileri oluşturmaktadır [208-211]. Rapamisin-FKB12 kompleksinin mTOR'u nasıl inhibe ettiği tam olarak bilinmemekle birlikte FRB bölgesine bağlanan bu kompleksin mTOR'un otofosforilasyonunu bu bölge ile katalitik kinaz bölgesi arasındaki allosterik etkileşme sonucu inhibe ettiği varsayılmaktadır. Ayrıca rapamisinin, mTOR-raptor kompleksini destabilize ederek mTORK1 etkinliğini inhibe ettiği gösterilmiştir [212, 213].

Günümüzde insanlarda kullanılmakta olan rapamisin analogları (rapaloglar) temsirolimus, everolimus, ridaforolimus ve zotarolimus'tur. Bu rapaloglar, rapamisin ile aynı etki mekanizmasına sahip olup FKB12 proteinine bağlanarak mTOR'un FRB bölgesine etki etmektedirler [213]. Bir ön ilaç olan temsirolimus, rapamisinin dihidroksimetil-propiyonik asit esteridir. Bu formu bileşiğin suda çözünürlüğünü arttırmakta ve hem oral hem intravenöz alımına olanak sağlamaktadır. Temsirolimus vücutta rapamisine dönüşerek benzer farmakolojik etkiler göstermektedir. Everolimus, C-40 konumunda O-(2-hidroksietil) zincirine sahiptir ve rapamisin ile karşılaştırıldığında oral biyoyararlanımı daha yüksek olacak şekilde formüle edilmiştir. Ridaforolimus ise lakton halkasının C-40 konumunda fosfin oksit sübsitüsyonuna sahiptir ve suda çözünabilir olması ve kimyasal stabilite ve biyoyararlanım açısından rapamisine göre birçok olumlu farmakolojik özelliği bulunmaktadır [2153-216]. Zotarolimus,

rapamisinin yarı sentetik bir türevidir. Fosforilkolinle polimerize ilaç salıveren stent olarak kullanılmaktadır [217].

Rapamisin ve analogları, mTOR inhibisyonuna neden olan diğer ilaç gruplarından farklı olarak mTORK1 için oldukça selektiftir ve rapamisinin mTORK1'e seçicilik oranı mTORK2'e göre epey yüksek olup, yaklaşık 500 katı kadardır [218].

2.2.4.2. Dual PI3K/mTOR İnhibitörleri

NVP-BEZ235 (dactolisib), PI-103, GDC-0980 (apitolisib) ve PKI-587 (gedatolisib) gibi moleküller mTOR kinaz inhibisyonu ile ilişkili moleküller olup mTOR ve PI3K inhibitörleridir. mTOR ve PI3K'nın ATP bağlayan bölgelerini hedefleyen bu moleküller, mTOR ve PI3K üzerine benzer etkinlik göstermekte ve bu yüzden seçici olarak mTOR etkinliğini inhibe etmek için kullanılmamaktadırlar [219-223]. PI3K sinyal ileti yolunda bulunan PI3K, Akt ve mTOR gibi en az 3 enzimi hedef aldıklarından dolayı klinikte kesin tanı konulmuş hastalıklarda rapamisin ve analogları gibi tek hedefli inhibitörlere karşı avantajlı sayılmaktadırlar. Rapamisin ve analogları tarafından yalnızca mTORK1 etkinliğinin inhibisyonu, mTOR-S6K-IRS1 negatif geri besleme mekanizması nedeniyle PI3K etkinliğinin artmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle, mTOR ve PI3K üzerine dual etkili inhibitörler, PI3K yolunun geri besleme ile yeniden etkinleşmesini önlemek için yeterli olabilmektedirler [224].

2.2.4.3. mTOR Kinaz İnhibitörleri (TORKIs)

Bu sınıf moleküller mTOR'un katalitik bölgesi için ATP ile yarışarak mTOR üzerinde güçlü ve seçici inhibisyon yapmaktadırlar. mTORK1 ve mTORK2'yi diğer protein kinazları etkilemeden seçici bir biçimde inhibe etmektedirler ve bu özellikleri ile PI3K/mTOR dual etkili inhibitörlerden ayrılmaktadırlar. Rapamisin ile karşılaştırıldığında, PP242, 4E-BP1 fosforilasyonu ve Akt'nin Ser⁴⁷³ bölgesinden fosforilasyonu hücre çoğalmasını daha etkili bir şekilde inhibe etmektedir [225]. Daha sonra keşfedilen seçici mTORK1/2 inhibitörleri arasında: Torin 1, Torin 2, Ku-0063794, AZD8055, AZD2014 (Vistusertib), CZ415, INK128/MNL0128(TAK-228), OSI-027, WYE354, WYE312, WYE687, WAY600, Palomid 529, GDC-0349, CC223 ve XL388 molekülleri bulunmaktadır [226].

2.2.4.4. Diyet Türevi Doğal Ürünler

Yapılan çalışmalar kurkumin, resveratrol, epigallocateşin galat (*epigallocatechin gallate*, EGCG), genistein, 3,3-diindolmetan ve kafein gibi bazı diyet türevi doğal bileşiklerin, doğrudan ya da dolaylı olarak mTOR sinyal ileti yolunu inhibe ettiğini göstermiştir [227, 228].

EGCG, yeşil çay içeriğinde de bulunan polifenolik bileşik olup güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir. Keloit fibroblast ve HMC-1 hücre kültüründe EGCG uygulaması, konsantrasyona bağımlı olarak Akt, S6K ve 4E-BP12'nin artan fosforilasyonunu azaltmıştır [229].

Resveratrol, potansiyel antienflamatuvar, antioksidan, nöroprotektif ve antikanser özelliği olanüzüm çekirdeği ve kırmızı şarapta bulunan polifenolik bir bileşiktir [230]. Resveratrol, insan U251 gliom hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR aracılı sinyal ileti yolunu inhibe ettiği ve rapamisin ile kombine edildiğinde, resveratrol ile indüklenen hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir [231].

Kurkuminin, antiproliferatif etkisini mTOR sinyal ileti yolunu inhibe ederek gösterdiğine ilişkinbirçok çalışma mevcut olup mTOR inhibitörlerinin yeni bir grubunu temsil etmektedir. Kurkumin, *Curcuma longa* bitkisinin rizomundan elde edilen polifenolik bir bileşiktir ve yeni bir antikanser ajan olarak araştırılmaktadır [232]. Kurkumin'in, mTOR'dan raptor proteinini ayırarak mTORK1 etkinliğinin inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir [228].

2.2.4.5. RapaLink-1

Yeni nesil mTOR inhibitörü olan RapaLink-1, FRB bölgesine bağlanarak mTORK1'i allosterik olarak inhibe etmenin yanı sıra mTOR kompleksininkatalitik etkinliğini bloke etmektedir [233].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanı

Deneylerde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda senkronize edilen 250-300 g ağırlığında 32 adet erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezinden sağlanmıştır. Bu süre içerisinde su ve yem kısıtlamasında bulunulmamıştır. Bu tez çalışmasında sıçanlara uygulanan işlemler Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınarak yapılmıştır (26/02/2018 tarihli ve 2018/08 sayılı kurul kararı).

3.1.2. Sarf Malzemesi

β -Aktin için primer antikor (A2547, Sigma)
 β -Gliserofosfat (G9891, Sigma)
 β -Merkaptoetanol (A1108, AppliChem)
Akrilamit 4K çözeltisi (%30) (161-0157, Bio-Rad)
Amonyum persülfat (A2941, AppliChem)
Aprotinin (A2132, AppliChem)
Asetik asit (64-197, Climax)
Ayırıcı cam (*spacer plate*) (1.5 mm) (165-3312, Bio-Rad)
Benzamidin (B6506, Sigma)
Bradford reajanı (B6916, Sigma)
Bromfenol mavisi (A3640, AppliChem)
Coomassie mavisi (1.12553, Merck)
Ditiyotreytol (A2948, AppliChem)
DNA saklama kutusu (81 gözlü) (3122278, Greiner)
Düz tabanlı, 96 kuyucuklu kültür plakları (655160, Greiner)
Enzim proteinlerini görüntüleme çözeltisi (*ECL prime western blotting detection reagents*) (RPN2232, Amersham)
Eppendorf tüp (0.5 ml) (667201, Greiner)
Eppendorf tüp (1.5 ml) (616201, Greiner)
ERK1/2 proteini için primer antikor (9102S, Cell Signalling)
Etanol (Riedel-de-Haën)

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (A2937, AppliChem)
Fenilmetansülfonilflorit (PMSF) (A0999, AppliChem)
Filtre kağıdı (blot absorbent filter paper, thin) (162-0118, Bio-Rad)
Fosforile ERK1/2 proteini için primer antikor (sc-73083, Santa Cruz Biotechnology)
Fosforile rpS6 proteini için primer antikor (Phospho-S6K (Ser240/244) Antibody) (#5364; Cell Signalling)
Fosforile MEK1 proteini için primer antikor (sc-101733, Santa Cruz, Amerika)
Gliserol (A2926, AppliChem)
Glisin (A1067, AppliChem)
Goat anti-mouse antibody FITC konjuge (SC-2010, Santa Cruz)
gp91^{phox} proteini için primer antikor (SC-74514, Santa Cruz)
HCl (100314, Merck)
HEPES (A3724, AppliChem)
iNOS proteini için primer antikor (iNOS/NOS type II mouse IgG1) (610432, BD Transduction)
İzobütanol (A1150, AppliChem)
Kısa cam (short plate) (10.1 x 7.3 cm) (165-3308, Bio-Rad)
Kriyopreservasyon tüpü (*Cryo's sterile*, 1 ml, 12, 5/38 mm, *skirt*) (3123278, Greiner)
Kriyopreservasyon tüpü (*Cryo's sterile*, 2 ml, 12, 5/38 mm, *skirt*) (3122278, Greiner)
Kültür plağı için yapışkanlı kapak (676001, Greiner)
Löpeptin (L9783, Sigma)
Metanol (1.06008, Merck)
Molekül ağırlığı belirteci (Rainbow marker, full-range) (RPN 800E, Amersham)
MPO ELISA Kit (SEA601Ra, Cloud-Clone, Amerika)
NADPH oksidaz kiti (MBS2602768, MyBiosource, Amerika)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (A1148, AppliChem)
N-1-Naftiletilendiamin dihidroklorür (NED) (N9125, Sigma)
Nitroselüloz membran (*nitrocellulose membrane*) (162-0112, Bio-Rad)
Nitrotirozin proteini için primer antikor (sc65385, Santa Cruz, Amerika)
Orto-fosforik asit (H₃PO₄) (100564, Merck)
Otomatik pipet (0-200 µl) (Rainin Pipet-Lite, Rainin)
Otomatik pipet (100-1000 µl) (Labart)
Otomatik pipet (100-1000 µl) (Socorex)
Otomatik pipet (10-100 µl) (Hamilton)
Otomatik pipet (1-10 µl) (Socorex)
Otomatik pipet (2-20 µl) (Eagle)

Otomatik pipet (2-20 µl) (Socorex)
Otomatik pipet (50-200 µl) (Socorex)
Otomatik pipet (5-50 µl) (Boeco)
Otomatik pipet (Stepper 411, Adjustable Repeater Pipette) (411.5000, Socorex)
Pipet ucu (3686290, Greiner)
Pipet Ucu (770291)
Pipet Ucu (mavi) (686290, Greiner)
Pipet ucu (sarı) (3685290, Greiner)
Polistiren tüp (15 ml) (188271, Greiner)
Polistiren tüp (50 ml) (227261, Greiner)
Ponceau S (A1405, AppliChem)
Potasyum klorür (*potassium chloride*; KCl) (1.04936, Merck)
Primer antikorlara özgü sekonder antikor (RPN4301, Amersham)
Primer antikorlara özgü sekonder antikor (RPN4201, Amersham)
Rapamisin (R-101-100 Gold Biotechnology, Amerika)
p22^{phox} proteini için primer antikor (sc20781, Santa Cruz, Amerika)
rpS6 proteini için primer antikor (#2217; Cell Signalling)
Serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter)
Sıçan (Wistar, Erkek)
Sığır serum albümini (SSA) (A7906, Sigma)
Sıvı azot
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (A2263, AppliChem)
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (817034, Merck Millipore)
Sodyum klorür (*sodium chloride*; NaCl) (1.06404, Merck)
Sodyum nitrit (S2252, Sigma, Amerika)
Sodyum ortovanadat (A2196, AppliChem)
Sodyum pirofosfat (A2197, AppliChem)
Sülfanilamit (SA) (1.11799, Merck)
Sülfosalisilik asit (A0416, AppliChem)
TNF-α proteini için primer antikor (SC-33639, Santa Cruz)
Trikloroasetik asit (A1431, AppliChem)
Tris (A2264, AppliChem)
Tris baz (A2264, AppliChem)
Tween 20 (A4974, AppliChem)
Yağsız kurutulmuş süt tozu (YKST) (non-fat dry milk) (A0830, AppliChem)

3.1.3. Teçhizat

Çalkalayıcı (*red rotor orbital shaker*) (PR500-176, Hofer, Almanya)
Çalkalayıcı (*Rocker-shaker*) (MR-12, Biosan, Letonya)
Derin dondurucu (dik tip, -80 °C) (Ilshin, Kore)
Derin dondurucu (dikey, 240 L, -20 °C) (2041 ND, Arçelik) (1 adet)
Derin donduruculu buzdolabı (Model 1060 T, Arçelik, Türkiye)
Derin donduruculu buzdolabı (Model 4240 T FH, Arçelik, Türkiye)
Elektroforez sistemi (*mini-protean tetra 1 mm*) (165-8001, Biorad, Amerika)
Güç desteği (*power supply*) (EV 265 consort power supply, 230 VAC) (PS265-230V, Hofer, Almanya)
Hassas terazi (Model APX 200, Denver, Almanya)
Homojenizatör (Ultra-Turrax, T25, Ika, Almanya)
Jel dökümentasyon ve analiz sistemi (*EC3-CHEMI HR imaging system*) (Ultra-Violet Products, UVP, İngiltere)
Kesintisiz güç kaynağı (AC/DC, 1 kVA)
Kesintisiz güç kaynağı (AC/DC, 3 kVA)
Manyetik karıştırıcı (*BOE 8056500 magnetic stirrer*) (MMS-3000, ACAdapter 220V, Boeco, Almanya)
pH metre (Orion 3 Star, Thermo, Amerika)
Plak okuma cihazı (405, 450, 490, 550 ve 630 nm olmak üzere beş adet filtreli) (ELX800, Biotek, Türkiye)
Sıvı azot tankı (2 L) (Isotherm, Almanya)
Sıvı azot tankı (21.5 L) (TR 21, Air Liquide, Fransa)
Soğutmalı santrifüj (Model Mikro 22R, Hettich, Almanya)
Soğutmalı Santrifüj (Model H1850R, Cence, Almanya)
Tarak (*Comb*) (10 wells, 1.0 mm) (165-3365, Bio-Rad, Amerika)
Ultrasonik banyo (ısıtmalı, frekans ayarlı) (Elmasonic S 40 / (H), Elma, Almanya)
Üstten kefeli terazi (Model SPB 52, Scaltec, Almanya)
Yarı-kuru transfer birimi (TE 77X semi-dry transfer unit) (TE77X, Hofer, Almanya)

3.2. Yöntem

3.2.1. *In Vivo* Çalışmalar

Sıçanlarda periferik İ/R zedelenmesine aracılık eden inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif stres süreçlerinde mTOR'un katkısının MEK1/ERK1/2 etkinliği ile ilişkilendirilerek araştırılması amacıyla aşağıdaki deney grupları belirlenerek *in vivo* çalışmalar yapılmıştır:

Grup 1: Kontrol grubu (n= 8)

Grup 2: İ/R grubu (n= 8)

Grup 3: Rapamisin grubu (1 mg/kg, i.p.) (n= 8) [234]

Grup 4: İ/R + Rapamisin grubu (n= 8)

Kontrol grubundaki hayvanlara 3. saatte serum fizyolojik enjeksiyonu uygulanmıştır. İ/R grubundaki hayvanların her iki bacağına *trochanter major* seviyesinde turnike uygulanarak 4 saat süreyle iskemi oluşturulmuş ve daha sonra turnike açılarak reperfüzyon oluşturmak amacıyla 4 saat beklenmiştir. Bu süre sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek doku ve kan örnekleri alınmıştır. İ/R+rapamisin grubunda reperfüzyondan 1 saat önce spesifik mTOR inhibitörü rapamisin (1 mg/kg, i.p.) uygulanmış ve iskemi uygulamasının ardından turnike kaldırılarak 4 saat süreyle reperfüzyon oluşması sağlanmıştır [235]. Rapamisin grubundaki hayvanlara ise yalnızca rapamisin (1 mg/kg, i.p.) uygulaması yapılmıştır. 8. saat sonunda ketamin hidroklorür (90 mg/kg, i.p.) ve ksilazin (7 mg/kg, i.p.) uygulanan sıçanlar sakrifiye edilerek gastrokinemius kası ve böbrek ile kan örnekleri alınmıştır.

Alınan kanlar oda sıcaklığında 30 dk. bekletilip, cam bir baget ile defibrinize edildikten sonra 4°C'de 23.910 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Serum örnekleri nitrit düzeylerinin ölçümüne kadar *eppendorf* tüpler içerisinde -20°C'de saklanmıştır.

İzole edilen dokular kriyoprezervatif tüpler içerisinde sıvı azot ile hızla dondurularak, nitrit, nitrotirozin düzeyleri; MPO ve NADPH oksidaz etkinlikleri; rpS6, fosforile rpS6, MEK1, fosforile MEK1, ERK1/2, fosforile ERK1/2, TNF-α, iNOS, p22^{phox}, gp91^{phox}, nitrotirozin ve aktin protein ekspresyon düzeylerinin ölçümüne kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Serum Örneklerinin Hazırlanması, Dokuların Homojenize Edilmesi ve Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması

Serum örneklerinin ve doku homojenatı süpernatantlarının hazırlanmasında daha önce tanımlanan yöntemler kullanılmıştır [236]. Kanlar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra cam bir baget ile defibrinize edilerek, 23.910 x g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonucunda ayrılan serum örnekleri kullanılıncaya dek *ependorf* tüpler içerisinde -20°C'de dondurularak saklanmıştır.

-80°C'de dondurularak saklanan dokular porselen havanda sıvı azot ile toz haline getirildikten sonra doku üzerine 2 ml HEPES tamponu (mM: HEPES 20 [pH 7.5], β -gliserofosfat 20, sodyum pirofosfat 20, benzamidin 10, ditiyotreyitol 1, sodyum ortovanadat 0.2, sodyum florür 20, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) 2, löpeptin 20 ve aprotinin 10) eklenerek örnekler homojenize edilmiştir.

Homojenatlar 23.910 x g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatantlar toplanarak, üzerlerine 100 μ l tris (50 mM, pH 8.0)+ potasyum klorür (KCl) (0.5 M) çözeltisi eklenerek, ardarda 2 kez 15 saniye su banyosu sonikatöründe bekletilmiş ve 23.910 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar kriyoprezervatif tüplere bölünerek ölçümler yapılana kadar -80°C'de dondurularak saklanmıştır.

3.2.3. Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Toplam Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda toplam protein düzeyi Coomassie mavisi yöntemi ile ölçülmüştür [237]. Standart olarak kullanılan sığır serum albumini (SSA) %1 (a/h) biçiminde distile suda hazırlanan stok çözeltisinden, 0-50 μ l SSA içeren dizi dilüsyonları (0-50 μ g/ml) hazırlanarak toplam hacimleri distile su ile 800 μ l'ye tamamlanmıştır. Aynı şekilde, 5 μ l süpernatant üzerine 795 μ l distile su eklenerek 800 μ l hacimde çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler üzerine 200 μ l Bradford reajanı eklenip, bu çözeltilerden alınan 100 μ l örnek (aynı örnekten 3 kez olmak üzere) kültür plağına aktarılmış ve örneklerin verdikleri absorbanslar, kültür plağı okuyucuda, 630 nm'de okunmuştur. SSA derişimlerine karşı elde edilen absorbanslardan yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, SSA'nın kalibrasyon doğru denklemleri belirlenmiştir. Bu denklemlerden yararlanılarak, örneklerden okunan absorbans değerlerinden protein düzeyleri belirlenmiştir.

3.3.4. Serum ve/veya Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Nitrit Düzeyi ile MPO ve NADPH Oksidaz Etkinliklerinin Ölçülmesi

Serum ve doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda iNOS etkinliğinin bir göstergesi olarak nitrit düzeyleri, ortamda nitrit varlığında oluşan pembe rengin spektrofotometrik olarak 550 nm'de ölçülmesi prensibine dayanan diazotizasyon yöntemi (Griess reaksiyonu) ile ölçülmüştür [238, 239]. Serum örnekleri ölçümden hemen önce 1:5 oranında distile su ile dilüe edilerek kullanılmıştır. Standart olarak kullanılacak sodyum nitritin 2 mM biçiminde distile suda hazırlanan stok çözeltisinden, distile su ile 1 ml hacimde dizi dilüsyonları (0.25-100 µM) hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden veya serum ya da doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlardan alınan 50 µl örnek, 50 µl SA (25 µl) ve NED (25 µl) reaktifi ile düztabanlı 96 kuyucuklu kültür plağında karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 15 dakika bekleyen örneklerin verdikleri absorbanslar, kültür plağı okuyucuda 550 nm'de okunmuştur. Sodyum nitrit miktarlarına karşı elde edilen absorbanslardan yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, sodyum nitritin kalibrasyon doğru denklemleri belirlenmiştir. Bu denklemlerden yararlanılarak, örneklerde okunan absorbans değerlerinden nitrit miktarları bulunmuştur.

Böbrek ve iskelet kası dokularından elde edilen doku homojenatı süpernatantlarında MPO ve NADPH oksidaz etkinliği *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* kiti kullanılarak prospektüslerinde yazıldığı biçimde *ELISA* yöntemi ile ölçülmüştür.

3.2.5. Doku Örneklerinde rpS6, Fosforile rpS6, MEK1, Fosforile MEK1, ERK1/2, Fosforile ERK1/2, TNF-α, iNOS, p22^{phox}, gp91^{phox}, Nitrotirozin ve Aktin Protein Ekspresyonlarının Ölçülmesi

Dokularda rpS6, fosforile rpS6, MEK1, fosforile MEK1, ERK1/2, fosforile ERK1/2, TNF-α, iNOS, p22^{phox}, gp91^{phox}, nitrotirozin ve aktin protein ekspresyonları daha önce tanımlanan yöntemlere göre ölçülmüştür [240, 241]. Çalışmalarda alt jel olarak 13.3 ml %30'luk akrilamit 4K çözeltisi, 5 ml tris çözeltisi (1.5 M, pH 8.8), 0.4 ml %10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi, 15.9 ml distile su, 0.4 ml %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0.0016 ml TEMED, üst jel olarak da 1.7 ml %30'luk akrilamit 4K çözeltisi, 1.25 ml tris çözeltisi (1 M, pH 6.8), 0.1 ml %10'luk SDS çözeltisi, 6.8 ml distile su, 0.1 ml %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0.01 ml TEMED kullanılmıştır. Üst jelde oluşturulan çukurlardan birinci çukura 3 µl molekül ağırlığı belirteci, diğer çukurlara ise 30 µl örnek yüklenmiştir. Elektroforez tampon çözeltisi olarak 500 ml distile su içinde 15 g tris, 72 g glisin ve 5 g SDS içeren bir çözelti (pH 8.3) hazırlanmış ve kullanılmadan hemen önce 1/10 oranında seyreltilerek pH değeri 8.3'e ayarlanmıştır.

128 µl HEPES tamponu içinde 100 µg toplam protein ve 5 µl Laemmli örnek tamponu (5 ml tris çözeltisi [0.5 M, pH 6.8], 4 ml gliserol, 40 mg bromfenol mavisi, 0.8 g SDS ve 0.8 ml β-merkaptoetanol 10 ml distile su içinde) içeren doku homojenatlarından hazırlanan ve -80°C'de dondurulmuş olan süpernatantlar çözündükten sonra 5 dakika kaynar su içinde bekletilerek, 30 µl'de 100 µg toplam protein olacak biçimde üst jelde oluşturulan çukurlara eklenerek ve %10 SDS-poliakrilamit jel elektroforez yöntemi ile yaklaşık 3 saatlik sürede ayrılmıştır.

Jeldeki proteinler yarı-kuru aktarma (*semi-dry transfer*) yöntemi ile dört buçuk saatlik sürede nitroselüloz membrana aktarılmıştır; bu işlem için 800 ml distile su içinde 5.8 g tris, 2.9 g glisin ve 0.37 g SDS içeren bir çözelti (pH 8.3) hazırlanmış ve kullanılmadan hemen önce pH değeri 8.3'e ayarlanarak içerisinde 80 ml alınıp üzerine 20 ml metanol (%20) eklenmiştir.

Proteinlerin jelden nitroselüloz membrana aktarıldığının belirlenebilmesi için jeller proteinleri özgül olmayan bir biçimde geri dönüşümsüz olarak bağlayan Coomassie mavisi boyama yöntemi ile boyanmıştır [242]. Coomassie mavisi çözeltisi (1 L distile su içinde 0.25 g Coomassie brilliant blue R 250, 400 ml metanol ve 70 ml asetik asit) içinde 4°C'de 12 saat inkübe edilen jeller, boyasızlaştırma çözeltisi I (*destaining solution I*) (20 ml metanol, 3.5 ml asetik asit ve 26.5 ml distile su) içinde 30 dakika inkübe edildikten sonra, boyasızlaştırma çözeltisi II (*destaining solution II*) (3.5 ml asetik asit, 2.5 ml metanol, 44 ml distile su ve 0.5 ml gliserol) içinde inkübe edilmiştir. Jelin zeminindeki mavi renk açılıncaya dek boyasızlaştırma çözeltisi II 1 veya 2 kez değiştirilmiştir. Ayrıca, jelden proteinlerin nitroselüloz membrana ne derecede aktarıldığının anlaşılabilmesi için membranlar proteinleri geri dönüşümlü olarak bağlayan Ponceau S boyası (100 ml distile su içinde 2 g Ponceau S, 30 g trikloroasetik asit, 30 g sülfosalisilik asit; kullanılmadan hemen önce 1/10 oranında distile su ile seyreltilecektir) ile boyanmış ve distile su ile yıkanmıştır [243].

Proteinlerin jelden membrana aktarımının sağlandığı görüldükten sonra, membranlar TTÇ (3 g tris, 8 g NaCl, 2 g KCl ve 0.5 ml Tween 20 [%0.05] 1 L distile içinde, pH 7.4) ile yıkanarak, yağsız kurutulmuş süt tozu (non-fat dry milk; YKST) içeren tris tampon çözeltisi (TTÇ) ile bloke edilip, primer antikorlar ile 4°C'de 12 saat inkübe edilmiştir. Membranlara bağlanmamış proteinler 3 kez 5 dakika TTÇ ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmelerinin ardından 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkanmışlardır. Bazı deneylerde kullanılan membranlar, 3 kez 5 dakika TTÇ ile yıkandıktan sonra, %2 YKST + %2 SSA karışımı ile oda sıcaklığında 20 dakika bloke edilerek, 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkanmış ve aktin protein için primer ve sekonder antikorlar ile inkübe edilmeye hazır duruma getirilmiştir.

Coomassie mavisi boyama yöntemi ile boyanan jeller doğrudan, nitroselüloz membranda bulunan immünoreaktif proteinler ise membranların görüntüleme çözeltisi (ECL prime western blotting detection reagents; RPN 2232, Amersham) ile inkübe edilmesinin

ardından jel dökümantasyon ve analiz sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Bir jel dokümantasyon ve analiz sistemi sistemi ile görüntülenen immünoreaktif proteinlerin yoğunluk analizi bir yazılım programı (*ImageJ 1.46r, Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA*) kullanılarak yapılmıştır. Enzimlere ilişkin protein ekspresyon düzeyleri göreceli birim/mg toplam protein/aktin olarak gösterilmiştir.

3.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. Kullanılan sıçan sayısı n ile ifade edilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek-yönlü varyans analizi (*analysis of variance, ANOVA*) ve ardından *Student-Newman-Keuls* çoklu karşılaştırmalar testi ile ikili karşılaştırmalar için *Student's t* testi kullanılmıştır. Bu testler *GraphPad Prism version 5.01 for Windows* (*GraphPad Software, San Diego California USA, <http://www.graphpad.com>*) programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel olarak 0.05'ten küçük P değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

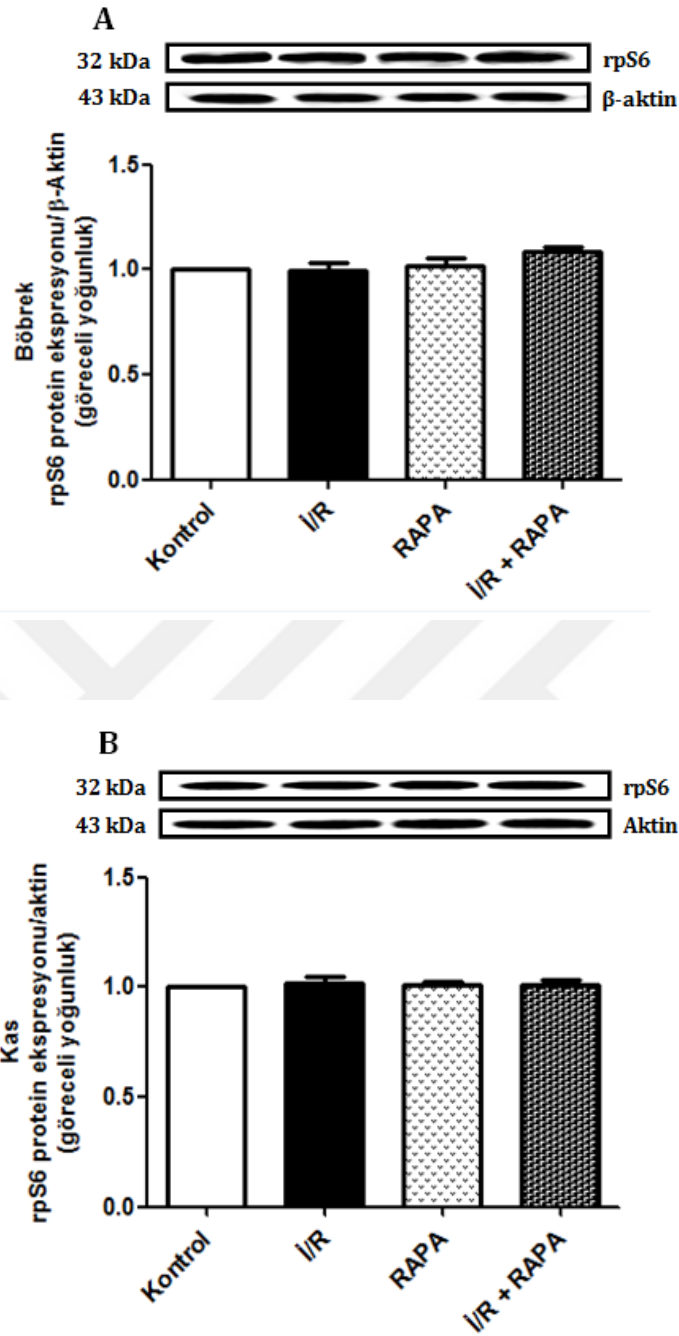
4. BULGULAR

4.1. İ/R ve/veya Rapamisin'in rpS6 Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi

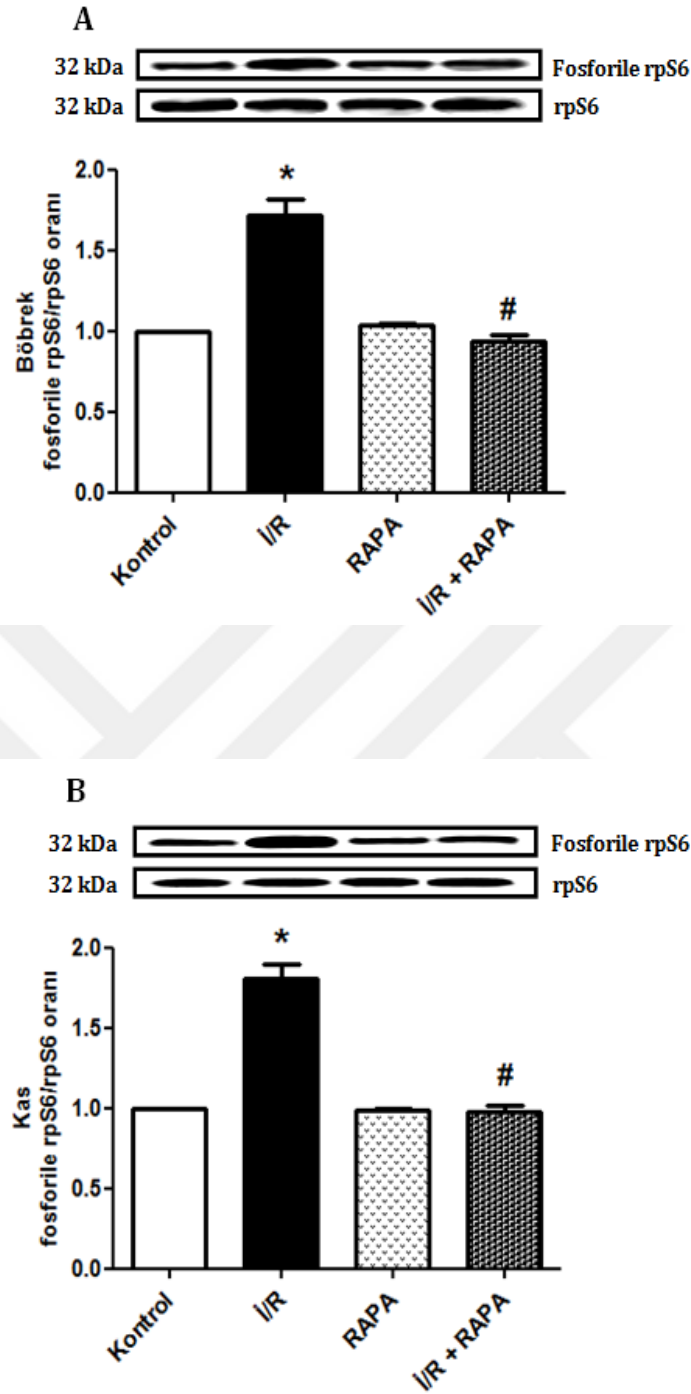
Kontrol grubu ve İ/R ve/veya rapamisin gruplarına 3. saatte serum fizyolojik veya rapamisin uygulanmasının ardından 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastrokinemius kasında rpS6 protein ekspresyonu ve fosforilasyonuna ilişkin bulgular Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

İ/R grubunda 8. saatin sonunda böbrek ve gastrokinemius kasında rpS6 protein ekspresyonu değişmemiş ($P > 0.05$), fosforilasyonunda artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). İ/R'nin neden olduğu bu artış rapamisin ile geri çevirilmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması, rpS6 protein ekspresyonu ve fosforilasyonunda herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, İ/R'de 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında rpS6 protein ekspresyonunun değişmediğini, mTOR etkinliğinin bir göstergesi olarak ölçülen rpS6 fosforilasyonunun arttığını ve İ/R'nin neden olduğu bu artışın rapamisin ile geri çevirilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.1. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında rpS6 protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.)rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4).).*Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).



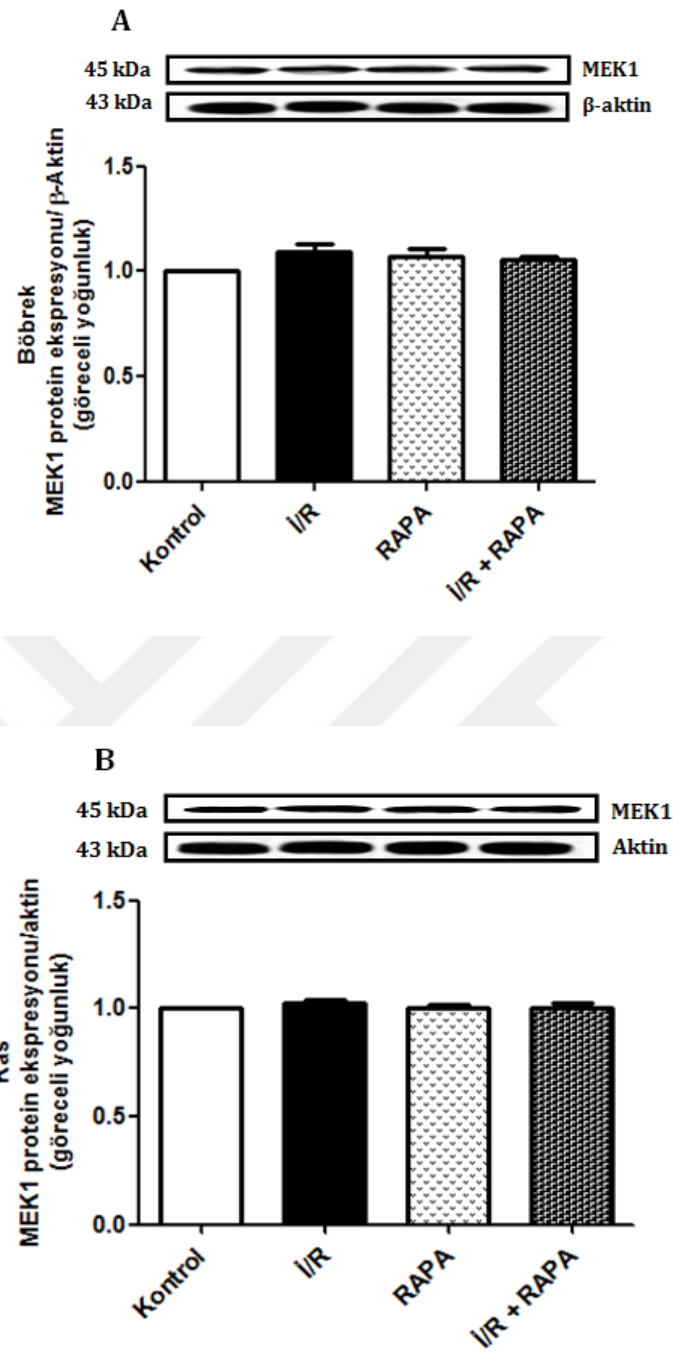
Şekil 4.2. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında rpS6 protein fosforilasyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.)rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4).).*Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).

4.2. İ/R ve/veya Rapamisinin MEK1 Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi

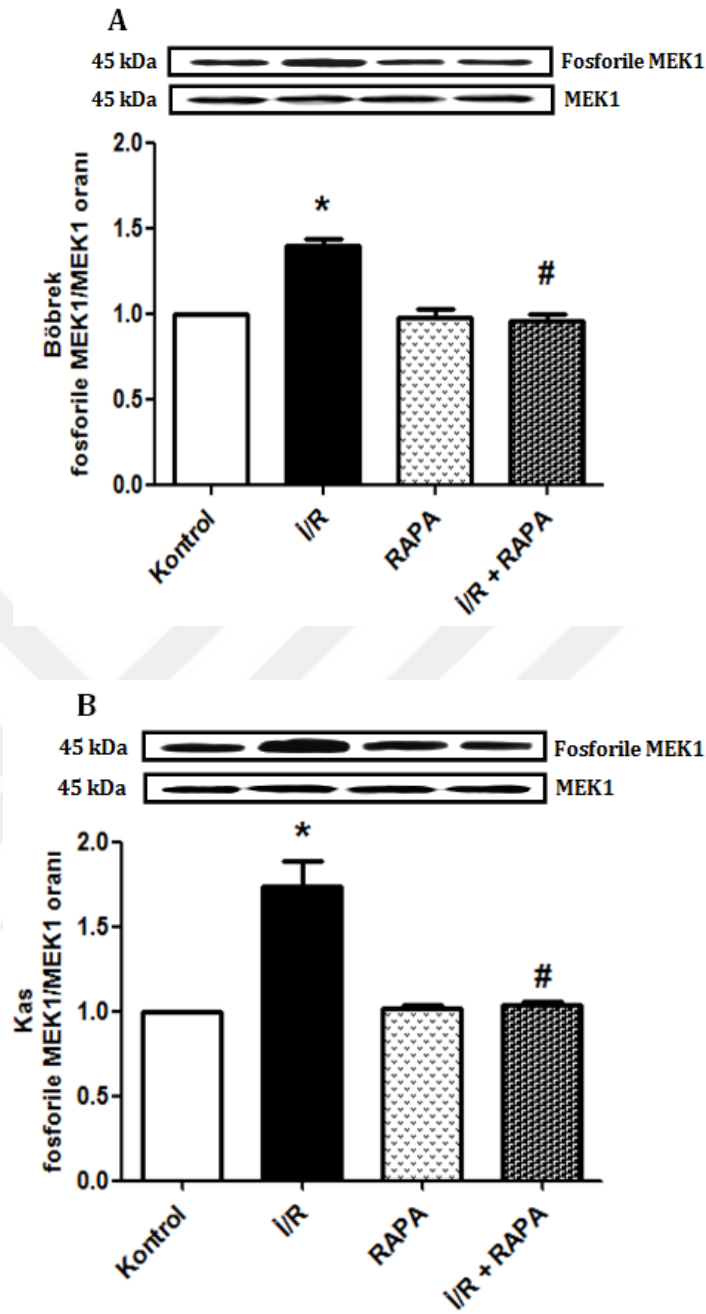
Kontrol grubu ve İ/R ve/veya rapamisin gruplarına 3. saatte serum fizyolojik veya rapamisin uygulanmasının ardından 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastrokinemius kasında MEK1 protein ekspresyonuna ilişkin bulgular Şekil 4.3, MEK1 fosforilasyonuna ilişkin bulgular ise Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

İ/R grubunda 8. saatin sonunda böbrek ve gastrokinemius kasında MEK1 protein ekspresyonu değişmemiş ($P > 0.05$), fosforilasyonunda artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). İ/R'nin neden olduğu bu artışı rapamisin ile geri çevirilmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması MEK1 protein ekspresyonu ve fosforilasyonunda herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, İ/R'de 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında MEK1 protein ekspresyonunun değişmediğini, MEK1 fosforilasyonunun arttığını ve İ/R'nin neden olduğu bu artışın rapamisin ile geri çevirilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.3. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında MEK1 protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.), rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). *Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).



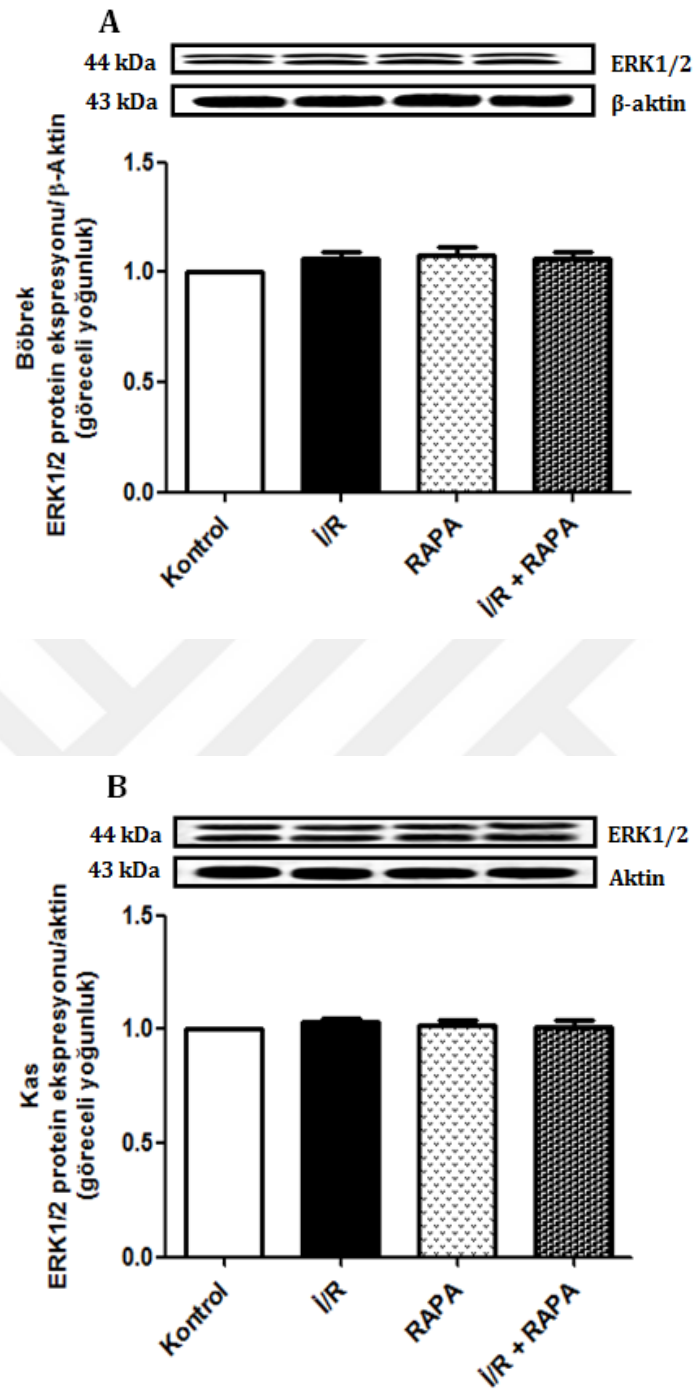
Şekil 4.4. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında MEK1 protein fosforilasyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.), rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). *Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).

4.3. İ/R ve/veya Rapamisinin ERK1/2 Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi

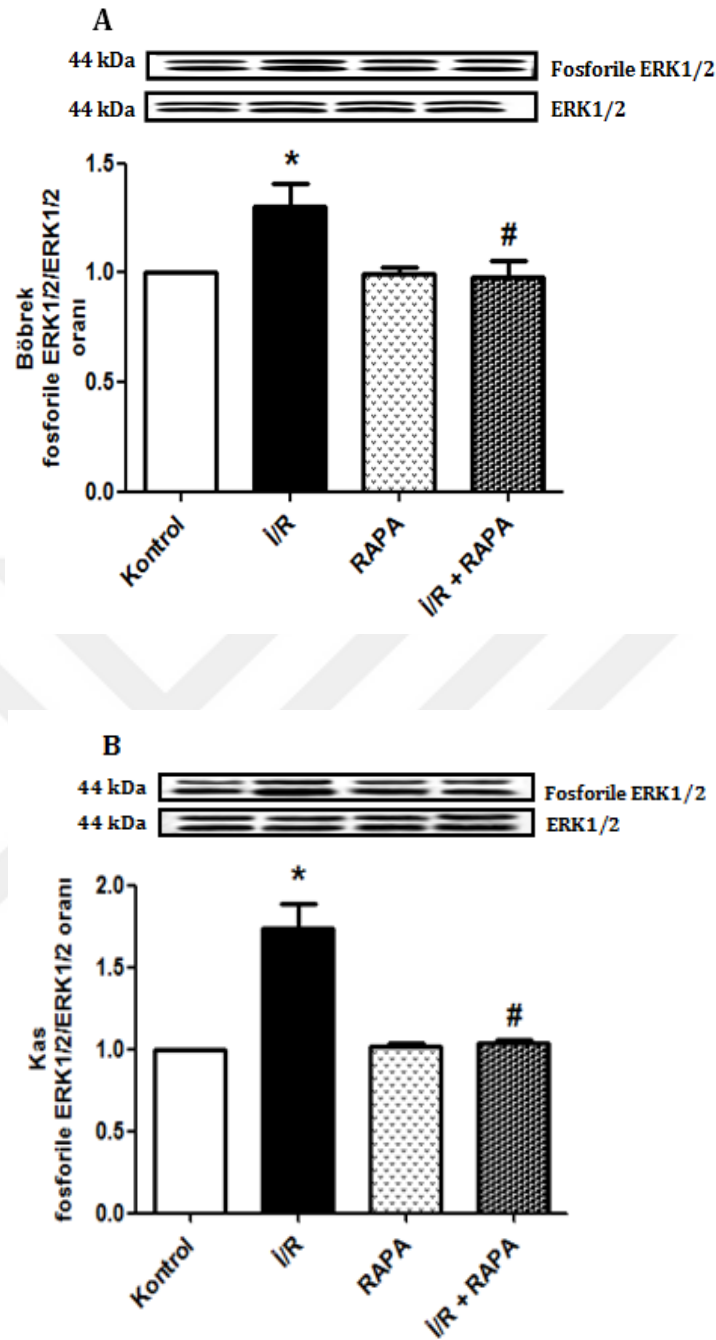
Kontrol grubu ve İ/R ve/veya rapamisin gruplarına 3. saatte serum fizyolojik veya rapamisin uygulanmasının ardından 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastrokinemius kasında ERK1/2 protein ekspresyonu ve fosforilasyonuna ilişkin bulgular Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

İ/R grubunda 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında ERK1/2 protein ekspresyonu değişmemiş ($P > 0.05$), fosforilasyonda artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). İ/R'nin neden olduğu bu artış rapamisin ile geri çevirilmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek ve gastrokinemius kasında ERK1/2 / ERK1/2 protein ekspresyonu ve fosforilasyonunda herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, İ/R'de 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında ERK1/2 protein ekspresyonunun değişmediğini, ERK1/2 fosforilasyonunun arttığını ve İ/R'nin neden olduğu bu artışın rapamisin ile geri çevirilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.5. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında ERK1/2 protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.), rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). *Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).



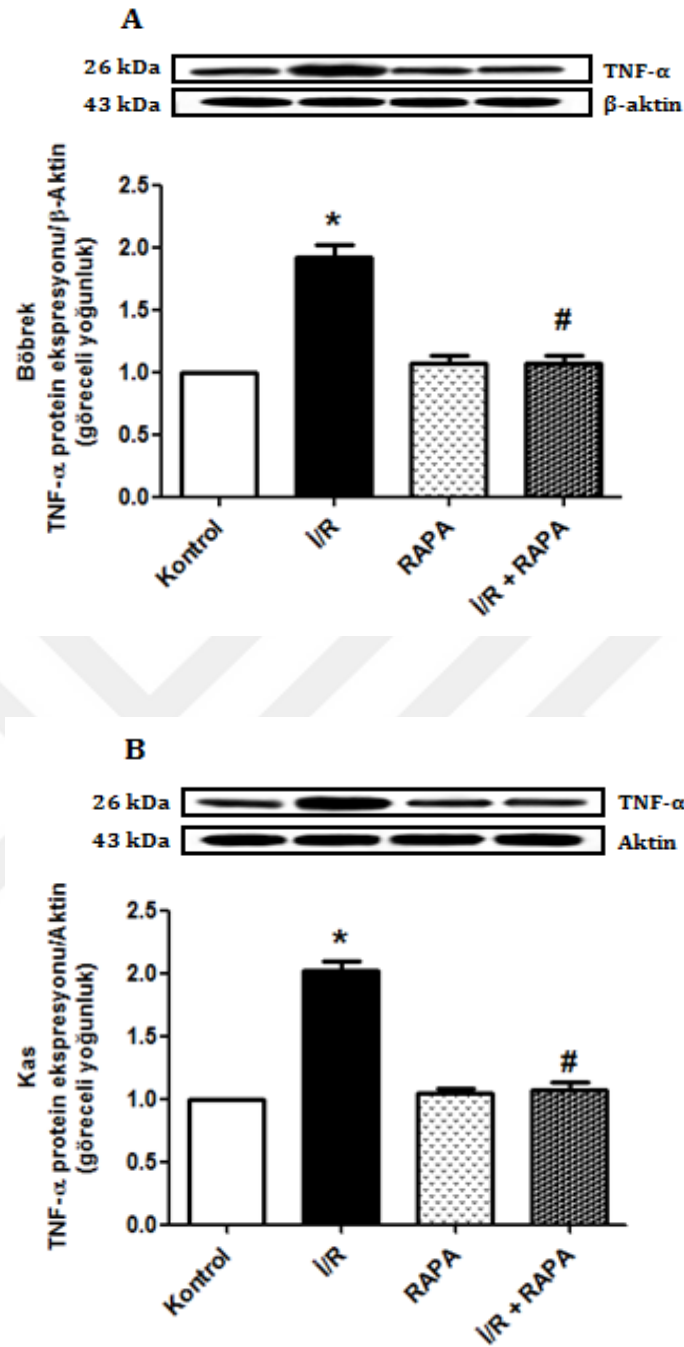
Şekil 4.6. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında ERK1/2 protein fosforilasyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.), rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). *Kontrol ve İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).

4.4. İ/R ve/veya Rapamisinin TNF- α Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

Kontrol grubu ve İ/R ve/veya rapamisin gruplarına 3.saatte serum fizyolojik veya rapamisin uygulanmasının ardından 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastrokinemius kasında TNF- α protein ekspresyonuna ilişkin bulgular Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

İ/R grubunda 8. saatin sonunda böbrek ve gastrokinemius kasında TNF- α protein ekspresyonunda artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). İ/R’nin neden olduğu bu artışı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek ve gastrokinemius kasında TNF- α protein ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, İ/R’de 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında TNF- α protein ekspresyonunun arttığını ve İ/R’nin neden olduğu bu artışın rapamisin ile geri çevirilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.7. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında ölçülen TNF- α protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.), rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). *Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).

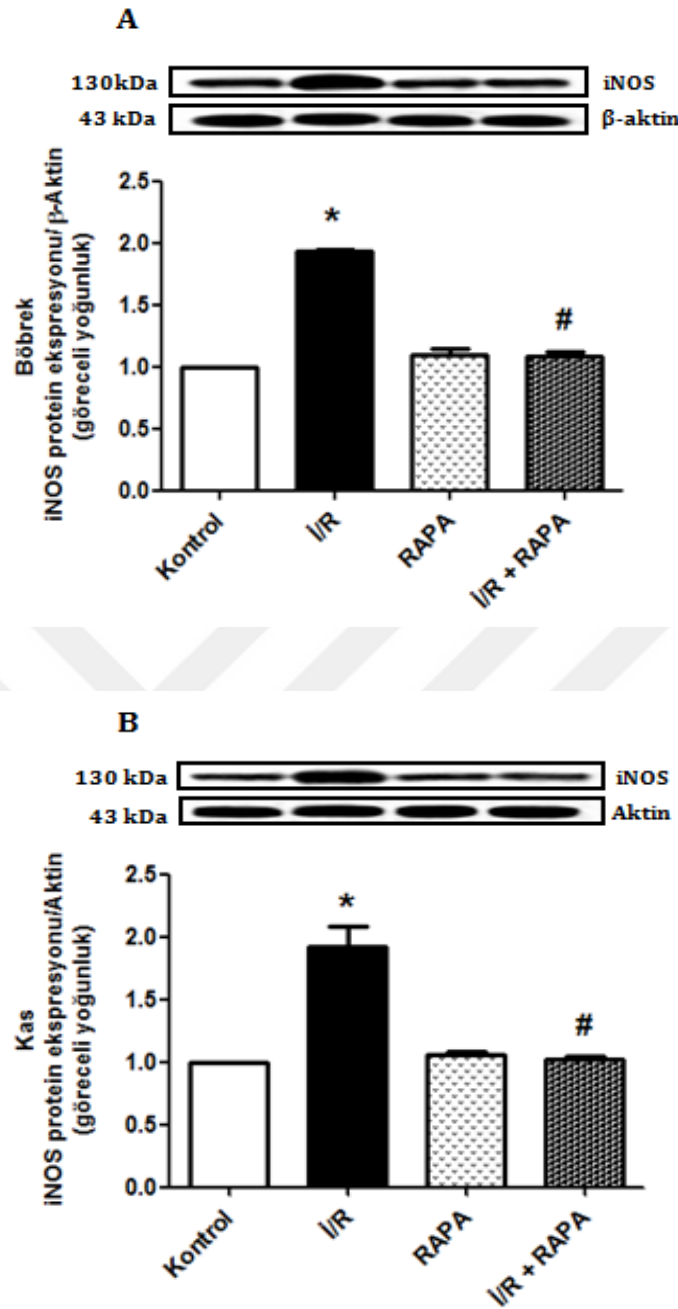
4.5. İ/R ve/veya Rapamisinin iNOS Protein Ekspresyonu ve Nitrit Düzeyi Üzerindeki Etkisi

4.5.1. İ/R ve/veya Rapamisinin iNOS Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

Kontrol grubu ve İ/R ve/veya rapamisin gruplarına 3. saatte serum fizyolojik veya rapamisin uygulanmasının ardından 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastrokinemius kasında iNOS enziminin protein ekspresyonuna ilişkin bulgular Şekil 4.8’de gösterilmiştir.

İ/R grubunda 8. saatin sonunda böbrek ve gastrokinemius kasında iNOS protein ekspresyonunda artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). İ/R’nin neden olduğu bu artışı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek ve gastrokinemius kasında iNOS protein ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, İ/R’de 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında iNOS protein ekspresyonun arttığını ve bu artışın rapamisin ile geri çevirilebildiğini göstermektedir.



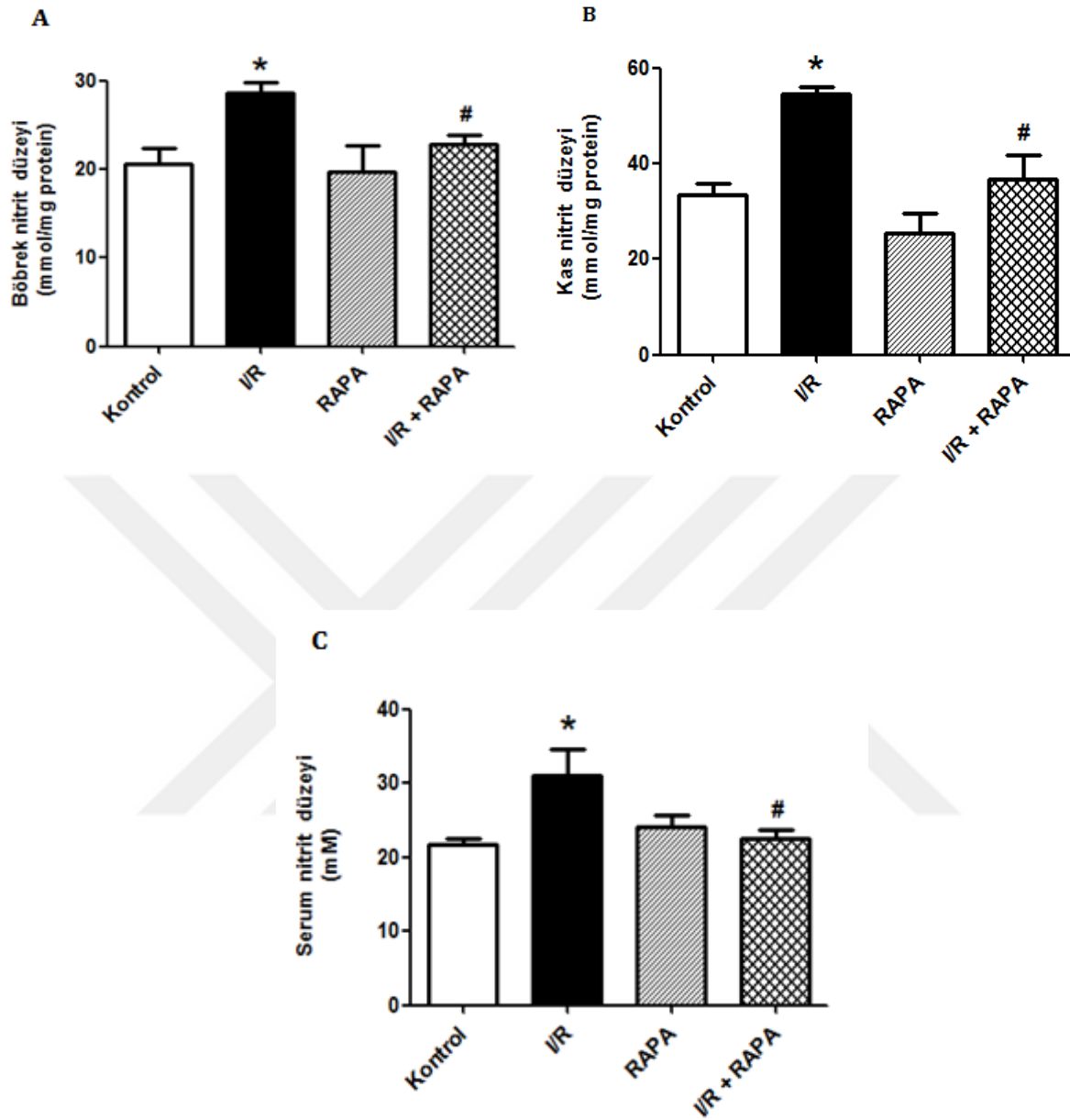
Şekil 4.8. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında iNOS protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.), rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). * Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).

4.5.2. İ/R ve/veya Rapamisinin Nitrit Düzeyi Üzerindeki Etkisi

Kontrol grubu ve İ/R ve/veya rapamisin gruplarına 3.saatte serum fizyolojik veya rapamisin uygulanmasının ardından 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen serum, böbrek ve gastrokinemius kasında nitrit düzeylerine ilişkin bulgular Şekil 4.9.'da gösterilmiştir.

İ/R grubunda 8. saatin sonunda serum, böbrek ve gastrokinemius kasında nitrit düzeylerinde artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). İ/R'nin neden olduğu olduğu bu artışı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması serum, böbrek ve gastrokinemius kasında nitrit düzeylerinde herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, İ/R'de 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların serum, böbrek ve gastrokinemius kasında NO oluşumunun bir göstergesi olarak ölçülen nitrit düzeylerinin arttığını ve bu artışın rapamisin ile geri çevirilebildiğini göstermektedir.



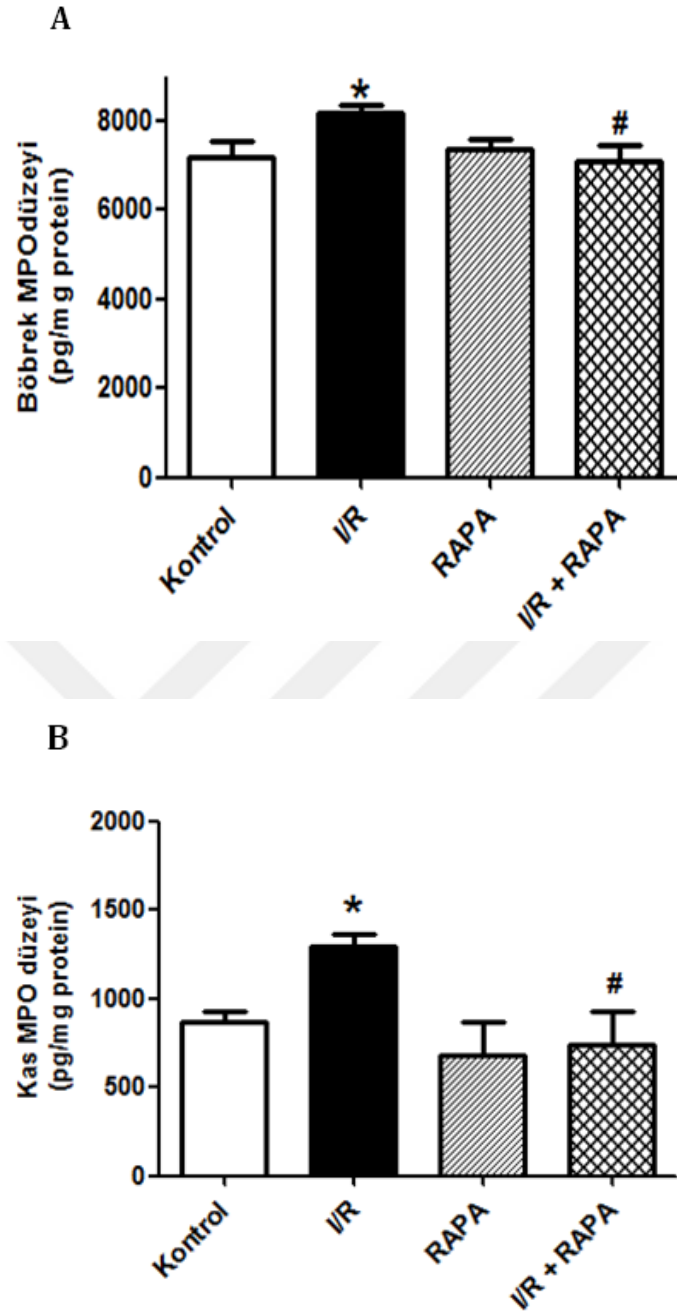
Şekil 4.9. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) gastrokinemius kası ve (C) serumlarında nitrit düzeyleri üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.), rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). *Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).

4.6. İ/R ve/veya Rapamisinin Doku MPO Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Kontrol grubu ve İ/R ve/veya rapamisin gruplarına 3. saatte serum fizyolojik veya rapamisin uygulanmasının ardından 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçarlardan izole edilen böbrek ve gastrokinemius kasında MPO etkinliğine ilişkin bulgular Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

İ/R grubunda 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında MPO etkinliğinde artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). İ/R'nin neden olduğu bu artışı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek ve gastrokinemius kasında MPO etkinliğinde herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, İ/R'de 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında nötrofil infiltrasyonu ve inflamasyonun bir göstergesi olarak ölçülen MPO etkinliğinin arttığını ve bu artışın rapamisin ile geri çevirilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.10. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında MPO etkinliği üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.), rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). *Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).

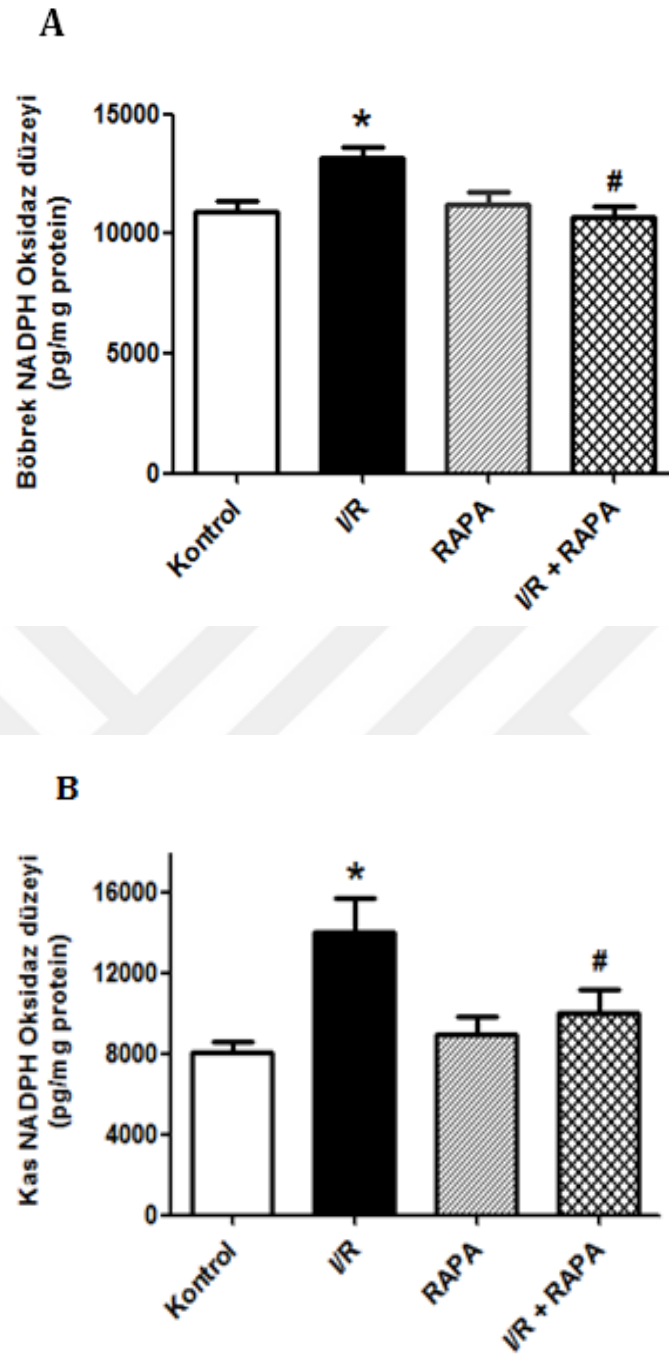
4.7. İ/R ve/veya Rapamisinin Doku NADPH Oksidaz Etkinliği, gp91^{phox}, p22^{phox} ve Nitrotirozin Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

4.7.1. İ/R ve/veya Rapamisinin Doku NADPH Oksidaz Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Kontrol grubu ve İ/R ve/veya rapamisin gruplarına 3. saatte serum fizyolojik veya rapamisin uygulanmasının ardından 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastrokinemius kasında NADPH Oksidaz etkinliğine ilişkin bulgular Şekil 4.11’de gösterilmiştir.

İ/R grubunda 8. saatin sonunda böbrek ve gastrokinemius kasında NADPH Oksidaz etkinliğinde artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). İ/R’nin neden olduğu olduğu bu artışı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek ve gastrokinemius kasında NADPH Oksidaz etkinliğinde herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, İ/R’de 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında NADPH Oksidaz etkinliğinin arttığını ve bu artışın rapamisin ile geri çevirilebildiğini göstermektedir.



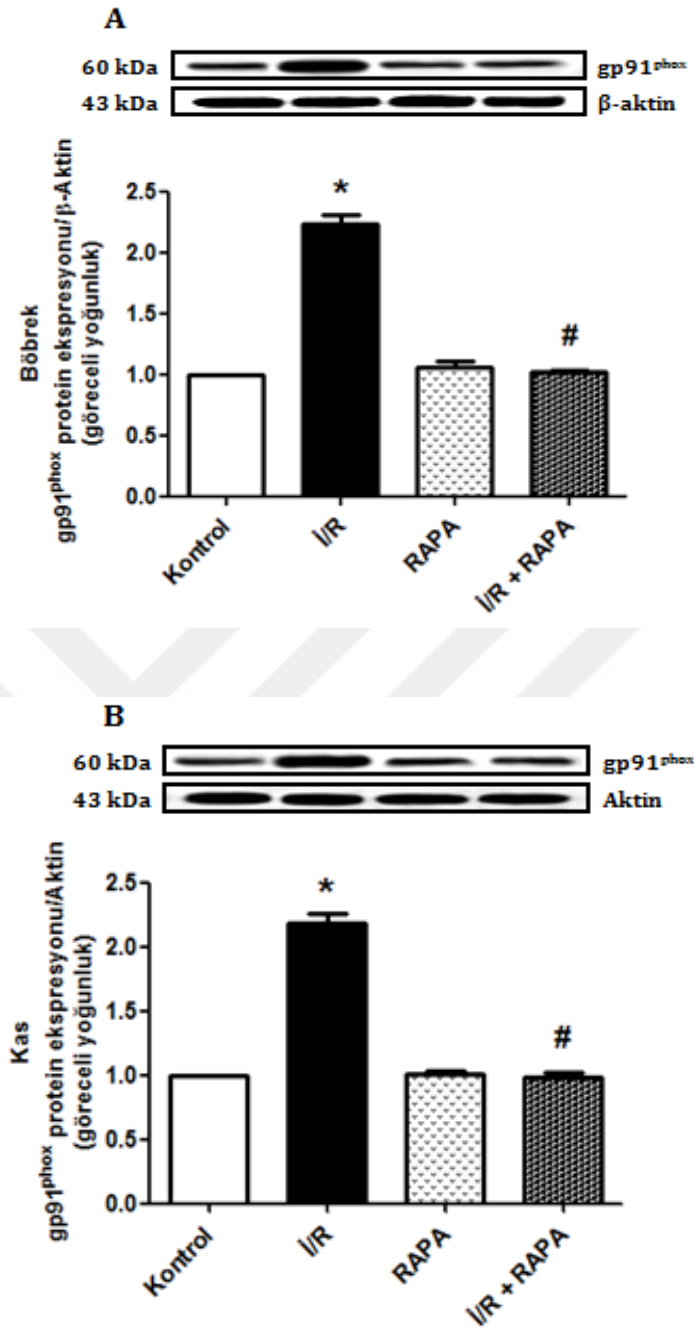
Şekil 4.11. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında NADPH Oksidaz etkinliği üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.), rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). *Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).

4.7.2. İ/R ve/veya Rapamisinin gp91phox Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

Kontrol grubu ve İ/R ve/veya rapamisin gruplarına 3. saatte serum fizyolojik veya rapamisin uygulanmasının ardından 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastrokinemius kasında gp91phox protein ekspresyonuna ilişkin bulgular Şekil 4.12’de gösterilmiştir.

İ/R grubunda 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında gp91^{phox} protein ekspresyonunda artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). İ/R’nin neden olduğu bu artışı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek ve gastrokinemius kasında gp91phox protein ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, İ/R’de 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında gp91^{phox} protein ekspresyonun arttığını ve bu artışın rapamisin ile geri çevirilebildiğini göstermektedir.



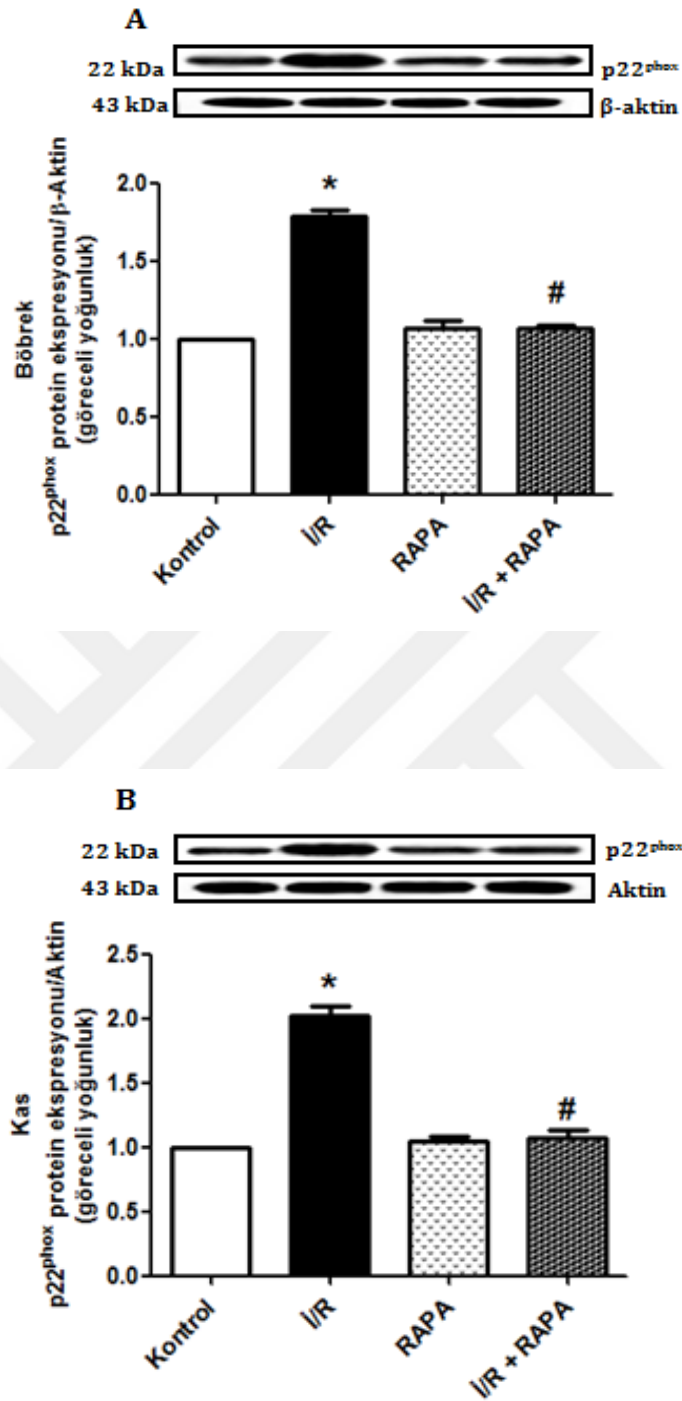
Şekil 4.12. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında gp91^{phox} protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.), rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). *Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).

4.7.3. İ/R ve/veya Rapamisinin p22^{phox} Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

Kontrol grubu ve İ/R ve/veya rapamisin gruplarına 3. saatte serum fizyolojik veya rapamisin uygulanmasının ardından 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastrokinemius kasında p22^{phox} protein ekspresyonuna ilişkin bulgular Şekil 4.13’de gösterilmiştir.

İ/R grubunda 8. saatin sonunda böbrek ve gastrokinemius kasında p22^{phox} protein ekspresyonunda artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). İ/R’nin neden olduğu olduğu bu artışı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek ve gastrokinemius kasında p22^{phox} protein ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, İ/R’de 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında p22^{phox} protein ekspresyonun arttığını ve bu artışın rapamisin ile geri çevirilebildiğini göstermektedir.



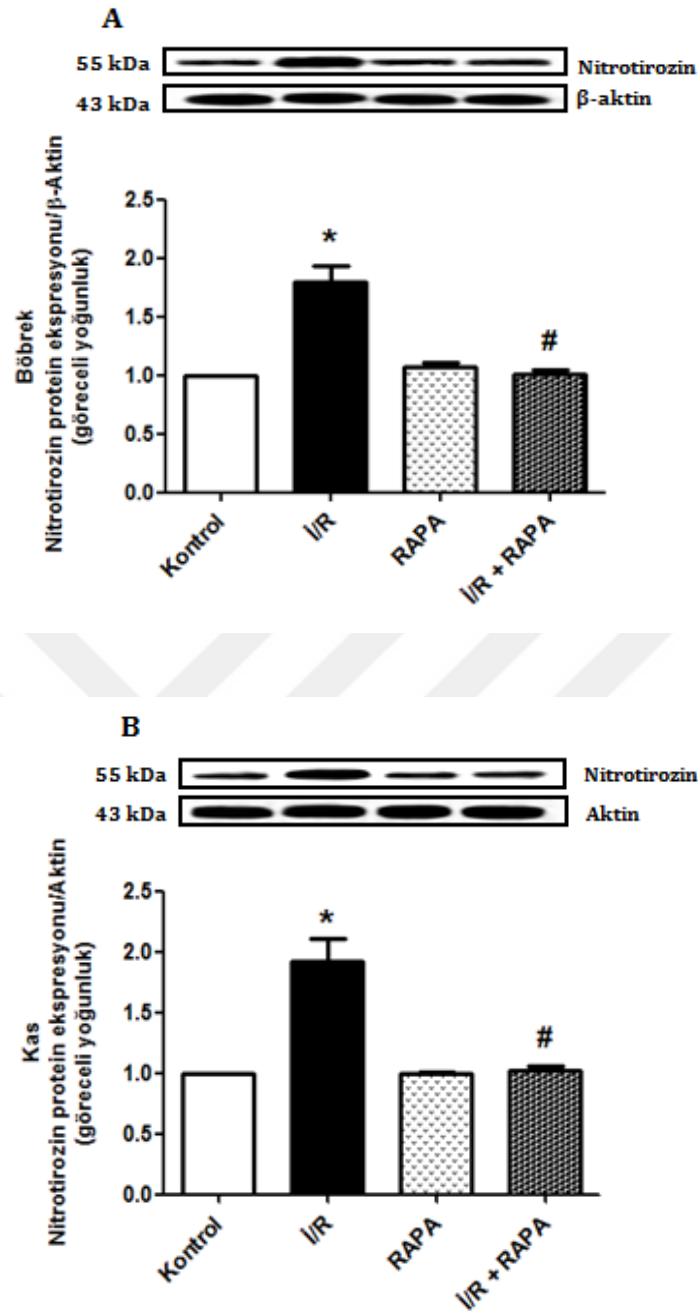
Şekil 4.13. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında p22^{phox} protein ekspresyonu üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.), rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). *Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek yönlü varyans analizi ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi veya Student's t testi; $P < 0.05$).

4.7.4. İ/R ve/veya Rapamisinin Nitrotirozin Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

Kontrol grubu ve İ/R ve/veya rapamisin gruplarına 3. saatte serum fizyolojik veya rapamisin uygulanmasının ardından 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastrokinemius kasında nitrotirozin protein ekspresyonuna ilişkin bulgular Şekil 4.14'te gösterilmiştir.

İ/R grubunda 8. saatin sonunda böbrek ve gastrokinemius kasında nitrotirozin protein ekspresyonunda artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). İ/R'nin neden olduğu olduğu bu artışı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek ve gastrokinemius kasında nitrotirozin protein ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, İ/R'de 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ve gastrokinemius kasında nitrotirozin protein ekspresyonunun arttığını ve bu artışın rapamisin ile geri çevirilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.14. Kontrol ve İ/R ve/veya rapamisin grubundaki sıçanların (A) böbrek ve (B) gastrokinemius kasında ölçülen nitrotirozin düzeyleri üzerinde İ/R ve/veya rapamisinin etkisi. 3. saatte serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) kontrol grubuna; rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.), rapamisin ile İ/R ve rapamisin grubuna uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). *Kontrol ve #İ/R değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarla, sıçanlarda periferik İ/R modelinde gelişen hedef ve uzak organ zedelenmelerine aracılık eden ve mTOR etkinliğinde oluşabilecek değişiklikler sonucunda ortaya çıkabilecek inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif stres süreçlerinde MEK1/ERK1/2 etkinliğinin ne yönde değiştiği, seçici ve güçlü bir mTOR inhibitörü olan rapamisin kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla mTOR etkinliğindeki artış sonucunda oluşumları artan proinflamatuvar etkili mediyatörler ile birlikte ortaya çıkan oksidatif/nitrozatif stres mTOR/MEK1/ERK1/2 yolu etkinliği ile ilişkilendirilmiştir. Bulgularımız, mTOR'un rapamisin ile seçici inhibisyonun İ/R'ye bağlı ortaya çıkan ve MEK1/ERK1/2 etkinliğinin rol oynadığı hedef ve uzak organ zedelenmelerine aracılık eden inflamasyon ve oksidatif/nitrozatif stresi geri çevirdiğini göstermektedir. İnflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif stres ile belirgin İ/R'nin neden olduğu hedef ve uzak organ zedelenmelerinde mTOR'un rapamisin ile seçici inhibisyonu; (1) mTOR etkinliğindeki artışın, (2) mTOR/MEK1/ERK1/2 yolunun artan etkinliğine bağlı olarak TNF- α gibi proinflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonlarındaki artışın, (3) iNOS kaynaklı artan NO üretimi ile MPO ve NADPH oksidaz enzimlerinin etkinliği ile NADPH oksidaz enziminin alt birimlerinden p22^{phox} ve gp91^{phox} ekspresyonlarının artması ve nitro tirozin oluşumu ile ortaya çıkan oksidatif/nitrozatif stresin geri çevirilmesi ile sonuçlanmaktadır.

Bu çalışmada, 3. saatte serum fizyolojik ve/veya rapamisin uygulanan kontrol ile İ/R grupları ve/veya rapamisin gruplarında 8. saatin sonunda sakrifiye edilen sıçanların böbrek ile gastrokinemius kasları izole edilmiş ve bu dokularda rpS6, MEK1, ERK1/2, TNF- α , iNOS, p22^{phox}, gp91^{phox} ve nitro tirozin protein ekspresyon ve/veya fosforilasyonlarının seçici mTOR inhibitörü rapamisin ile ne yönde değiştiği araştırılmıştır. Bunun yanı sıra dokularda MPO ve NADPH oksidaz etkinlikleri ile NO oluşumunun göstergesi olarak serum ve dokularda nitrit düzeyleri de araştırılmıştır. Çalışmalarımızın sonucunda elde ettiğimiz bulgular, sıçanlarda periferik İ/R'ye bağlı ortaya çıkan hedef ve uzak organ zedelenmelerine aracılık eden inflamasyon ve oksidatif/nitrozatif strese, mTOR enziminin etkinliğindeki artışın, MEK1/ERK1/2 yolu etkinliğinde artma ile birlikte proinflamatuvar mediyatörlerin üretiminde artmaya ve MPO ile NADPH oksidaz etkinliğindeki artma sonucunda ortaya çıkan oksidatif/nitrozatif strese katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Rapamisinin hedef molekülü olan mTOR, PI3K kinaz ailesine ait bir serin/treonin kinaz enzimidir. PI3K/Akt yolunun hücre büyümesi, metabolizması ve canlılığının düzenlenmesi ile immün sistem hücrelerinin işlevleri gibi pek çok biyolojik sürecin yanı sıra sistemik inflamatuvar yanıt gelişimi, nörodejeneratif, metabolik ve kardiyovasküler hastalıklar gibi inflamatuvar yanıt ile belirgin patolojilerde de önemli rolünün olduğu bilinmektedir [9]. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, mTOR sinyal ileti yolunun, hem *in vivo* hem de *ex vivo* İ/R

modellerindeki inflamatuvar yanıtta rol aldığı gösterilmiştir [10, 11]. Çalışmamızda, İ/R zedelenmesi sonucu gelişen inflamasyon ve oksidatif/nitrozatif stres ile ilişkili patofizyolojik olaylarda mTOR etkinliğindeki değişiklikler, bu enzimin etkinliğinin önemli bir göstergesi olan rpS6 fosforilasyonundaki değişiklikler üzerinden incelenmiştir. Daha önce yaptığımız çalışmalarda, mTOR etkinliğindeki artışa bağlı olarak, enzimin *downstream* hedef moleküllerinden rpS6'nın Ser^{240/244} bölgeleri üzerinden fosforilasyonundaki artış, LPS ve zimosan ile oluşturduğumuz sırasıyla septik ve septik olmayan şok ile arka bacak İ/R zedelenmesi gibi inflamatuvar modellerde böbrek, kalp, torasik aort, süperiyor mezenterik arter ve gastroknemius kasında gösterilmiştir [234, 184, 186]. Rapamisin artmış olan rpS6 fosforilasyonunu geri çevirirken rpS6 protein ekspresyonunda bir değişiklik gözlenmemiştir. Farelerle yapılan bir çalışmada, miyokardiyal İ/R'de reperfüzyon döneminde uygulanan rapamisinin olası terapötik etkisi araştırılmış ve İ/R sonrası gelişen rpS6 fosforilasyonundaki artışın 1 ve 24 saatlik reperfüzyon sonrası postiskemik rapamisin tedavisini takiben kalktığı gösterilmiştir [242]. Başka bir çalışmada ise diyabetik hastalarda sıklıkla görülen miyokart infarktüsünde mTOR'un rolünü araştırmak üzere, *in vitro* koşullarda mTOR etkinliğini göstermek amacıyla kullanılan *Langendorff* modelinde izole fare kalbine 30 dakika iskemi ardından 60 dakika reperfüzyon uygulanması sonucunda miyokart dokusunda rpS6 fosforilasyonunun arttığı ve rapamisinin bu artışı geri çevirdiği gösterilmiştir [244]. Çalışmamızın bulgularına göre, İ/R'nin neden olduğu inflamatuvar yanıt ve oksidatif strese paralel olarak mTOR etkinliği de artmaktadır. mTOR etkinliğindeki bu artış, rpS6'nın Ser^{240/244} bölgelerinden fosforilasyonunda artma ile gösterilmiş olup, İ/R'nin 8. saatinin sonunda izole edilen böbrek ve gastroknemius kasında gözlenen bu artış rapamisin uygulaması ile geri çevirilmiştir. mTOR'un rapamisin ile inhibisyonu rpS6 fosforilasyonundaki artış ile birlikte İ/R zedelenmelerine aracılık eden inflamatuvar ve oksidatif/nitrozatif süreçleri de geri çevirmiştir. Elde ettiğimiz bu veriler İ/R'ye bağlı olarak meydana gelen inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif strese mTOR enziminin Ser^{240/244} bölgelerinden fosforilasyonu sonucu etkinliğindeki artışın katkı sağladığını düşündürmektedir.

Bir serin/treonin kinaz ailesi olan MAPK'lerin ana alt familyasına ait ERK1/2, inflamasyon, hücre büyümesi/farklılaşması ve hücrenin hayatta kalması dahil çeşitli hücresel süreçlerde yer almakta ve bir MAPKK olan MEK1 tarafından, tirozin ve treonin kalıntıları üzerinden fosforillenerek etkinleştirilmektedir [45]. Ras-ERK ve PI3K-mTOR sinyal ileti yolları, hücrede farklı uyarılara cevap olarak gelişen başlıca mekanizmaların kontrolünde önemli rol oynarlar ve birbirlerinin etkinliklerini olumlu ya da olumsuz olarak etkileyerek, *down-stream* efektörlerini birlikte düzenleyecek şekilde kesişebilirler [185]. Çalışmamızda temelinde inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif stres ile belirgin İ/R'ye bağlı hedef ve uzak organ zedelenmelerinde mTOR etkinliğindeki artış ile birlikte artan MEK1/ERK1/2 etkinliğinin

inflamatuvar ve oksidan etki oluşturup oluşturmadığını araştırmak amacıyla bu enzimin, MEK1 ve ERK1/2 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerindeki etkisi, böbrek ve gastrokinemius kasında incelenmiştir. Daha önce mTOR enziminin inflamasyondaki rolünü araştırdığımız bir çalışmada, sıçanlara zimosan uygulanması ile oluşturulan hipotansiyon, inflamasyon ve oksidatif/nitrozatif stres ile belirgin non-septik şokta gelişen sistemik inflamatuvar yanıt ve buna bağlı doku zedelenmesine, mTOR/MEK1/ERK1/2/I κ B/NF- κ B sinyal ileti yolu etkinliğindeki artmaya bağlı olarak oluşan proinflamatuvar ve aynı zamanda vazodilatör mediyatör oluşumundaki artışın aracılık ettiği gösterilmiştir. Zimosan ile oluşturulan ve mTOR'un aracılık ettiği bu etkiler rapamisin ile geri çevirilmiştir. Bu çalışmada, artmış inflamatuvar yanıtın mTOR/MEK1/ERK1/2/IKK β /I κ B- α /NF- κ B sinyal ileti yolunun etkinliğiyle bağlantılı olduğu gözlenmiştir [186]. Daha önceki çalışmalarımızdan yola çıkarak yapmış olduğumuz bu tez çalışmasında, İ/R zedelenmesiyle böbrek ve gastrokinemius kasında görülen MEK1 ve ERK1/2 fosforilasyonundaki artış, mTOR'un rapamisin tarafından inhibisyonu ile geri çevirilmiştir. mTOR, MEK1 ve ERK1/2 arasındaki karşılıklı pozitif ilişki diğer literatürlerde de bizim çalışmalarımıza benzer biçimde gösterilmiştir. mTORK1 inhibitörü ile yapılan bir faz-I klinik araştırmada, metastatik meme kanseri hastalarında mTOR ile birlikte ERK etkinliğinde de artış olduğu gösterilmiştir [187]. Başka bir çalışmada ise, mTOR inhibitörü rapamisinin, mTOR ve ERK1/2'nin fosforilasyonundaki Ang-II kaynaklı artışları, büyük ölçüde önlediği görülmüştür [244]. Bizim çalışmamızda da İ/R zedelenmesinde, etkinliği rpS6 fosforilasyonundaki artış ile gösterilen mTOR'un etkinliği sonucunda böbrek ve gastrokinemius kasında, MEK1 ve ERK1/2 fosforilasyonunda artma gözlenirken, MEK1 ve ERK1/2 proteinlerinin ekspresyonunda değişme görülmemiştir. MEK1 ve ERK1/2 fosforilasyonundaki bu artış mTOR'un rapamisin tarafından inhibisyonu ile geri çevirilmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bu sonuçlar ve literatür bilgisi ışığında, rapamisinin antiinflamatuvar ve antioksidan etkilerini mTOR/MEK1/ERK1/2 etkinliğinin inhibisyonu üzerinden proinflamatuvar ve prooksidan mediyatörlerin oluşumunu azaltarak gösterdiği gözlenmektedir.

İnflamasyon İ/R zedelenmesinde çok önemli bir faktördür ve İ/R'de rol oynayan inflamatuvar mediyatörlerin sistemik dolaşıma salıverildiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır [1, 5, 6, 7]. Son zamanlarda, MAPK'lerin sistemik inflamatuvar yanıtın aracılık ettiği birçok hastalığın patojenezinde yer alan proinflamatuvar sitokinlerin ve serbest radikallerin oluşumunda rol oynadığı öne sürülmüştür [50, 64]. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda MAPK aracılığıyla etkinleşen NF- κ B'nin, sistemik inflamatuvar yanıtı aracılık eden TNF- α , IL-1 β ve iNOS gibi proinflamatuvar etkili sitokin ve mediyatörleri kodlayan genlerin transkripsiyonlarını düzenlediği gösterilmiştir [19-22]. Ling ve ark. [247]'nin yapmış olduğu çalışmada rapamisinin sıçanlarda oluşturulan renal İ/R zedelenmesinde artan proinflamatuvar sitokinler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. İ/R grubunda TNF- α ve İNOS düzeylerinin arttığı ve

rapamisinin bu artışı geri çevirdiği gösterilmiştir. Lee ve ark. [50]'nın yaptığı bir çalışmada, etkinleştirilmiş ERK1/2 ve p38 gibi MAPK'lerin ekspresyonunun proinflamatuvar sitokinlerin ve serbest radikallerin üretiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, farelerde zimosanla oluşturulan şokta ERK1/2 ve ERK1/2'nin *up-stream efektörü* olan MEK1'in fosforilasyonunun arttığı gösterilmiş ve bu artış seçici bir MEK inhibitörü olan PD98059 ile inhibe edilmiştir [54]. TNF- α tarafından iNOS'un uyarılmasında, MAPK'lerin rolünün araştırıldığı bir çalışmada ise MEKK1-MKK4-JNK yolu etkinliğinin, iNOS'un TNF- α tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Akut inflamasyonda ve antitümöral immünitede önemli rol oynayan sitokinlerden biri olduğu gösterilen TNF- α , sentezlendiği makrofajlardan salıverilmesinin ardından tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörleri (TNFR)-I (p55) ve TNFR-II (p75) gibi spesifik reseptörlerine bağlanarak NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin etkinleşmesi ile birlikte gelişen ROT üretimi, adezyon moleküllerinin ve kemokinlerin ekspresyonunu başlatmaktadır. Sonuçta, postiskemik dokuda nötrofil infiltrasyonu ile birlikte inflamatuvar yanıt ortaya çıkmaktadır [38,40]. ROT üretimine katkıda bulunan ve etkinleşen nötrofillerin sitoplazmik granüllerinde bulunan MPO enzimi, NADPH oksidaz tarafından oluşturulan süperoksit radikali SOD aracılığıyla H_2O_2 'ye dönüştürülmesinin ardından H_2O_2 'yi daha güçlü bir radikal olan hipokloröz asite ya da OH $\cdot$ radikaline indirgemektedir [14, 72, 73]. ROT'un tetiklediği inflamatuvar mediyatörlere yanıt olarak daha fazla lökositin etkinleşmesine katkı sağlayan MPO, nötrofil infiltrasyonunun da önemli bir göstergesi olarak ölçülmektedir [97,113-120]. Tan ve ark. [249]'nın yapmış olduğu çalışmada renal İ/R zedelenmesinde artan MPO etkinliği gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında MPO, oksidatif strese aracılık eden önemli bir enzim olmakla birlikte, nötrofil infiltrasyonuna paralel olarak gelişen inflamatuvar yanıtın güçlü bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Çalışmamızda, İ/R zedelenmesinde mTOR, MEK1 ve ERK1/2'de görülen etkinlik artışının TNF- α ve iNOS protein ekspresyonları ile MPO enzim etkinliğindeki artış sonrası gelişen inflamatuvar yanıtı katkısı araştırılmıştır. mTOR enziminin inflamasyondaki rolünü araştırdığımız bir çalışmamızda, sıçanlara zimosan uygulanması ile oluşturulan non-septik şokta gelişen sistemik inflamatuvar yanıt ve buna bağlı doku zedelenmesinde artmış TNF- α ve IL-1 β üretiminin mTOR/MEK1/ERK1/2/IKK β /I κ B- α /NF- κ B sinyal ileti yolunun etkinliğiyle bağlantılı olduğu gözlenmiştir [186]. Daha önce yapmış olduğumuz bir başka çalışmada, sıçanlarda İ/R'nin neden olduğu hedef ve uzak organ zedelenmelerinde oluşan inflamasyon ve oksidatif/nitrozatif strese mTOR'un mTOR/I κ B- α /NF- κ B yolu etkinliğinde artışla birlikte TNF- α , iNOS üretimine ve MPO etkinliğine yol açarak katkıda bulunduğu gösterilmiştir. İ/R zedelenmesinin mTOR sinyal ileti yolunda artmaya bağlı olarak gelişen bu etkisi seçici bir mTOR inhibitörü olan rapamisin ile geri çevrilmiştir [184]. Ana Bilim Dalımız'da yapılan diğer çalışmalarda, LPS ile oluşturulan septik şok modellerinde görülen doku zedelenmelerinde gelişen inflamatuvar yanıtta mTOR'un

etkinliğindeki artışla birlikte TNF- α , iNOS üretimine neden olarak katkıda bulunduğu gösterilmiştir. mTOR enziminin etkinliği ile gelişen bu etki rapamisin ile geri çevirilmiştir [255]. Çalışmamızda ise, İ/R'nin 8.saatinin sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastrokinemius kasında güçlü bir proinflatuvar sitokin olan TNF- α ile iNOS protein ekspresyonunun yanı sıra nötrofil infiltrasyonun, inflamasyonun, oksidatif stresin ve dolayısıyla doku zedelenmesinin bir göstergesi olan MPO enzim etkinliğinin de belirgin şekilde arttığı gösterilmiş olup bu artış rapamisin ile geri çevirilmiştir. Çalışmamızın bulguları göz önüne alındığında İ/R'ye bağlı gelişen hedef ve uzak organ zedelenmelerinde ortaya çıkan inflamasyon ile oksidatif strese katkıda bulunduğunu düşündüğümüz TNF- α ve iNOS protein ekspresyonu ile MPO enziminin etkinliğindeki artışa, mTOR ile birlikte MEK1/ERK1/2 yolunun etkinliği aracılık ettiği görülmektedir.

TNF- α ve IL-1 β gibi stokinlerin, kendi reseptörleri aracılığı ile hücre içi sinyalizasyonun başlamasına ve böylece MAPK'nin etkinleşmesine, ardından da bir transkripsiyon faktörü olan ve iNOS gibi çeşitli enzimlerin genlerinin ekspresyonunu başlatan NF- κ B'nin etkinleşmesine öncülük ettiği bildirilmiştir [45]. İskemi ve sepsis gibi patolojilerde etkinleşen iNOS enziminin degradasyonu ile NO üretimi gerçekleşmektedir [250]. NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almakta iken, inflamasyonla tetiklenen aşırı ve kontrolsüz NO sentezi ise hücrede zararlı etkilere yol açabilmekte ve birçok patolojik duruma neden olabilmektedir [248]. NO bu özellikleri ile ideal bir patolojik haberci olarak kabul edilmektedir. NO üretimine aracılık eden iNOS, oksidatif stres süreçlerinde oluşan süperoksit radikalleri ile etkileşerek güçlü bir RNT olan peroksinitrit radikalini oluşturmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi moleküllerle etkileşmeye girerek oksidasyonlarına yol açan peroksinitrit, inflamasyon, İ/R ve ateroskleroz gibi patolojilerde rol oynamaktadır [112]. Yapılan bir çalışmada, serebral İ/R zedelenmesinde, inflamasyonda önemli rol oynayan iNOS ve COX-2 enzimlerinin mRNA ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir [251]. Ziypak ve ark. [252]'nin yaptığı renal İ/R çalışmasında ise, İ/R grubunda iNOS mRNA ekspresyonunun arttığını gösteren bulgular elde edilmiştir. Ayrıca farelerin RAW264.7 makrofaj hücrelerinde yapılan bir çalışmada, LPS ile artan iNOS protein ekspresyonunun ve nitrit üretiminin rapamisinin ile geri çevirildiği gösterilmiştir [253]. Bu çalışmamızda, İ/R zedelenmesi sonucu böbrek ve gastrokinemius kasında iNOS protein fosforilasyonunun artmış olduğu ve bu artışın rapamisin ile geri çevirildiği gözlenmiştir. Ayrıca böbrek, gastrokinemius kası ve serumda iNOS etkinliğinin ve NO üretiminin göstergesi olan nitrit düzeyleri ölçülmüştür. İ/R'de nitrit düzeyinde artış olduğu ve bu artışın rapamisin ile geri çevirildiği gözlenmiştir. Ana Bilim dalımız'da yapılan bir çalışmada, LPS'nin neden olduğu hipotansiyon ve inflamasyonda, iNOS ve COX-2 protein ekspresyonlarında artış gözlenmiş ve bu artışın rapamisin ile geri çevirildiği gösterilmiştir [254]. Daha önce yapmış olduğumuz başka

bir çalışmada, sıçanlarda İ/R'nin neden olduğu hedef ve uzak organ zedelenmelerinde oluşan inflamasyon ve oksidatif/nitrozatif strese mTOR'un, mTOR/I κ B- α /NF- κ B yolu etkinliği ile birlikte iNOS ekspresyonu ve nitrit düzeyinde artışa yol açarak katkıda bulunduğu gösterilmiştir. İ/R zedelenmesine bağlı olarak gelişen bu artış seçici bir mTOR inhibitörü olan rapamisin ile geri çevirilmiştir [184]. Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgulara göre, iNOS protein ekspresyonundaki ve nitrit düzeylerindeki artmanın rapamisin ile geri çevrilmesi, İ/R'ye bağlı gelişen hedef ve uzak organ zedelenmelerine aracılık eden inflamasyon ve oksidatif/nitrozatif stres süreçlerine katkıda bulunduğunu gösterdiğimiz mTOR ile birlikte MEK1/ERK1/2 etkinliğindeki artışın rol oynadığını göstermektedir.

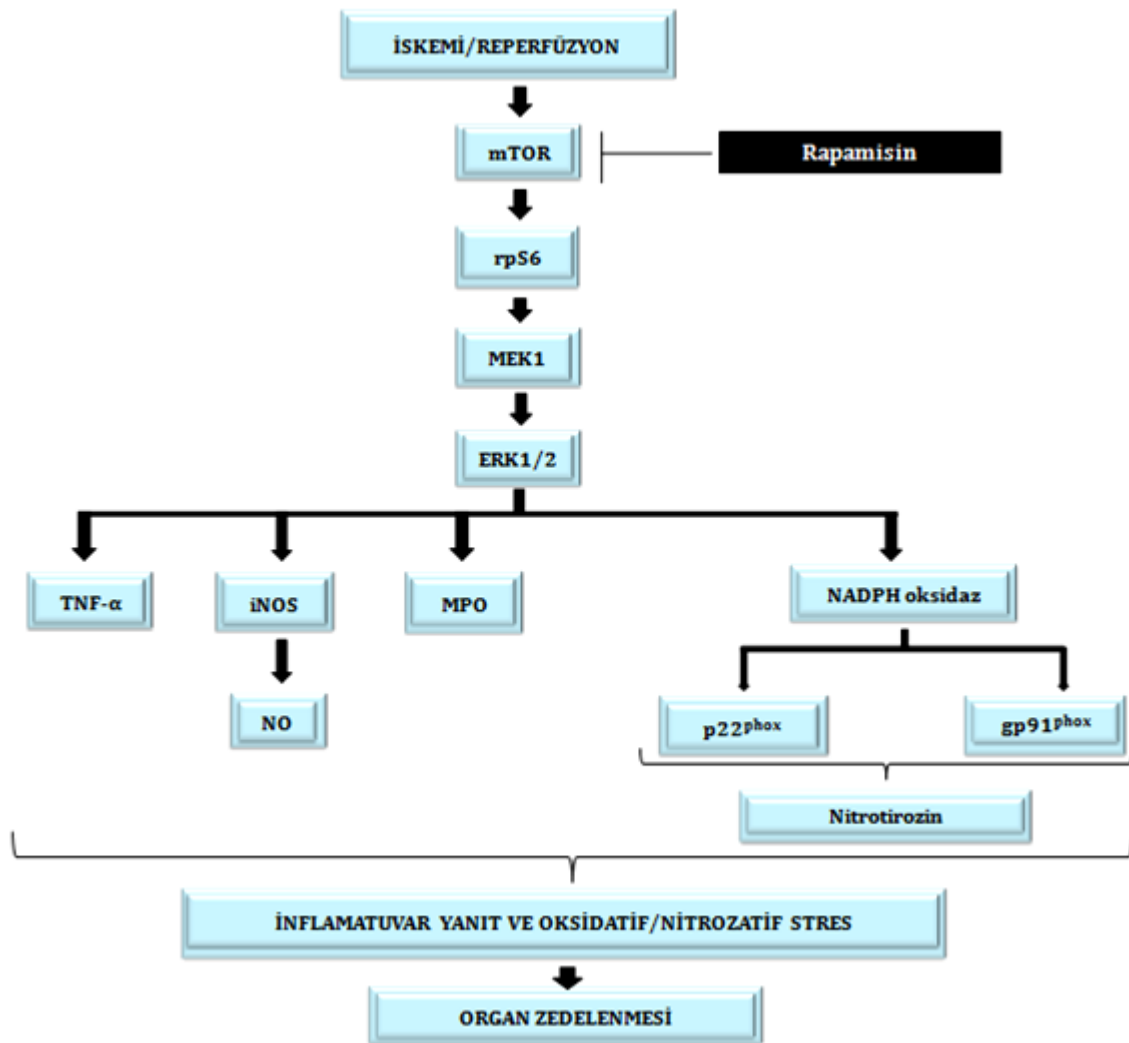
İ/R sırasında artan iNOS ekspresyonu ve NO oluşumunun yanında, hücrelerde aşırı miktarda süperoksit oluşumuyla sonuçlanan NADPH oksidazlar etkinleşmektedir. İskemiye takiben reperfüzyonun başlaması ile dokuya sunulan oksijenin büyük kısmı NADPH oksidaz etkinliği sonucunda süperoksit radikallerine dönüşmektedir [14]. Çok birimli kompleks altbirimlerden oluşan NADPH oksidaz, ROT üretiminden sorumlu başlıca enzim olup oksidan üretimini yaklaşık 50-100 kat arttırabilmektedir. NADPH oksidaz enziminin sitoplazmik komponentleri p22^{phox} ve gp91^{phox}'un ko-ekspresyonu NADPH oksidaz enzim kompleksinin etkinleşmesi için temel ihtiyaçtır. Bu komponentler bir araya gelerek NADPH oksidaz enzimini etkinleştirmekte ve elektron transferi ile oksijenin süperoksit iyonuna dönüşümüne aracılık etmektedirler [106]. NADPH oksidaz enziminin etkinleşmesi ile birlikte fosforilasyonu arttan gp91^{phox}, moleküler oksijenin süperoksit iyonuna dönüşümüne aracılık ederek ROT üretimini arttırmaktadır. Bununla birlikte yapılan bir çalışmada süperoksit iyonu oluşumuna aracılık eden gp91^{phox}'un NADPH oksidazın tek *heme* bağımlı alt birimi olduğu gösterilmiştir [106]. Oksidatif stres süreçlerinin yönetiminin birçok hastalığın gelişimi ve ilerlemesinin kontrolünde önemli bir strateji olduğuna ve NADPH oksidaz inhibitörlerinin oksidatif stres kontrolü potansiyeline sahip olduğuna inanılmaktadır [255]. Yapılan bir çalışmada NADPH oksidaza bağımlı süperoksit radikal üretiminin serebral iskemi sonucu gelişen beyin zedelenmesine katkı sağladığı gösterilmiştir [256]. Maalej ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada [255], zimosanla uyarılan insan nötrofil hücrelerinde gelişen ROT üretiminde, ERK1/2 etkinliği ile birlikte gelişen NADPH oksidaz etkinliğinin de yer aldığı gösterilmiştir. Literatür bilgisi ışığında yapmış olduğumuz bu tez çalışmasında, İ/R zedelenmesi sonrası izole edilen dokularda NADPH oksidaz etkinliği ile bu enzimin altbirimleri p22^{phox} ve gp91^{phox} protein ekspresyonundaki değişiklikler ölçülmüştür. Önceki çalışmalarımızda, sıçanlarda LPS veya zimosan ile uyarılan sistemik inflamatuvar yanıt ile birlikte gelişen oksidatif stres yanı sıra hedef ve uzak organ zedelenmesinin gözleendiği İ/R modelinde; NADPH oksidaz etkinliğindeki artışa bağlı olarak p22^{phox}, gp91^{phox}, p47^{phox} altbirimlerinin protein ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir [186, 235, 255]. Bu çalışmamızda da, İ/R'de böbrek ve gastrokinemius kasında MEK1 ve ERK1/2 etkinliği

sonucu NADPH oksidaz etkinliği artış göstermiş ve bu artışa paralel olarak p22^{phox} ve gp91^{phox} protein ekspresyonları da artmıştır. İnflamatuvar yanıt ile ilişkili oksidatif stresin göstergesi olan bu artış rapamisin ile geri çevirilmiştir.

İ/R sırasında etkinleşen iNOS enzimi ile oluşumu artan NO esas olarak gp91^{phox} tarafından üretilen ve güçlü bir oksidan ve nitratlayıcı molekül olan süperoksit ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturmaktadır. Daha sonra peroksinitritin proteinlerle reaksiyonu ise nitrotirozin oluşumuyla sonuçlanmaktadır [108]. Oldukça güçlü bir oksidan olan peroksinitrit tirozin türevlerini nitratlaması sonucu oluşan nitrotirozin, dokuda ve plazmada peroksinitrit oluşumunun göstergesi olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, böbrekte mineralokortikoide bağlı proksimal tübül zedelenmesinde gelişen oksidatif/nitrozatif strese artan gp91^{phox} ekspresyonunun ve nitrotirozin düzeylerinin rol oynadığı, bu artan redoks tepkimelerine bağlı olarak mTOR/S6K1 yolunun etkinleştiği ve böylelikle mTOR sinyal ileti yolunun redoks tepkimeleriyle gelişen değişikliklere duyarlı olduğu gösterilmiştir [258]. Çalışmamızın bulgularında İ/R zedelenmesi sonucu böbrek ve gastrokinemius kasında nitrotirozin fosforilasyonundaki artmayı rapamisinin geri çevirdiği görülmüştür. Bununla birlikte, daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmada, sıçanlara zimosan uygulanması ile oluşturulan non-septik şokta gelişen sistemik inflamatuvar yanıt ve buna bağlı doku zedelenmesine, mTOR/MEK1/ERK1/2/IKKβ/IκB-α/NF-κB sinyal ileti yolu etkinliğindeki artmaya bağlı olarak oluşan proinflamatuvar mediyatör oluşumu ve NADPH oksidaz sistemi etkinliği ile birlikte gp91^{phox}, p47^{phox}, p22^{phox} ve nitrotirozin protein ekspresyonlarındaki artışın aracılık ettiği gösterilmiştir. mTOR'un aracılık ettiği bu etkiler rapamisin ile geri çevrilmiştir. Tüm bu bulgular, periferik İ/R'ye bağlı ortaya çıkan hedef ve uzak organ zedelenmelerine aracılık eden inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif strese, mTOR ile birlikte MEK1/ERK1/2 yolunun etkinliğindeki artış sonucu etkinliği artan NADPH oksidaz enziminin ve bu enzimin alt birimlerinden p22^{phox} ve gp91^{phox} fosforilasyonundaki artışla oluşumu artan nitrotirozinin aracılık ettiği görülmektedir.

Sonuç olarak, daha çok medikal ve cerrahi işlemler sırasında ortaya çıkan İ/R zedelenmesi yüksek mortalite ve morbiditeye neden olabildiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar serbest radikaller ve proinflamatuvar mediyatörlerin oluşumu gibi inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif strese neden olan biyokimyasal ve moleküler mekanizmaların İ/R zedelenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir [1, 15]. İ/R zedelenmesi, sadece doğrudan etkilenen organ ile sınırlı kalmayıp uzak organlarda da zedelenmeye neden olabilmektedir. İ/R'deki uzak etkiler çoğunlukla akciğer, böbrek ve kardiyovasküler sistemde gözlenmekte olup sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ve çoklu organ işlev bozukluğu sendromu ile sonuçlanabilmektedir [1]. Bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz bulgular, periferik İ/R zedelenmesinde sıçanlarda hedef organ gastrokinemius kası ve uzak organ

böbrekte görülen inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif strese, mTOR ile birlikte MEK1/ERK1/2 etkinliğindeki artışın aracılık ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte mTOR'un rapamisin ile seçici inhibisyonu, bu dokularda MEK1/ERK1/2 etkinliğini azaltmış ve organ zedelenmelerine katkıda bulunan proinflamatuvar ve prooksidan etkili mediyatörler ile birlikte gelişen inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif stresi geri çevirerek, bu süreçlerde antiinflamatuvar ve antioksidan etkilere neden olabilmektedir. Bu durum, mTOR/MEK1/ERK1/2 sinyal ileti yolunun inhibisyonunun, inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif stres ile karakterize İ/R zedelenmesinin tedavisinde önleyici etkisinin olabileceğini göstermektedir.



Şekil 5.1. Sıçanlarda periferik iskemi/reperfüzyon zedelenmesine aracılık eden inflamatuvar yanıt ve oksidatif/nitrozatif stres süreçlerinde mTOR'un katkısının MEK1/ERK1/2 etkinliği ile ilişkilendirilerek araştırılması kapsamında yapılan çalışmaların özeti. *mTOR*, mammalian target of rapamycin; *rpS6*, ribozomal protein S6; *MEK*, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz; *ERK*, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz; *TNF*, tümör nekrozlaştırıcı faktör; *iNOS*, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; *NO*, nitrik oksit; *MPO*, miyeloperoksidaz; *NADPH*, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat.

KAYNAKLAR

- [1]. Carden, D. L.; Granger, D. N., Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* **2000**, 190, 255-66.
- [2]. Jennings, R. B.; Reimer K. A., The cell biology of acute myocardia ischemia. *Annu Rev Med* **1991**, 42, 225-246.
- [3]. Grace P. A., Ischaemia-reperfusion injury. *British J Surgery*, **1994**; 81: 637-647.
- [4]. Teke, Z.; Kabay, B.; Özden, A., İskemi-Reperfüzyon hasarının patofizyolojisi. *Pamukkale Tıp Dergisi* **2008**, 1, 65-72.
- [5]. Barry, M. C.; Kelly C.; Burke P.; Sheehan S.; Redmond H. P.; Bouchier-Hayes D., Immunological and physiological responses to aortic surgery: effect of reperfusion on neutrophil and monocyte activation and pulmonary function. *Br J Surg* **1997**, 84, 513-519.
- [6]. Gourdin, M. J.; Bree B.; De Kock, M., The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol* **2009**, 26(7), 537-547.
- [7]. Latanich, C. A.; Toledo-Pereyra, L. H., Searching for NF-kappaB-based treatments of ischemia reperfusion injury. *J Invest Surg* **2009**, 22(4), 301-315.
- [8]. Shiotiani, S.; Shimad, M.; Suehiro, T.; Soejima, Y.; Yosizumi, T.; Shimokawa H.; Maehara Y., Involvement of Rho-kinase in cold ischemia-reperfusion Injury after liver transplantation in rats. *Transplantation* **2004**, 78, 375-382.
- [9]. Laplante, M.; Sabatini, D. M., mTOR Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology* **2011**, 10, 1-3.
- [10]. Das, A.; Salloum, F. N.; Durrant, D.; Ockaili, R.; Kukreja, R. C., Rapamycin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through jak2-stat3 signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* **2012**, 53, 858-69.
- [11]. Zhu, J.; Hua, X.; Li, D.; Zhang, J.; Xia, Q., Rapamycin attenuates mouse liver ischemia and reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Transplantation Proceedings* **2015**, 1646-1652.
- [12]. Yellon, D. M.; Hausenloy, D. J., Myocardial reperfusion injury. *The New England Journal of Medicine* **2007**, 357(11), 1121-1135.
- [13]. Eltzschig, H. K.; Eckle, T., Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. *Nat Med* **2014**, 17:(11).
- [14]. Zimmerman, B. J.; Granger, D. N., Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* **1992**, 72, 65-83.
- [15]. Şener, G.; Yeğen, B. Ç., İskemi Reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim* **2009**, 22(3), 5-13.
- [16]. Chamoun, F.; Burne, M.; Donnell, M.; Rabb, H., Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Frontiers in Bioscience* **2000**, 5, 103-109.
- [17]. Welbourn, C. R. B.; Goldman, G.; Peterson, I. S., Pathophysiology of ishemia-reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* **1991**, 78, 651-655.
- [18]. Homer-Vanniasinkam, S.; Crinnion, J. N.; Gough, M. J., Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **1997**, 14, 195-203.
- [19]. Volman, T. J.; Hendriks, T.; Verhofstad, A. A.; Kullberg, B. J.; Goris R. J., Improved survival of TNF-deficient mice during the zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome. *Shock* **2002**, 17, 468-472.
- [20]. Jansen, M. J.; Hendriks, T.; Hermesen, R.; Van der Meer, J. W.; Goris R. J., A monoclonal antibody against tumour necrosis factoralpha improves survival in experimental multiple organ dysfunction syndrome. *Cytokine* **1998**, 10, 904-910.
- [21]. Aikawa, N.; Shinozawa, Y.; Ishibiki, K.; Abe, O.; Yamamoto, S.; Motegi, M., Clinical analysis of multiple organ failure in burned patients. *Burns, Including Thermal Injury* **1987**, 13, 103-109.
- [22]. Von Asmuth, E. J.; Maessen, J. G.; van der Linden, C. J.; Buurman, W. A., Tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 6 in a zymosan-induced shock model. *Scandinavian Journal of Immunology* **1990**, 32, 313-319.
- [23]. Petit, F.; Bagby, G. J.; Lang, C. H., Tumor necrosis factor mediates zymosan-induced increase in glucose flux and insulin resistance. *American Journal of Physiology* **1995**, 268, 219-228.
- [24]. Seekamp, A.; Ward, P. A., Ischemia-reperfusion injury. *Agents. Actions Sup* **1993**, 41, 137-52.

- [25]. Halladin, N., Oxidative and inflammatory biomarkers of ischemia and reperfusion injuries. *Danish Medical Journal* **2015**, 62(4), 1-22.
- [26]. Ogawa, S.; Gerlach, H.; Esposito, C., Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties. *J Clin Invest* **1990**, 85, 1090-8.
- [27]. Ogawa, S.; Koga, S.; Kuwabara, K., Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *Am J Physiol* **1992**, 262, 546-554.
- [28]. Francischetti, I.; Moreno, J. B.; Scholz, M.; Yoshida, W. B., Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev Bras Cir Cardiovasc* **2010**, 25(4), 575-584.
- [29]. Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N.; Aster, J. C., Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury and death. In: Schmitt W, Gruliow R. Eds. *Robbins and catran pathologic basis of disease* **2010**, 8nd Ed: 29.
- [30]. Halestrap, A. P.; Clarke, S. J.; Javadov, S. A., Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion-a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **2004**, 61, 372-85.
- [31]. Vercesi, A. E.; Kowaltowski, A. J.; Grijalba, M. T., The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep* **1997**, 17: 43-52.
- [32]. Halestrap, A. P.; Clarke, S. J.; Khaliulin, I., The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1767: 1007-1031.
- [33]. Kagan, V. E.; Tyurin, V. A.; Jiang, J., Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol* **2005**, 1: 223-232.
- [34]. Vander Heide, R. S.; Steenbergen, C., Cardioprotection and myocardial reperfusion: pitfalls to clinical application. *Circ Res* **2013**, 113: 464-77.
- [35]. Kim, J. S.; He, L.; Lemasters, J. J. , Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, 304, 463-70.
- [36]. Halestrap, A. P.; Kerr, P. M.; Javadov, S., Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* **1998**, 1366, 79-94.
- [37]. Crompton, M., The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **1999**, 341:233-249.
- [38]. Kvietys, P. R.; Granger, D. N., Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic. Biol. Med* **2012**, 52, 556-592.
- [39]. Bayram, S., İntestinal iskemi ve reperfüzyon. *ODÜ Tıp Dergisi* **2015**, 2, 166-171.
- [40]. Kuralay, F.; Çavdar, Z., İnflamatuar medyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Dergisi*, **2006**, 16(3), 143-152.
- [41]. Nemoto, S.; DiDonato, J. A.; Lin, A., Coordinate regulation of I κ B kinases by mitogen activated protein kinase kinase kinase 1 and NF κ B- inducing kinase. *Mol Cell Biol* **1998**, 18, 7336-7343.
- [42]. Tegeder, I.; Niederberger, E.; Schmidt, R.; Kunz, S.; Guhring, H.; Ritzeler, O.; Michaelis, M.; Geisslinger, G., Specific inhibition of I κ B kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *The Journal of Neuroscience* **2004**, 24(7), 1637-1645.
- [43]. Vera, S.; Martínez, R.; Gormaz, J. G.; Gajardo, A.; Galleguillos, F.; Rodrigo, R., Novel relationships between oxidative stress and angiogenesis-related factors in sepsis: New biomarkers and therapies. *Annals of Medicine* **2015**, 47, 289-300.
- [44]. Irani, K., Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* **2000**, 87, 179-183.
- [45]. Kyriakis, J. M.; Avruch, J., Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev* **2001**, 81, 807-869.
- [46]. Ekinci Ö.; Memiş, L., Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında nükleer faktör kappa B immünohistokimyasal ekspresyonunun prognozla ilişkisi. *Gazi Tıp Dergisi* **2008**, 19(1), 1-5.
- [47]. Rodrigo, R.; Libuy, M.; Feliú, F.; Hasson, D., Oxidative Stress-Related Biomarkers in Essential Hypertension and Ischemia-Reperfusion Myocardial Damage. *Hindawi Publishing Corporation Disease Markers* **2013**, 35 (6), 773-790.

- [48]. Gloire, G.; Legrand-Poels, S.; Piette, J., NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology* **2006**, 72(11), 1493–1505.
- [49]. Baldwin, A. S., Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* **2001**, 107(1), 3–6.
- [50]. Duan, W.; Chan, J. H.; Wong, C. H.; Leung, B. P.; Wong, W. S., Anti-inflammatory effects of mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model. *The Journal of Immunology* **2004**, 172, 7053–7059.
- [51]. Dong, C.; Davis, R. J.; Flavell, R. A., MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* **2002**, 20, 55–72.
- [52]. Zhang, Y.; Dong, C., MAP kinases in immune responses. *Cellular & Molecular Immunology* **2005**, 2: 20–27
- [53]. Cornell, T. T.; Rodenhouse, P.; Cai, Q.; Sun, L.; Shanley, T. P., Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 regulates the inflammatory response in sepsis. *Infection and immunity* **2010**, 78(6), 2868–2876.
- [54]. Di Paola, R.; Galuppo, M.; Mazzon, E.; Paterniti, I.; Bramanti, P.; Cuzzocrea, S., “PD98059, a specific MAP kinase inhibitor, attenuates multiple organ dysfunction syndrome/failure (MODS) induced by zymosan in mice,” *Pharmacological Research* **2010**, 61(2), 175–187.
- [55]. Jang, S. I.; Kim, H. J.; Kim, Y. J.; Jeong, S. I.; You, Y. O., Tanshinone IIA inhibits LPS-induced NF- κ B activation in RAW 264.7 cells: possible involvement of the NIK-IKK, ERK1/2, p38 and JNK pathways. *European Journal of Pharmacology* **2006**, 542, 1–7.
- [56]. Asehnoune, K.; Strassheim, D.; Mitra, S.; Kim, J. Y.; Abraham, E., Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF- κ B. *Journal of Immunology* **2004**, 172(4), 2522–2529.
- [57]. Karunakaran, S.; Ravindranath, V., Activation of p38MAPK in the substantia nigra leads to nuclear translocation of NF- κ B in MPTP-treated mice: implication in Parkinson’s disease. *Journal of Neurochemistry* **2009**, 109(6), 1791–1799.
- [58]. Abraham, E., Nuclear factor- κ B and its role in sepsis-associated organ failure. *J Infect Dis* **2003**, 187:S364.
- [59]. Schaeffe, H. J.; Weber, M. J., Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **1999**, 19: 2435–2444.
- [60]. Han, J.; Ulevitch, R. J., Emerging targets for anti-inflammatory therapy. *Nat Cell Biol* **1999**, 1: 39–40.
- [61]. Davis, R. J., Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **2000**, 103: 239–252.
- [62]. Chang, L.; Karin, M., Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* **2001**, 410: 37, 40.
- [63]. Duan, W.; Chan, J. H.; Wong, C. H.; Leung, B. P.; Wong, W.S., Anti-inflammatory effects of mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model. *The Journal of Immunology* **2004**, 172, 7053–7059.
- [64]. Lee, P. J.; Zhang, X.; Shan, P.; Ma, B.; Lee, C. G.; Homer, R. J., ERK1/2 mitogen-activated protein kinase selectively mediates IL-induced lung inflammation and remodeling in vivo. *Journal of Clinical Investigation* **2006**, 116, 163–173
- [65]. Johnson, G. L.; Lapadat, R., Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **2002**, 298, 1911–1912.
- [66]. Bhat, N. R.; Zhang, P.; Lee, J. C.; Hogan, E. L., Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α gene expression in endotoxin stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* **1998**, 18, 1633–1641.
- [67]. Wang, M. J.; Jeng, K. C.; Kuo, J. S.; Chen, H. L.; Huang, H. Y.; Chen, W. F.; Lin, S. Z., c-Jun N-terminal kinase and, to a lesser extent, p38 mitogen-activated protein kinase regulate inducible nitric oxide synthase expression in hyaluronan fragments-stimulated BV-2 microglia. *J Neuroimmunol* **2004**, 146, 50–62.
- [68]. Rodrigo, R.; Libuy, M.; Feliú, F.; Hasson, D., Oxidative Stress-Related Biomarkers in Essential Hypertension and Ischemia-Reperfusion Myocardial Damage. *Hindawi Publishing Corporation Disease Markers* **2013**, 35 (6), 773–790.

- [69]. Gloire, G. ; Legrand-Poels, S. ; Piette, J. , NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology* **2006**, 72(11), 1493–1505.
- [70]. Baldwin, A. S., Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* **2001**, 107(1), 3–6.
- [71]. Gute, D.; Korthuis, R. J., Role of leukocyte adherence in reperfusion-induced micro-vascular dysfunction and tissue injury. In: Granger DN, Schmid-Schönbein GW Eds. *Leukocyte Adhesion*. New York, NY: Oxford University Press, 1995.
- [72]. Schoenberg, M. H.; Beger, H. G., Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* **1993**, 21, 1376-1386.
- [73]. Chatterjee, P. K., Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemiareperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2007**, 376, 1-43.
- [74]. Korthuis, R. J.; Granger, D. N., Reactive oxygen metabolites, neutrophils and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol* **1993**, 16(4), 119-126.
- [75]. Yerer, M. B.; Aydoğan, S., Oksidatif stres ve antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* **2000**, 9(1), 49-53.
- [76]. Eken, A., Rat kan ve doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri. Yücel O. *Küçük Deney Hayvanlarından Rat*. 2. Baskı, Ankara, Matris Tanıtım Baskı Hizmetleri, **2012**, p69-73.
- [77]. Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stres-induced cancer. *Chem Biol Interact* **2006**, 160, 1-40.
- [78]. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telseer, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem cell Biol* **2007**, 39, 44-84.
- [79]. Mercan, U., Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg* **2004**, 15(12), 91-96.
- [80]. Blumberg, J., Use of biomarkers of oxidative stres in research studies. *J Nutr* **2004**, 134: 3188-3189.
- [81]. Bonservizi, W. G. S.; Koike, M. K.; Saurim, R., Ischemic preconditioning and atenolol on lung injury after intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Transplantation Proceedings* **2014**, 46(6), 1862–1866.
- [82]. Pinheiro, B. V.; Holanda, M. A.; Araujo, F.G.; Romaldini, H., Lesao pulmonar de reperfusao. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* **1999**, 25(2), 124–136.
- [83]. Mura, M.; Andrade, C. F.; Han, B., Intestinal ischemiareperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs. *Shock* **2007**, 28(2), 227–238.
- [84]. Zimmerman, B. J.; Granger, D. N., Mechanisms of reperfusion injury. *The American Journal of the Medical Sciences* **1994**, 307(4), 284–292.
- [85]. Ogawa, S.; Gerlach, H.; Esposito, C.; Pasagian-Macaulay, A.; Brett, J.; Stern, D., Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties. *Journal of Clinical Investigation* **1990**, 85(4), 1090–1098.
- [86]. Menger, M. D., Microcirculatory disturbances secondary to ischemia-reperfusion. *Transplantation Proceedings* **1995**, 27(5), 2863–2865.
- [87]. Droge, W., Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, **2002**, 82(1), 7–95.
- [88]. Jerome, S. N.; Dore, M.; Paulson, J. C.; Smith, C. W.; Korthuis, R. J., P-selectin and ICAM-1-dependent adherence reactions: role in the genesis of postischemic no-reflow. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **1994**, 266(4), 1316-1321.
- [89]. Cuzzocrea, S.; Riley, D. P.; Caputi, A. P.; Salvemini, D., Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological Reviews* **2001**, 53(1), 135–159.
- [90]. Dalton, T.P.; Shertzer, H. G.; Puga, A., Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **1999**, 39: 67–101.

- [91]. DeCampos, K. N.; Keshavjee, S.; Liu, M.; Slutsky, A. S., Prevention of rapid reperfusion-induced lung injury with prostaglandin E1 during the initial period of reperfusion. *Journal of Heart and Lung Transplantation* **1998**, 17(11), 1121–1128.
- [92]. Iadecola, C.; Anrather, J., The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature Medicine* **2011**, 17(7), 796–808.
- [93]. De Greef, K. E.; Ysebaert, D. K.; Ghielli, M., Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury. *Journal of Nephrology* **1998**, 11(3), 110–122.
- [94]. Oredsson, S.; Plate, G., Qvarfordt, P., Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury in skeletal muscle. *European Journal of Surgery* **1994**, 160(2), 97–103.
- [95]. Basım, S., Alt ekstremitede iskemi-reperfüzyon oluşturulan ratlarda ginkgo biloba EGB 761'in barsak anastomoz iyileşmesi üzerine etkisi. Uzmanlık tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 2005.
- [96]. Şentürk, H.; Kolankaya, D.; Şahin, Y., Renal iskemi-reperfüzyonu sırasında sıçan böbreğinde oluşan oksidatif stres hasarına silimarin etkisi. *Çankaya University Journal of Science and Engineering* **2010**, 7(1), 59-74.
- [97]. Özcan, O.; Erdal, H.; Yönden, Z., İskemi-Reperfüzyon hasarı ve oksidatif stres ilişkisine biyokimyasal bakış. *Mustafa Kemal Üniv Tıp Derg* **2015**, 6(23), 27-33.
- [98]. Brandes, R. P.; Weissmann, N.; Schröder, K., NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, 49, 687–706.
- [99]. Hernandez, M. S. B. L., NADPH oxidase and neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* **2012**, 10(4), 321–327.
- [100]. Bae, Y. S.; Oh, H.; Rhee, S. G.; Yoo, Y. D., Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol. Cell* **2011**, 32, 491–509.
- [101]. Bedard, K.; Krause, K. H., The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiol. Rev* **2007**, 87(1), 245–313.
- [102]. Hernandez, M. S. B. L., NADPH oxidase and neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* **2012**, 10(4), 321–327.
- [103]. Segal, A. W., The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *Int J Biochem Cell Biol* **2008**, 40, 604-18.
- [104]. Petry, A.; Djordjevic, T.; Weitnauer, M. et al., NOX2 and NOX4 mediate proliferative response in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* **2006**, 8, 1473-84.
- [105]. Vignais, P. V., The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* **2002**, 59, 1428-59.
- [106]. Yu, L.; Qunni, M. T.; Crossi, A. R.; Dinanuer, M. C., Gp91 phox is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 7993–7998.
- [107]. Cachat, J.; Deffert, C.; Hugues, S.; Krause, K. H., Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity. *Clinical Science* **2015**, 128, 635–648
- [108]. Esposito, E.; Cuzzocrea, S., Superoxide, NO, peroxynitrite and PARP in circulatory shock and inflammation. *Front Biosci* **2009**, 14, 263–296.
- [109]. Mi, J. K.; Meeyoung, P.; Dae, W. K.; Min, J. S.; Ora, S.; Hyo, S. J.; Hyeon, J. Y.; Su, B. C.; Jung, H. P.; Chi, H. L.; Duk-Soo, K.; Oh-Shin, K.; Joon, K.; Kyu, H. H.; Jinseu, P.; Won, Sik, E.; Soo, Y. C., Transduced PEP-1-PON1 proteins regulate microglial activation and dopaminergic neuronal death in a Parkinson's disease model. *Biomaterials* **2015**, 64, 45e56.
- [110]. Nikseresht, S.; Khodagholi, F.; Nategh, M.; Dargahi, L., RIP1 Inhibition rescues from LPS-induced rip3-mediated programmed cell death, distributed energy metabolism and spatial memory impairment. *J. Mol. Neurosci* **2015**, 57, 219–230.
- [111]. Ferrari, R. S.; Andrade, C. F., Oxidative stress and lung ischemia-reperfusion injury. *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, 1, 1-14.
- [112]. Cinel, İ.; Oral, U., Peroksinitrit ve miyokardium. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2000**, 2, 163-168.
- [113]. Serracino-Inglott, F.; Habib, N. A.; Mathie, R. T., Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* **2001**, 181:160–166.

- [114]. Schmid-Schoenbein, G.W., Engler, R. L., Granulocytes as active participants in acute myocardial ischemia and infarction. *Am J Cardiovasc Pathol* **1987**, 1, 15–30.
- [115]. Hansson, R. O.; Jonsson, O.; Lundstam, S.; Pettersson, S.; Schersten, T.; Waldenström J., Effects of free radical scavengers on renal circulation after ischemia in the rabbit. *Clin Sci* **1983**, 65: 605-610.
- [116]. Pan, J.; Konstantas, A. A.; Bateman, B.; Ortolano, G. A.; John Pile-Spellman, J., Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* **2007**, 49: 93–102.
- [117]. Dworakowski, R.; Walker, S.; Momin, A.; Desai, J.; ElGamel, A.; Wendler, O., Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived superoxide and vascular endothelial dysfunction in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* **2008**, 51: 1349–1356.
- [118]. Rodriguez, S. F.; Granger, D. N., Role of blood cells in ischemia-reperfusion-induced endothelial barrier failure. *Cardiovasc Res* **2010**, 87: 291–299.
- [119]. Parks, D. A.; Granger, D. N., Xanthineoxidase: biochemistry distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* **1986**, 548, 87–99.
- [120]. Kalogeris, T.; Baines, C. P.; Krenz, M.; Korthuis, R. J., Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* **2012**, 298, 229-317.
- [121]. Kvietys, P. R.; Granger, D. N., Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med* **2012**, 52: 556–592.
- [122]. Sanada, S.; Komuro, I.; Kitakaze, M., Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol* **2011**, 301, 1723–1741.
- [123]. De Martino, G. N., Calcium-dependent proteolytic activity in rat liver: identification of two proteases with different calcium requirements. *Arch Biochem Biophys* **1981**, 211, 253-257.
- [124]. Schaffer, S. W.; Roy, R. S.; McCord, J. M., Possible role for calmodulin in calcium paradox induced heart failure. *Eur Heart J* **1983**, 4: 81-87.
- [125]. Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T., Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* **2005**, 12: 1161-1208.
- [126]. Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **1991**, 11: 81-128.
- [127]. Catalá, A., An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* **2006**, 38, 1482-1495.
- [128]. Kunz, J.; Henriquez, R.; Schneider, U.; Deuter-Reinhard, M.; Movva, N. R.; Hall, M. N., Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* **1993**, 73: 585–596.
- [129]. Helliwell, S. B.; Wagner, P.; Kunz, J.; Deuter-Reinhard, M.; Henriquez, R.; Hall, M. N., TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell* **1994**, 5, 105–118.
- [130]. Brown, E. J.; Albers, M. W.; Shin, T. B.; Ichikawa, K.; Keith, C. T.; Lane, W. S.; Schreiber, S. L., A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature* **1994**, 369: 756–758.
- [131]. Chiu, M. I.; Katz, H.; Berlin, V., RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci* **1994**, 91, 12574–12578.
- [132]. Sabatini, D. M.; Erdjument-Bromage, H.; Lui, M.; Tempst, P.; Snyder, S. H., RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **1994**, 78: 35–43.
- [133]. Dancy, J., Therapeutic targets mTOR and related pathways. *Cancer Biology & Therapy* **2006**, 5(9): 1065-1073
- [134]. Soliman, G. A., The mammalian target of rapamycin signaling network and gene regulation. *Current Opinion in Lipidology* **2005**, 16: 317–323.
- [135]. Yang, Q.; Guan, K. L., Expanding mTOR signaling. *Cell Research* **2007**, 17: 666-681.
- [136]. Hay, N.; Sonenberg, N., Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* **2004**, 18(16), 1926-45.

- [137]. Zhou, H.; Luo, Y.; Huang, S., Updates of mTOR inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem* **2010**, 10(7), 571–581.
- [138]. Bhaskar, P. T.; Hay, N., The two TORCs and Akt. *Dev. Cell* **2007**, 12 (4), 487–502.
- [139]. Ma X. M.; Blenis J., Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2009**; 10: 307–18.
- [140]. Dunlop, E. A.; Tee, A. R., Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal* **2009**, 21, 827–35.
- [141]. Saxton, R. A.; Sabatini, D. M., mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **2017**, 168(6), 960–976.
- [142]. Lorne, E.; Zhao, X.; Zmijewski, J. W.; Liu, G.; Park, Y. J.; Tsuruta, Y.; Abraham, E., Participation of mammalian target of rapamycin complex 1 in Toll-Like Receptor 2– and 4–Induced neutrophil activation and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2009**, 41: 237–45.
- [143]. Inoki, K.; Ouyang, H.; Li, Y.; Guan, K. L., Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev* **2005**, 69: 79–100.
- [144]. Sarbassov, D. D.; Guertin, D. A.; Ali, S. M.; Sabatini, D. M., Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **2005**, 307 (5712), 1098–101.
- [145]. Barilli, A.; Visigalli, R.; Sala, R.; Gazzola, G. C.; Parolari, A.; Tremoli, E.; Bonomini, S.; Simon, A.; Closs, E. I.; Dall'Asta, V.; Bussolati, O., In human endothelial cells rapamycin causes mTORC2 inhibition and impairs cell viability and function. *Cardiovasc Res* **2008**, 78: 563–571.
- [146]. Hernandez-Negrete, I.; Carretero-Ortega, J.; Rosenfeldt, H.; Hernandez-Garcia, R.; Calderon-Salinas, J. V.; Reyes-Cruz, G.; Gutkind, J. S.; Vazquez-Prado, J., P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. *J Biol Chem* **2007**, 282: 23708–23715.
- [147]. Hresko, R. C.; Mueckler, M., mTOR. RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **2005**, 280, 40406–40416.
- [148]. Manning, B. D.; Cantley, L. C., AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **2007**, 129: 1261–1274.
- [149]. Jacinto, E.; Loewith, R.; Schmidt, A.; Lin, S.; Ruegg, M. A.; Hall, A.; Hall, M. N., Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* **2004**, 6: 1122–1128.
- [150]. Laplante, M.; Sabatini, D. M., mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* **2009**, 122 (20), 3589–3594.
- [151]. Scheid, M. P.; Woodgett, J. R., Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett* **2003**, 546: 108–112.
- [152]. Newton, A. C., Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* **2003**, 370: 361–371.
- [153]. Alessi, D. R.; Pearce, L. R.; García-Martínez, J. M., New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Sci Signal* **2009**, 2(67), 27.
- [154]. Jacinto, E.; Lorberg, A., TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J* **2008**, 410 (1), 19–37.
- [155]. Valentinis, B.; Baserga, R., IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol Pathol* **2001**, 54, 133–137.
- [156]. Jefferies, H. B.; Reinhard, C.; Kozma, S. C.; Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the “polypyrimidine tract” mRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91: 4441–4445.
- [157]. Terada, N.; Patel, H. R.; Takase, K.; Kohno, K.; Nairn, A. C.; Gelfand, E. W., Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, 91: 11477–11481.
- [158]. Manning, B. D.; Cantley, L. C., Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci* **2003**; 28: 573–576.
- [159]. Zhang, Y.; Gao, X.; Saucedo, L. J.; Ru, B.; Edgar, B. A.; Pan, D., Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol* **2003**, 5: 578–581.

- [160]. Stocker, H.; Radimerski, T.; Schindelholtz, B.; Wittwer, F.; Belawat, P.; Daram, P.; Breuer, S.; Thomas, G.; Hafen, E., Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **2003**, 5: 559–565.
- [161]. Manning, B. D.; Tee, A. R.; Logsdon, M. N.; Blenis, J.; Cantley, L. C., Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* **2002**, 10, 151-62.
- [162]. Inoki, K.; Li, Y.; Zhu, T.; Wu, J.; Guan, K. L., TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* **2002**, 4, 648-57.
- [163]. Inoki, K.; Zhu, T.; Guan, K. L., TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **2003**, 115, 577-90.
- [164]. Shaw, R. J., LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol* **2009**, 196(1), 65-80.
- [165]. Huang, J.; Manning, B. D., The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* **2008**, 412(2), 179-90.
- [166]. Hahn-Windgassen, A.; Nogueira, V.; Chen, C. C.; Skeen, J. E.; Sonenberg, N.; Hay, N., Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* **2005**, 280, 32081-32089.
- [167]. Ballou, L. M.; Lin, R. Z., Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol* **2008**, 1: 27–36.
- [168]. Kathryn, G.; Foster, C.; Diane, C. F., Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Conducting the Cellular Signaling Symphony. *J. Biol. Chem* **2010**, 285:14071-1407.
- [169]. Laplante, M.; Sabatini, D. M., mTOR Signaling in growth control and disease. *Cell* **2012**, 149(2), 274-293.
- [170]. Arsham, A. M.; Howell, J. J.; Simon, M. C., A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem* **2003**, 278, 29655–29660.
- [171]. Schneider, A.; Younis, R. H.; Gutkind, J. S., Hypoxia-induced energy stress inhibits the mTOR pathway by activating an AMPK/REDD1 signaling axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* **2008**, 10: 1295–1302.
- [172]. Ellisen, L. W.; Ramsayer, K. D.; Johannessen, C. M.; Yang, A.; Beppu, H.; Minda, K.; Oliner, J. D.; McKeon, F.; Haber, D. A., REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Mol Cell* **2002**, 10: 995–1005.
- [173]. Sofer, A.; Lei, K.; Johannessen, C. M.; Ellisen, L. W., Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol* **2005**, 25: 5834–5845.
- [174]. Brugarolas, J.; Lei, K.; Hurley, R. L.; Manning, B. D.; Reiling, J. H.; Hafen, E.; Witters, L. A.; Ellisen, L. W.; Kaelin, W. G., Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* **2004**, 18, 2893–2904.
- [175]. Shoshani, T.; Faerman, A.; Mett, I.; Zelin, E.; Tenne, T.; Gorodin, S.; Moshel, Y.; Elbaz, S.; Budanov, A.; Chajut, A.; Kalinski, H.; Kamer, I.; Rozen, A.; Mor, O.; Keshet, E.; Leshkowitz, D.; Einat, P.; Skalter, R.; Feinstein, E., Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* **2002**, 22, 2283–2293.
- [176]. Kim, M. S.; Kuehn, H. S.; Metcalfe, D. D.; Gilfillan, A.M., Activation and function of the mTORC1 pathway in mast cells. *J Immunol* **2008**, 180, 4586-95.
- [177]. Crackower, M. A.; Oudit, G. Y.; Kozieradzki, I.; Sarao, R.; Sun, H.; Sasaki, T., Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* **2002**, 110, 737-49.
- [178]. Shioi, T.; McMullen, J. R.; Tarnavski, O.; Converso, K.; Sherwood, M. C.; Manning, W.J., Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* **2003**, 107, 1664-70.
- [179]. Boluyt, M. O.; Zheng, J. S.; Younes, A., Rapamycin inhibits α 1-adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte hypertrophy but not activation of hypertrophy-associated genes. Evidence for involvement of p70 S6 kinase. *Circ Res* **1997**, 81, 176-86.

- [180]. Wang, L.; Proud, C. G., Ras/Erk signalling is required for regulation of translation factors linked to mTOR and protein synthesis by hypertrophic agents in cardiomyocytes. *Circ Res* **2002**, 91, 821-829.
- [181]. Lieberthal, W.; Levine, J. S., Mammalian target of rapamycin and the kidney. II. Pathophysiology and therapeutic implications. *Am J Physiol Renal Physiol* **2012**, 303, 180-91.
- [182]. Delgoffe, G. M.; Pollizzi, A. T., The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat. Immunol* **2011**, 12, 295-304.
- [183]. Soltani, A.; Bahreyni, A.; Boroumand, N.; Roshan, M.; Khazaei, M.; Ryzhikov, M.; Soleimanpour, S.; Avan, A.; Hassanian, S. M., mTOR signaling a key modulator of inflammation. *Journal of Cellular Physiology* **2017**, 233(6), 4783-4790.
- [184]. Koçak, Z., Sıçanlarda İskemi/Reperfüzyona Bağlı Ortaya Çıkan Hedef ve Uzak Organ Zedelenmelerinde Oluşan İnflamasyon ile Oksidatif/Nitrozatif Strese mTOR'un Katkısının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 2016
- [185]. Mirzoeva, O. K.; Das, D.; Heiser, L. M.; Bhattacharya, S.; Siwak, D.; Gendelman, R.; Bayani, N.; Wang, N. J.; Neve, R. M.; Guan, Y.; Hu, Z.; Knight, Z.; Feiler, H. S.; Gascard, P.; Parvin, B.; Spellman, P. T.; Shokat, K. M.; Wyrobek, A. J.; Bissell, M. J.; McCormick, F.; Kuo, W. L.; Mills, G. B.; Gray, J. W.; Korn, W. M., Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition. *Cancer Resarch* **2009**, 69 (2), 565-572.
- [186]. Sahan-Firat, S.; Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Kucukkavruk, S. P.; Tunctan, B.; Sari, A.N.; Kocak, Z.; Malik, K.U., Protection by mTOR Inhibition on Zymosan-Induced Systemic Inflammatory Response and Oxidative/Nitrosative Stress: Contribution of mTOR/MEK1/ERK1/2/IKK β /I κ B- α /NF- κ B Signalling Pathway. *Inflammation* **2018**, 41(1), 276-298.
- [187]. Carracedo, A.; Ma, L.; Teruya-Feldstein, J.; Rojo, F.; Salmena, L.; Alimonti, A.; Egia, A.; Sasaki, A. T.; Thomas, G.; Kozma, S. C.; Papa, A.; Nardella, C.; Cantley, L. C.; Baselga, J.; Pandolfi, P. P., Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *The Journal of the Clinical Investigation* **2008**, 118 (9), 3065-3074.
- [188]. Porstmann, T.; Santos, C. R.; Griffiths, B.; Cully, M.; Wu, M.; Leever, S.; Griffiths, J.R.; Chung, Y. L.; Schulze, A., SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* **2008**, 8(3), 224-36
- [189]. Soltani, A.; Bahreyni, A.; Boroumand, N.; Roshan, M.; Khazaei, M.; Ryzhikov, M.; Soleimanpour, S.; Avan, A.; Hassanian, S.M., mTOR signaling a key modulator of inflammation. *Journal of Cellular Physiology* **2017**, 233(6), 4783-4790.
- [190]. Küçüköner, M.; Işıkdogan, A., Kanser tedavisinde mTOR inhibitörleri. *Dicle Tıp Dergisi* **2013**, 40 (1), 156-160.
- [191]. Grabiner, B. C.; Nardi, V.; Birsoy, K.; Possemato, R.; Shen, K.; Sinha, S.; Jordan, A.; Beck, A. H.; Sabatini, D. M., A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer discovery* **2014**, 4, 554-563.
- [192]. Sato, T.; Nakashima, A.; Guo, L.; Coffman, K.; Tamanoi, F., Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. *Oncogene* **2010**, 29, 2746-2752.
- [193]. Yuan, M.; Pino, E.; Wu, L.; Kacergis, M.; Soukas, A. A., Identification of Akt-independent regulation of hepatic lipogenesis by mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2. *The Journal of biological chemistry* **2012**, 287, 29579-29588.
- [194]. Shaw, R. J.; Cantley, L.C.; Ras, PI(3)K, and mTOR signalling controls tumor cell growth. *Nature* **2006**, 441, 424-30.
- [195]. Hsieh, A. C.; Costa, M.; Zollo, O.; Davis, C.; Feldman, M. E.; Testa, J.R.; Meyuhas, O.; Shokat, K.M.; Ruggero, D., Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer cell* **2010**, 17, 249-261.
- [196]. Hsieh, A.C.; Liu, Y.; Edlind, M.P.; Ingolia, N.T.; Janes, M.R.; Sher, A.; Shi, E.Y.; Stumpf, C.R.; Christensen, C.; Bonham, M.J. et al., The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* **2012**, 485, 55-61.

- [197]. Alain, T.; Morita, M.; Fonseca, B.D.; Yanagiya, A.; Siddiqui, N.; Bhat, M.; Zammit, D.; Marcus, V.; Metrakos, P.; Voyer, L.A. et al., eIF4E/4E-BP ratio predicts the efficacy of mTOR targeted therapies. *Cancer research* **2012**, 72, 6468–6476.
- [198]. She, Q.B.; Halilovic, E.; Ye, Q.; Zhen, W.; Shirasawa, S.; Sasazuki, T.; Solit, D. B.; Rosen, N., 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer cell* **2010**, 18, 39–51.
- [199]. Toschi, A.; Lee, E.; Gadir, N.; Ohh, M.; Foster, D. A., Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1a and 2a on mTORC1 and mTORC2. *J Biol Chem* **2008**, 283, 34495–9.
- [200]. Guertin, D. A.; Stevens, D. M.; Thoreen, C.C.; Burds, A.A.; Kalaany, N. Y.; Moffat, J.; Brown, M.; Fitzgerald, K. J.; Sabatini, D. M., Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Developmental cell* **2006**, 11, 859–871.
- [201]. Hietakangas, V.; Cohen, S. M., TOR complex 2 is needed for cell cycle progression and anchorage-independent growth of MCF7 and PC3 tumor cells. *BMC cancer* **2008**, 8, 282.
- [202]. Vezina, C.; Kudelski, A.; Sehgal, S. N., Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot* **1975**, 28, 721–726.
- [203]. Sehgal, S. N.; Baker, H.; Vezina, C., Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **1975**, 28, 727–732.
- [204]. Eng, C. P.; Sehgal, S. N.; Vezina, C., Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)* **1984**, 37, 1231–1237.
- [205]. Douros, J.; Suffness, M., New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat Rev* **1981**, 8, 63–87.
- [206]. Linhares, M. M.; Gonzalez, A. M.; Trivino, T.; Melaragno, C.; Moura, R. M.; Garcez, M. H.; Sa, J. R.; Aguiar, W. F.; Succi, T.; Barbosa, C. S.; Pestana, J.O., Simultaneous pancreas-kidney transplantation initial experience. *Transplant Proc* **2003**, 35, 1109.
- [207]. Huang, S.; Houghton, P. J., Resistance to rapamycin: a novel anticancer drug. *Cancer Metastasis Rev* **2001**, 20, 69–78.
- [208]. Helliwell, S. B.; Wagner, P.; Kunz, J.; Deuter-Reinhard, M.; Henriquez, R.; Hall, M. N., TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell* **1994**, 5, 105–118.
- [209]. Chen, J.; Zheng, X. F.; Brown, E. J.; Schreiber, S. L., Identification of an 11-kDa FKBP12 rapamycinbinding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci USA* **1995**, 92, 4947–4951.
- [210]. Kunz, J.; Hall, M. N., Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem Sci* **1993**, 18, 334–338.
- [211]. Choi, J.; Chen, J.; Schreiber, S. L.; Clardy, J., Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* **1996**, 273, 239–242.
- [212]. Banaszynski, L. A.; Liu, C. W.; Wandless, T. J., Characterization of the FKBP. rapamycin. FRB ternary complex. *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 4715–21.
- [213]. Kim, D. H.; Sarbassov, D. D.; Ali, S. M.; King, J. E.; Latek, R. R.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Sabatini, D. M., mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **2002**, 110:163–75.
- [214]. Kirchner, G. I.; Meier-Wiedebach, I.; Manns, M. P., Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin Pharmacokinet* **2004**, 43, 83–95.
- [215]. Augustine, J. J.; Hricik, D.E., Experience with everolimus. *Transplant Proc* **2004**, 36, 500–503.
- [216]. Mita, M. M.; Mita, A. C.; Chu, Q. S.; Rowinsky, E. K.; Fetterly, G. J.; Goldston, M.; Patnaik, A.; Mathews, L.; Ricart, A. D.; Mays, T.; Knowles, H.; Rivera, V. M.; Kreisberg, J.; Bedrosian, C. L.; Tolcher, A. W., Phase I trial of the novel mammalian target of rapamycin inhibitor deforolimus (AP23573; MK-8669) administered intravenously daily for 5 days every 2 weeks to patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* **2008**, 26, 361–367.

- [217]. Kandzari, D. E.; Leon, M. B.; Popma, J. J.; Fitzgerald, P. J.; O'Shaughnessy, C.; Ball, M.W.; Turco, M.; Applegate, R.J.; Gurbel, P.A.; Midei, M.G.; Badre, S.S.; Mauri, L.; Thompson, K.P.; LeNarz, L.A.; Kuntz, R.E., ENDEAVOR III Investigators. Comparison of zotarolimus-eluting and sirolimus-eluting stents in patients with native coronary artery disease: a randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol*. **2006**, 48(12), 2440-7.
- [218]. Hasumi, Y.; Baba, M.; Hasumi, H.; Huang, Y.; Lang, M.; Reindorf, R. et al., Folliculin (Flcn) inactivation leads to murine cardiac hypertrophy through mTORC1 deregulation. *Hum. Mol. Genet* **2014**, 23, 5706-5719.
- [219]. Heffron, T. P.; Berry, M.; Castaneda, G.; Chang, C.; Chuckowree, I.; Dotson, J.; Folkes, A.; Gunzner, J.; Lesnick, J. D.; Lewis, C.; Mathieu, S.; Nonomiya, J.; Olivero, A.; Pang, J.; Peterson, D.; Salphati, L.; Sampath, D.; Sideris, S.; Sutherlin, D. P.; Tsui, V.; Wan, N. C.; Wang, S.; Wong, S.; Zhu, B. Y., Identification of GNE-477, a potent and efficacious dual PI3K/mTOR inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*. **2010**, 20: 2408-2411.
- [220]. Maira, S. M.; Stauffer, F.; Brueggen, J.; Furet, P.; Schnell, C.; Fritsch, C.; Brachmann, S.; Chene, P.; De Pover, A.; Schoemaker, K.; Fabbro, D.; Gabriel, D.; Simonen, M.; Murphy, L.; Finan, P.; Sellers, W.; Garcia-Echeverria, C., Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther* **2008**, 7, 1851-1863.
- [221]. Zou, Z. Q.; Zhang, X. H.; Wang, F.; Shen, Q. J.; Xu, J.; Zhang, L. N.; Xing, W. H.; Zhuo, R. J.; Li, D., A novel dual PI3K/mTOR inhibitor PI-103 with high antitumor activity in non-small cell lung cancer cells. *Int J Mol Med* **2009**, 24, 97-101.
- [222]. Molckovsky, A.; Siu, L. L., First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: Highlights of the 2008 American Society of Clinical Oncology meeting. *J Hematol Oncol* **2008**, 1:20.
- [223]. Li, T.; Jia, W.; Wang, X.; Yang, N.; Chen, S. M.; Tong, L. J.; Yang, C. H.; Meng, L. H.; Ding, J., WJD008, a Dual PI3K/mTOR inhibitor, Prevents PI3K Signaling and Inhibits the Proliferation of Transformed Cells with Oncogenic PI3K mutant. *J Pharmacol Exp Ther* **2010**, 334, 830-838.
- [224]. O'Reilly, K. E.; Rojo, F.; She, Q. B.; Solit, D.; Mills, G. B.; Smith, D.; Lane, H.; Hofmann, F.; Hicklin, D. J.; Ludwig, D. L.; Baselga, J.; Rosen, N., mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* **2006**, 66, 1500-1508.
- [225]. Feldman, M. E.; Apsel, B.; Uotila, A.; Loewith, R.; Knight, Z. A.; Ruggero, D. et al., Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* **2009**, 7:e38.
- [226]. Powles, T.; Wheeler, M.; Din, O.; Geldart, T.; Boleti, E.; Stockdale, A. et al., A randomised phase 2 study of AZD2014 versus everolimus in patients with VEGF-refractory metastatic clear cell renal cancer. *Eur. Urol* **2016**, 69, 450-456.
- [227]. Garcia-Martinez, J. M.; Moran, J.; Clarke, R. G.; Gray, A.; Cosulich, S. C.; Chresta, C. M.; Alessi, D.R., Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem J*. **2009**, 421, 29-42.
- [228]. Beevers, C. S.; Chen, L.; Liu, L.; Luo, Y.; Webster, N. J.; Huang, S., Curcumin disrupts the Mammalian target of rapamycin-raptor complex. *Cancer Res*. **2009**, 69, 1000-1008.
- [229]. Zhang, Q.; Kelly, A. P.; Wang, L.; French, S. W.; Tang, X.; Duong, H. S.; Messadi, D. V.; Le, A. D., Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit mast cell-stimulated type I collagen expression in keloid fibroblasts via blocking PI-3K/Akt signaling pathways. *J Invest Dermatol*. **2006**, 126, 2607-2613.
- [230]. Marques, F. Z.; Markus, M. A.; Morris, B. J., Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *Int J Biochem Cell Biol*. **2009**, 41, 2125-2128.
- [231]. Jiang, H.; Shang, X.; Wu, H.; Gautam, S. C.; Al-Holou, S.; Li, C.; Kuo, J.; Zhang, L.; Chopp M., Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *J Exp Ther Oncol*. **2009**, 8, 25-33.
- [232]. Goel, A.; Kunnumakkara, A. B.; Aggarwal, B. B., Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. **2008**, 75, 787-809.

- [233]. Rodrik-Outmezguine, V. S.; Okaniwa, M.; Yao, Z.; Novotny, C. J.; McWhirter, C.; Banaji, A. et al., Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature* **2016**, 534, 272–276.
- [234]. Temiz-Resitoglu, M.; Kucukkavruk, S. P.; Guden, D. S.; Cecen, P.; Sari, A. N.; Tunctan, B.; Gorur, A.; Tamer-Gumus, L.; Buharalioglu C. K., Malik, K.U.; Sahan-Firat, S., Activation of mTOR/I κ B- α /NF- κ B pathway contributes to LPS-induced hypotension and inflammation in rats. *European Journal of Pharmacology* **2017**, 802, 7–19.
- [235]. Sari, A. N.; Kacan, M.; Unsa, I. D.; Sahan Firat, S.; Buharalioglu, C. K.; Vezir, O.; Korkmaz, B.; Cuez, T.; Canacankatan, N.; Sucu, N.; Ayaz, L.; Tamer, L.; Gorur, A.; Tunctan, B., Contribution of RhoA/Rho-kinase/MEK1/ERK1/2/iNOS pathway to ischemia/reperfusion-induced oxidative/nitrosative stress and inflammation leading to distant and target organ injury in rats. *Eur J Pharmacol* **2014**, 723, 234-245.
- [236]. Tunctan, B.; Korkmaz, B.; Yildirim, H.; Tamer, L.; Atik, U.; Buharalioglu, C., Increased production of nitric oxide contributes to renal oxidative stress in endotoxemic rat. *Am J Infect Dis* **2005**, 1, 111-115.
- [237]. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, 72, 248-254.
- [238]. Green, L. C.; Wagner, D. A.; Glogowski, J.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R., Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **1982**, 126(1), 131-8.
- [239]. Tunctan, B.; Uludag, O.; Altug, S.; Abacioglu, N., Effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Pharmacol Res* **1998**, 38(5), 405-11.
- [240]. Cuez, T.; Korkmaz, B.; Buharalioglu, C. K.; Sahan-Firat, S.; Falck, J.; Malik, K. U.; Tunctan, B., A synthetic analogue of 20-HETE, 5,14-HEDGE, reverses endotoxin-induced hypotension via increased 20 HETE levels associated with decreased iNOS protein expression and vasodilator prostanoid production in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2010**, 106, (5), 378-388.
- [241]. Korkmaz, B.; Buharalioglu, K.; Sahan-Firat, S.; Cuez, T.; Tunctan, B., Activation of MEK1/ERK1/2/iNOS/sGC/PKG pathway associated with peroxynitrite formation contributes to hypotension and vascular hyporeactivity in endotoxemic rats. *Nitric Oxide: Biol Chem* **2011**, 24, (3), 160-172.
- [242]. Wilson, C. M., Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. *Methods in Enzymol* **1983**, 91, 236-247.
- [243]. Salinovich, O.; Montelano, R. C., Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **1998**, 156, 341-347.
- [244]. Scott, M.; Filippone, S. M.; Samidurai, A.; Roh S. K.; Cain, C. K.; He, J.; Fadi N.; Salloum, F. N.; Kukreja, R. C.; Das, A., Reperfusion Therapy with Rapamycin Attenuates Myocardial Infarction through Activation of AKT and ERK. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, 1-16.
- [245]. Das, A.; Salloum, F. N.; Filippone, S. M.; Durrant, D. E.; Rokosh, G.; Bolli, R.; Kukreja, R. C.; Inhibition of mammalian target of rapamycin protects against reperfusion injury in diabetic heart through STAT3 signaling. *Basic Res Cardiol* **2015**, 110:31.
- [246]. Chen, L. J.; Xu, Y. L.; Song, B.; Yu, H. M.; Oudit, G. Y.; Xu, R.; Zhang, Z. Z.; Jin, H. Y.; Chang, Q.; Zhu, D. L.; Zhong, J. C., Angiotensin-converting enzyme 2 ameliorates renal fibrosis by blocking the activation of mTOR/ERK signaling in apolipoprotein E-deficient mice. *Peptides* **2016**, 79, 49–57.
- [247]. Ling, H.; Chen, H.; Wei, M.; Meng, X.; Yu, Y.; Xie, K., The effect of autophagy on inflammation cytokines in renal ischemia/reperfusion injury. *Inflammation* **2016**, 39(1), 347-356.
- [248]. Di Paola, R.; Galuppo, M.; Mazzon, E.; Paterniti, I.; Bramanti, P.; Cuzzocrea, S., PD98059, a specific MAP kinase inhibitor, attenuates multiple organ dysfunction syndrome/failure (MODS) induced by zymosan in mice. *Pharmacological Research* **2010**, 61, 175–187.
- [249]. Tan, J.; Hu, J.; He, Y.; Cui, F., Protective role of silymarin in a mouse model of renal ischemia–reperfusion injury. *Diagnostic Pathology* **2015**, 10(198), 1-6.

- [250]. Lisi, L.; Navarra, P.; Feinstein, D. L.; Russo, C. D., The mTOR kinase inhibitor rapamycin decreases iNOS mRNA stability in astrocytes. *Journal of Neuroinflammation* **2011**, 8(1), 1-11.
- [251]. Guan, T.; Liu, Q.; Qian, Y.; Yang, H.; Kong, J.; Kou, J.; Yu, B., Ruscogenin reduces cerebral ischemic injury via NF- κ B-mediated inflammatory pathway in the mouse model of experimental stroke. *European Journal of Pharmacology* **2013**, 714, 303-311.
- [252]. Ziypak, T.; Halici, Z.; Alkan, E.; Akpınar, E.; Polat, B.; Adanur, Ş.; Çadırcı, E.; Ferah, I.; Bayır, Y.; Karakuş, E.; Mercantepe, T., Renoprotective effect of aliskiren on renal ischemia/reperfusion injury in rats: electron microscopy and molecular study. *Ren Fail* **2015**, 37(2), 343-354.
- [253]. Jin, H. K.; Ahn, S. H.; Yoon, J. W.; Park, J. W.; Lee, E. K.; Yoo, J. S.; Lee, J. C.; Chol, W. S.; Han, J. W., Rapamycin down-regulates inducible nitric oxide synthase by inducing proteasomal degradation. *Biol. Pharm. Bull* **2009**, 32(6), 988-992.
- [254]. Temiz, M.; Şenol, S. P.; Güden, D. S.; Çeçen, P.; Sarı, A. N.; Tunçtan, B.; Görür, A.; Tamer, L.; Buharalıoğlu, C. K.; Şahan-Fırat, S., Endotoksemik sıçanlarda ortaya çıkan sistemik inflamatuvar yanıtta mTOR/I κ B- α /NF- κ B yolu etkinliğinin rolü. 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi. Ankara, 7-10 Eylül 2015: 136.
- [255]. Tunctan, B.; Korkmaz, B.; Sari, A. N.; Kacan, M.; Unsal, D.; Serin, M. S.; Buharalioglu, C. K.; Şahan-Fırat, S.; Cuez, T.; Schunck, W.; Manthati, V. L.; Falck, J. R.; Malik, K. U., Contribution of iNOS/sGC/PKG pathway, COX-2, CYP4A1, and gp91phox to the protective effect of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against vasodilation, hypotension, tachycardia, and inflammation in a rat model of septic shock. *Nitric Oxide* **2013**, 33, 18-41.
- [256]. Sorce, S.; Krause, K. H., NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal.* **2009**, 11(10), 2481-504.
- [257]. Makni-Maalej, K.; Chiandotto, M.; Hurtado-Nedelec, M.; Bedouhene, S.; Gougerot-Pocidalo, M.; My-Chan Dang, P.; El-Benna, J., Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochemical Pharmacology* **2013**, 85, 92-100.
- [258]. Whaley-Connell, A. T.; Habibi, J.; Nistala, R.; DeMarco, V. G.; Pulakat, L.; Hayden, M. R.; Joginpally, T.; Ferrari, C. M.; Parrish, A. R.; Sowers, J. R., Mineralocorticoid receptor-dependent proximal tubule injury is mediated by a redox-sensitive mTOR/S6K1 pathway. *Am J Nephrol*, **2012**, 35, 90-100.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Çağla AKINCI UYSAL

Doğum Tarihi : 08.05.1985

E-mail : 1604070171004@mersin.edu.tr

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Eczacılık	Ankara Üniversitesi	2003-2007
Yüksek Lisans	Sağlık Bilimleri/Eczacılık Farmakoloji	Mersin Üniversitesi	2016-devam ediyor

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Eczacı	Çağla Eczanesi Fatsa/ORDU	2007-2012
Yardımcı Eczacı	Uysallar Eczanesi Silifke/MERSİN	2012-devam ediyor

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

Uluslararası Poster ve Özetli Yayımlanan Bildiriler

1. AKINCI-UYSAL, Ç.; ŞAHAN-FIRAT, S., Parkinson Hastalığı'nın Tedavisinde Müzik. 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, Istanbul, April 26-29, Abstract Book, p. 437 Poster No: 0262 (2017).
2. AKINCI-UYSAL, Ç.; TEMİZ-REŞİTOĞLU, M., ŞAHAN-FIRAT, S., Role of Autophagy in the Treatment of Neurodegenerative Diseases. 2nd International Congress on Multidisciplinary Studies, Adana, Turkey, May 4th-5th, Abstract Book, s.1129, (2018).