

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİPERKOLESTEROLEMİK TAVŞANLARIN VASKÜLER SİSTEMİNDE Hsp90-
eNOS ETKİLEŞİMİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans

Tezi

Sema SARIGÜL

DANIŞMAN
Doç. Dr.Günay YETİK ANACAK

İZMİR

2014

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİPERKOLESTEROLEMİK TAVŞANLARIN VASKÜLER SİSTEMİNDE Hsp90-
eNOS ETKİLEŞİMİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans

Tezi

Sema SARIGÜL

DANIŞMAN
Doç. Dr.Günay YETİK ANACAK

İZMİR

2014

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı – Soyadı

İmza

Danışman: Doç. Dr. Günay Yetik ANACAK

Üye: Doç. Dr. Nergis MURAT

Üye: Yrd. Doç. Dr. Gönen Özşarlak SÖZER

Yedek Üyeler:

Üye: Doç.Dr.Gülnur Karaoğlu SEVİN

Üye: Prof. Dr. Zeliha Kerry.

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih:

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitime başlamamda sonsuz desteği olan, eğitimim boyunca bana her zaman destek olan, bütün bilgi birikimini ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Günay YETİK ANACAK'a,

Tez çalışmalarım boyunca bana hertürlü konuda yardımcı olan, güleryüz ve desteklerini eksik etmeyen E.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AB Dalı akademisyenlerine ve çalışanlarına,

Bu yüksek lisans tez çalışması Türkiye Bilimler akademisi TUBA-GEBİP (GYA-2010), Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Programı 12-ECZ-026 nolu projesi tarafından desteklenmiştir. Ayrıca TÜBİTAK 109s453 projesinde kullanılan protokoller kullanılarak hsp90-eNOS kompleks oluşumu incelenmiştir. Deneylerin gerçekleştirilmesi sırasında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Analiz Laboratuvarlarından (FABAL) yararlanılmıştır. Bu kapsamda projeye destek veren TUBA, Tübitak, Ege Üniversitesi Bap programı ve FABAL'a,

Yüksek lisans eğitim boyunca birlikte çalıştığım, bilgi birikimlerini, desteğini eksik etmeyen arkadaşım Zeynep YILMAZ'a ve diğer laboratuvardaki çalışma arkadaşlarıma,

Tüm yaşamımda hep bana destek olduğu gibi yüksek lisans eğitimimde de desteğini, arkadaşlığını, dostluğunu eksik etmeyen canım arkadaşım Aynur OCAK'a,

Maddi ve manevi desteklerini tüm yaşamım boyunca hiç eksik etmeyen, mutlu ve huzur dolu bir yaşam sağlayan canım aileme ve bana tanıştığımız günden beri sevgilerini, anlayışlarını, desteklerini eksik etmeyen yeni aileme,

Ve son olarak hayatıma girdiği günden beri, hep yanımda olan, yüksek lisans eğitimim boyunca sabrını eksik etmeyen eşim Yahya Kemal SARIGÜL'e

Teşekkürlerimi sunuyorum...

İzmir, Ağustos 2014

Sema Sarıgül

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
TABLO LİSTESİ.....	VII
ŞEKİL LİSTESİ.....	VIII
RESİM LİSTESİ.....	X
KISALTMALAR.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Nitrik oksit sentaz (NOS) ve Regülasyonu.....	1
1.1.1. Fosforilasyon	2
1.1.2. Protein-Protein Etkileşmeleri.....	4
1.2. AMPK'nın eNOS regülasyonunda Rolü	14
1.2.1. Patolojik Durumlarda AMPK	16
1.3. Endotelyal Disfonksiyon	17
1.4. Endotelyal disfonksiyonda Hsp90'nın Rolü.....	21
1.4.1. Aterosklerozda Hsp90	22
1.5. Endotelyal Disfonksiyonda Kaveolin'in Rolü	24
1.5.1. Aterosklerozda Kaveolin	25
1.5.2. Fizyolojik Durumda Kaveolin	26
1.6. Ateroskleroz	27
1.6.1. Ateroskleroz patolojisi ve intimal kalınlaşma	27
1.6.2. Deneysel ateroskleroz modelleri :.....	32
1.6.3. Aterosklerozda vasküler reaktivite	40

1.6.4.	Aterosklerozda eNOS ve Regölasyonu.....	41
1.7.	Farklı dokulardaki aterosklerozda eNOS ekspresyonu	45
1.7.1.	Ateroskleroz patolojisinde Nitrik Oksitin rolü	48
1.8.	Vasküler Sistemde Statinlerin Rolü	49
1.8.1.	Statin grubu ilaçlar ve tedavide kullanımları	49
1.8.2.	Vasküler Sistemde Etkileri ve Etki Mekanizmaları.....	50
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	57
2.1.	Deney Hayvanları ve Tedavi Uygulamaları	57
2.1.1.	Çalışma Protokolü:	58
2.1.2.	Kolesterol Ölçümü	58
2.2.	Dokular ve Dokulara Uygulanan İşlemler	59
2.2.1.	Doku izolasyonu	59
2.2.2.	Homojenizasyon	62
2.2.3.	Protein Miktar Tayini	63
2.3.	Kullanılan Deneysel Yöntemler	64
2.3.1.	Western-blot.....	64
2.3.2.	Eş-immunçöktürme (Ko-immunopresipitasyon, CoIP).....	77
2.3.3.	Morfometri	78
2.4.	İstatistik.....	80
3.	BULGULAR:.....	81
3.1.	İntimal Kalınlaşma.....	81
3.1.1.	Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında intimal alan	81

3.2. Hayvanların Ağırlıkları	82
3.3. Hayvanların Kan Kolesterol Düzeyleri.....	82
3.4. Western Blot Deneyleri	83
3.4.1. Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının eNOS ekspresyonu üzerindeki etkileri	83
3.4.2. Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının Hsp90 ekspresyonu üzerindeki etkileri	84
3.4.3. Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının Kaveolin ekspresyonu üzerindeki etkileri	86
3.4.4. Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının Ampk ve p-Ampk ekspresyonu üzerindeki etkileri	87
3.4.5. Tavşan penil dokusunda Hsp90-eNOS kompleksinin varlığı	90
3.4.6. Tavşan aorta dokusunda hsp90-eNOS kompleks varlığı	91
3.4.7. Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan femoral arterinde hsp90 ve eNOS western blot sonuçları	91
4. TARTIŞMA.....	94
4.1. Hiperkolesterolemiye bağlı ateroskleroz modeli oluşturulması	94
4.2. eNOS ve regülasyonunda rol alan proteinler	94
4.3. Hsp90 ve Kaveolin	95
4.4. eNOS.....	98

4.5. Ampk	99
4.6. Hsp90 - eNOS.....	100
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	103
6. ÖZET	104
6. ABSTRACT	106
7. YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	108
8. ÖZGEÇMİŞ.....	122



TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Tavşan aorta dokusunda farklı sürelerde kolesterolle besleme ile oluşturulan ateroskleroz modelleri.....	37
Tablo 1.2. Tavşan femoral arter dokusunda farklı sürelerde kolesterolle besleme ile oluşturulan ateroskleroz modelleri.....	38
Tablo 1.3. Tavşan penil dokusunda farklı sürelerde kolesterolle besleme ile oluşturulan ateroskleroz modellerinde endotelial disfonksiyondakine benzer moleküler değişiklikler	39
Tablo 2-1 : Konsantre Krebs çözeltisi (20X)	60
Tablo 2-2 : Krebs çözeltisi (1X)	60
Tablo 2-3 : Ayırıcı jel (Resolving Jel) %8 içeriği	68
Tablo 2-4 : Toplayıcı jel (Stacking Jel) %4 içeriği	69
Tablo 2-5 : Ayırıcı jel tamponu içeriği	69
Tablo 2-6 : Toplayıcı jel amponu içeriği	69
Tablo 2-7 : Örnek tampon çözeltisi (4X SDS-loading buffer) içeriği ve hazırlanışı.....	70
Tablo 2-8 : Jel Yürüme Tamponu (Running buffer 10X) içeriği	70
Tablo 2-9 : Transfer tamponu (transfer buffer 10X) içeriği	72
Tablo 2-10 : Ponceau-S solüsyonu içeriği	72
Tablo 2-11 : Staining solüsyonu içeriği	73
Tablo 2-12 : De-Staining solüsyonu içeriği	73
Tablo 2-13 : Tris tamponu (TBS – Tris Buffered Saline) içeriği	74
Tablo 2-14: Deneylerde kullanılan ilaçlar	79
Tablo 2-15 : Deneylerde kullanılan araç ve gereçler	80
Tablo 3-1 : Kolesterol ile beslemenin serum kolesterol düzeyleri üzerine etkisi	82

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. NO sentaz reaksiyonu.	1
Şekil 1-2 : HMG-KoA redüktaz-substrat kompleksi.....	50
Şekil 2-1 : Membran temelli immün assay.....	65
Şekil 2-2 : Genel olarak proteinlerin sekonder yapısı.....	67
Şekil 2-3 : SDS-PAGE Jel Elektroforezi..	68
Şekil 2-4 : SDS-PAGE Jel Elektroforezi.	68
Şekil 2-5 : PVDF Membran Transfer.....	71
Şekil 2-6 :Moleküler çalışma özeti.....	76
Şekil 2-7 : Eş-immunöktürme protein ayırma genel şeması.	78
Şekil 3-1 : Aortada hemotoksilen eozin boyaması sonrası normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında ölçülen intimal alan değerlerini gösteren bar grafik ve temsili mikroskop görüntüleri, 4x (A,B), 10x (C,D), 20x (E,F), 40x (G,H).....	81
Şekil 3-2 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının eNOS ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri.....	83
Şekil 3-3 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının hsp90 ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri.....	85
Şekil 3-4 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının kaveolin ekspresyonu üzerindeki	

etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri.
.....86

Şekil 3-5 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının ampk ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri.....88

Şekil 3-6 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo statin uygulamasının p-ampk ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri.
.....89

Şekil 3-7 : Tavşan penil dokusunda hsp90-eNOS kompleksi. Fluvastatin ve Dmag (statin; 30µM 3 saat, DMAG;1µg/ml 1 saat) uygulanan Normokolesterolemik tavşan penil dokusunda eNOS antikoru ile immünçöktürme yapılmış homojenatlarında hsp90 ve eNOS bantları.....90

Şekil 3-8 : Tavşan aorta dokusunda hsp90-eNOS kompleksi. Statin (fluvastatin; 30µM 15 saat) uygulanan normokolesterolemik tavşan aorta dokusunda eNOS antikoru ile immünçöktürme yapılmış homojenatlarında hsp90 ve eNOS bantları.....91

Şekil 3-9 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan femoral arterinde 3 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının hsp90 ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri..
.....92

Şekil 3-10 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan femoral arterinde 3 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının eNOS ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri.....93

RESİM LİSTESİ

Resim 1.1. Ateroskleroz gelişim aşamaları.....	29
Resim 1.2. A. Tavşan normal aorta yapısı (50x), B. Damarlardaki ateroskleroz sonucu oluşan plaklar.....	31



KISALTMALAR

Kısaltma	Açıklama	Kısaltma	Açıklama
17-AAG	17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin	CSD	Kaveolin scaffolding domain
ADP	Adenozin difosfat	DDAH	Dimetil arjinin dimetil aminohidrolaz
ADMA	Asimetrik dimetil arjinin	DMAG	17-Dimetilaminoetilamino-17-demetoksigeldanamisin
AICAR	5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide	DNA	Deoksiribonükleik asit
AMP	Adenozin monofosfat	EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
AMPK	Adenozin monofosfat ile aktive edilmiş protein	EGTA	Etilen glikol tetraasetik asit
ApoE	Apolipoprotein E	eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
APS	Amonyum persülfat	EPI	Epicatechin
ATP	Adenozin trifosfat	FAD	Flavin adenin dinükleotid
BAECs	Sığır aortik endotelial hücreleri	FMN	Flavin mononükleotid
BCA	Bicinkronik asit	HCAEC	İnsan kronik arter endotelial hücreleri
BCEC	Sığır kronik endotel hücreleri	HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2
BH ₄	Tetrahidrobiopterin	HMG-KoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA
BK	Bradikinin	hsf1	Isı şoku transkripsiyon faktör 1
BSA	Bovine Spine Albumin	Hsp	Isı şoku protein
CaM	Kalmodulin	Hsp90	Isı şoku protein 90
CaMKII	Kalmodulin kinaz II	ICAM	İntraselüler hücre adhezyon molekülü
CD36	Cluster of Differentiation 36	IL-6	İnterlökin 6
cGMP	siklik guanozin monofosfat	IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfat
CRP	C-reaktif protein	iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

Ko-IP	Ko-immunopresipitasyon	ONOO ⁻	Peroksinitrit
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein	p53	Tümör protein 53
L-NA	N ^G -nitro-L-arginin	PAECs	Pulmoner arter endotel hücreleri
L-NAA	N ^G -amino-L-arginin	PAF	Trombosit aktive edici faktör
L-NAME	L-N ^G -nitro arginin metilester	PI ₃ K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arjinin	PVDF	Polivinilidenflorit veya polivinilidene diflorit
LPS	Lipopolisakkarid		
		RAD	Radical
MAEC	Fare aortik endotel hücreleri	ROS	Reaktif oksijen türleri
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1	SDS	Sodyum dodesil sülfat
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit	SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat Poly-Akrilamid Jel Elektroforez
		sGC	sitoplazmik guanilil siklaz
myr-Akt	Miristollenmiş–Akt		
NFκB	Nükleer faktör κB	SR-B1	Scavenger reseptör sınıf B tip I
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz	TBS	Tris Buffer Saline
NO	Nitrik oksit	TBS-T	Tween 20 içeren Tris Buffer Saline
NO ₂	Nitrit	TEMED	Tetra metil etilen diamin
NO ₃	Nitrat	TG	Trigliserit
NOS	Nitrik oksit sentaz	VCAM-1	Vasküler hücre adhezyon molekülü
NOX	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz	VEGF	Endotelial büyüme faktörü
NP-40 (igepal)	Nonidet-P40	VSMC	Damar düz kas hücreleri

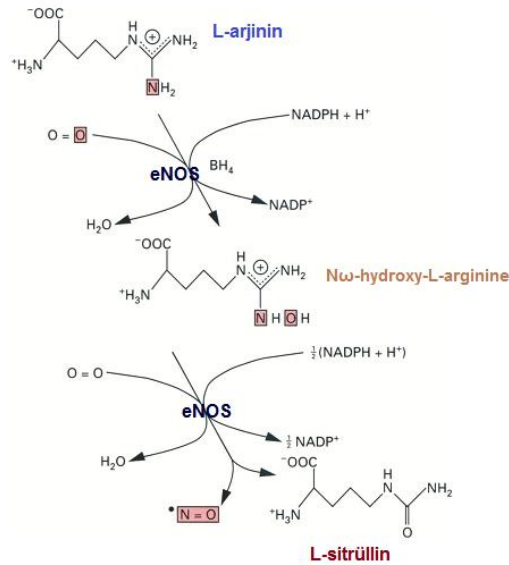
BÖLÜM I

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Nitrik oksit sentaz (NOS) ve Regülasyonu

“Endotelyal” NOS (eNOS ya da NOS III) ve “nöronal” NOS (nNOS) izoformları, karakterize edildikleri dokunun ismiyle anılmaya başlamıştır. Her ikisi de genellikle Ca^{+2} /Kalmodulin (CaM) ve aynı zamanda fosforilasyonla regüle edilir. “İndüklenebilir” NOS (iNOS, NOS II) izoformu, istisnaların varlığı doğrultusunda, genelde uyarı gerektirir. CaM’ne çok güçlü bağlanır ve bu nedenle Ca^{+2} -bağımsızdır. Ürettiği NO miktarı da eNOS ve nNOS’tan fazladır ve enflamasyon ve immonolojik savunma durumlarında görev alır (Randriamboavonjy and Fleming 2005).

NOS, amino asit L-arjiniyi substrat ve oksijeni de ko-substrat olarak kullanarak L-sitrülline dönüştürür ve bu reaksiyon sırasında yan ürün olarak nitrik oksit (NO) oluşur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. NO sentaz reaksiyonu. Kare içindeki N ve O atomları NO bileşenlerinin kaynağını göstermektedir (Knowles and Moncada 1994).

NO sentezinde gerekli olan kofaktörler şöyle sıralanabilir: NADPH, biopterin, flavin adenine dinükleotid (FAD) ve flavin mononükleotid (FMN). Flaviner ve biopterin tüm izozimlere bağılı olarak bulunur. Bu demektir ki purifiye edildikten sonra da enzime kısmen de olsa bağılı halde bulunurlar.

eNOS aktivitesini ve NO biyoyararlanımını düzenleyen en önemli moleküler mekanizmalar arasında eNOS posttranslasyonel regülasyonu yer alır. Bu düzenleyici mekanizmalarda eNOS sinyalizasyonunun uygun yer ve zamansal organizasyonu önemlidir. Örneğin, eNOS'un intrasellüler lokalizasyonu, eNOS'un kalsiyum-kalmodulin bağımlı aktivasyonunu ve eNOS fosforilasyon derecesini düzenler (Jagnandan, Sessa et al. 2005). Benzer şekilde hücre membranına hedeflenen eNOS'un, eNOS aktivasyonunu düzenleyen S-nitrosilasyon/denitrosilasyon döngüsü için gerekli olduğu gösterilmektedir (Erwin, Mitchell et al. 2006).

Ayrıca protein-protein etkileşimleri, postranslasyonel mekanizmalar; fosforilasyon, yağ asidi modifikasyonu (miristoilasyon ve palmitoilasyon gibi), enzim altünitelerinin dimerizasyonunu da NOS regülasyonunda önemli faktörlerdir (Fleming and Busse 2003).

1.1.1. Fosforilasyon

eNOS fosforilasyonu çoğu zaman eNOS aktivitesini düzenleyen önemli bir mekanizmadır. Fosforilasyon, spesifik protein kinazların ve protein fosfatazların fosforilasyonu düzenlediği yerlerde çeşitli sinyal yolları tarafından düzenlenir (Musicki, Ross et al. 2009)

Tyr-81, Ser-114, Thr-495, Ser-615, Ser-633 ve Ser-1177 bölgelerinde eNOS fosforilasyonu tanımlanmıştır (Fleming and Busse 2003; Fulton, Church et al. 2005). Bu bölgelerdeki fosforilasyon enzim aktivitesini; direkt olarak veya eNOS üzerindeki diğer düzenleyici bölgelerin modüle edilmesi ile artırır veya azaltır. En iyi karakterize

edilmiş eNOS fosforilasyon yöresi enzimin redüktaz etkisi altında bulunan Ser-1177'dir. Ser-1177'de eNOS fosforilasyonunun en önemli fizyolojik stimülatörü, damarlardaki sabit kan akışı ile endotel hücreleri üzerine uygulanan bir basıncı olan shear stress dir. Shear stressin yanı sıra çeşitli hormonlar ve VEGF, insülin-benzeri büyüme faktör 1(IGF-1) gibi büyüme faktörleri, statinler ve östrojen; eNOS'u fosforilize eder ve Ser-1177 zerindeki eNOS'tan kalmodulin ayrılmasını azaltarak ve redktazdan oksijenaz etki alanına elektron transferini kolaylaştırarak eNOS'un katalitik fonksiyonunu aktive eder (Fulton, Gratton et al. 1999; McCabe, Fulton et al. 2000) Sessa ve arkadaşları; verilen bir uyarıcıya veya vasküler yatağa bağlı olarak Akt (protein kinaz B), siklik AMP-bağımlı protein kinaz (PKA), AMP-aktif protein kinaz (AMPK), cGMP-bağımlı protein kinaz (PKG), kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II ve protein kinaz C (PKC) gibi çok sayıda protein kinaz aracılığıyla Ser-1177 fosforile edilebildiğini göstermiştir (Sessa 2004). Akt, protein kinaz A (PKA) ya da AMP-bağlı kinaz (AMPK) eNOS'un Ser-1177 rezidüsünün fosforlamaları, artan eNOS aktivitesiyle ilişkilendirilebilir.

AMPK'nın endotelyal hücrelerde (ECs) shear stress ile aktif hale gelerek eNOS'u Ser1177 noktasında fosforillediği böylece eNOS aktivitesinin ve NO üretiminin arttığı gösterilmiş (Dimmeler, Fleming et al. 1999).

Ser-1177'nin aksine Thr-495 zerindeki eNOS fosforilasyonu; kalsiyum/kalmodulin'in eNOS'a bağlamasını engelleyerek eNOS'un katalitik aktivitesini azaltmaktadır. Bu bakımdan eNOS aktivitesi için Thr-495 defosforilasyonu ve Ser-1177 fosforilasyonu gerekli görülmektedir (Harris, Ju et al. 2001; Michell, Chen et al. 2001) Protein kinaz C sinyalinin; genellikle Thr-495'de eNOS fosforilasyonunu ve Ser-1177 defosforilasyonunu teşvik ettiği dolayısıyla enzim aktivitesini azalttığı kabul edilmiştir. Thr-495 defosforilasyonunun ise, protein fosfataz 1 (PP1), protein fosfataz 2A (PP2A) ve kalsinrin (PP2B) tarafından aracılık edildiği ve eNOS aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir.

eNOS üzerinde diğer bölgelerdeki fosforilasyonun fizyolojik önemi az bilinmektedir. PKA – aracılıklı Ser-633 fosforilasyonunun eNOS aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Boo, Sorescu et al. 2003). Yine shear stress, VEGF, bradikinin gibi çeşitli agonistler ve statinler; enzimin ilk aktivasyonundan sonra kalsiyum akışı ve Ser-1177 fosforilasyonu aracılığıyla bu bölgede fosforilasyonu arttırmaktadır. Bauer ve arkadaşları PKA ve Akt aracılıklı Ser-615'teki eNOS fosforilasyonunun eNOS aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir (Bauer, Fulton et al. 2003) ve bu, araştırmacılar tarafından eNOS ve diğer proteinler arasındaki etkileşimleri düzenlemek için ve diğer bölgelerdeki eNOS fosforilasyonu için önemli olarak görülmektedir.

Li ve arkadaşları ise Ser-114'te eNOS fosforilasyonunun enzim aktivitesini inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun enzimin katalitik aktivitesindeki direkt etkisi ile değil Kaveolin-1 ile eNOS birleşmesini arttıran dolaylı bir etki ile meydana geldiğini bildirmişlerdir (Li, Ruan et al. 2007).

Src kinaz aracılıklı Tyr-81'de eNOS fosforilasyonu ise; kalsiyum-uyarımli eNOS aktivasyon sürecini etkileyerek eNOS aktivitesinin artışına katkı sağlar, protein-protein etkileşmelerini veya enzimin hücre içi lokalizasyonunu değiştirir (Fulton, Church et al. 2005).

1.1.2. Protein-Protein Etkileşmeleri

1.1.2.1. Kalsiyum-Kalmodulin

Kalmodulin eNOS regülasyonunda rolü olduğu belirlenen ilk proteindir. nNOS ve eNOS üzerinde yapılan çalışmalar kalmodulinin NO sentezi için bir aktivatör rolü olduğunu ortaya koymuştur (Bredt and Snyder 1990). Kalmodulinin eNOS'taki ilgili bağlanma noktasına bağlanması, redüktaz bölgeden oksijenaz bölgesine NADPH aracılıklı elektron akışında kolaylık sağlar. Oksijenaz domainindeki akseptör olan

Hem'in demiri oksijene bağlanarak L-arjinin'den NO sentezini katalize eder. İnsan endotel hücrelerinden immunopresipitasyonu sağlanan eNOS'un immunoreaktif kalmodulin bağlanma noktasının olduğu gözlenmiştir (Abu-Soud and Stuehr 1993).

Gerek izole damarlar gerekse endotel hücre kültüründe yapılan çalışmalarda ekstraselüler kalsiyumun ortamdan uzaklaştırılması durumunda agonistlerle indüklenen NO salınımının azaldığı gözlenmiştir. Bu durum kalsiyumun endotel kaynaklı NO salınımı için önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Hücre kültürlerinde ortamdan kalsiyumun uzaklaştırılması ya da kalmodulin inhibitörleri ile antagonize edilmesinin NO salınımını ve eNOS aktivitesini bloke ettiği gözlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda eNOS, aktivasyonu için kalsiyum kalmodulin kompleksine ihtiyaç duyan bir enzim olarak tanımlanmıştır (Busse R 1990).

Hem eNOS hem de nNOS genellikle Ca^{+2} /Kalmodulin (CaM) ve aynı zamanda fosforilasyonla regüle edilirken "İndüklenebilir" NOS (iNOS, NOS II) izoformu, istisnaların varlığı doğrultusunda, genelde uyarı gerektirir ve CaM'ne çok güçlü bağlanır ve bu nedenle Ca^{+2} -bağımsızdır. Ürettiği NO miktarı da eNOS ve nNOS'tan fazladır ve enflamasyon ve immonolojik savunma durumlarında görev alır (Randriamboavonjy and Fleming 2005).

Hücre içindeki Ca^{+2} seviyeleri arttığında, kalmodulin-kaveolin1 etkileşimi bozulur, eNOS hücre membranından ayrılarak plazmaya geçer, elektron akışı başladığı için, eNOS aktifleşir ve NO üretilir.

1.1.2.2. Kaveolin-1

eNOS'un kaveolanın majör proteini olan kaveolin-1 proteini ile kenetlenmiş bir şekilde bulunduğu tespit edilmiştir (Feron, Belhassen et al. 1996).

Kaveolanın bütünlüğü için gerekli olan kaveolin-1 proteini, kaveola içerisindeki diğer proteinlerle direkt veya indirekt yollarla etkileşerek sinyalizasyonları negatif

veya pozitif bir şekilde regüle eder. Endoplazmik retikulumdan golgi boyunca plazma membranına devam eden kolesterol trafiğine, kaveolin-1 proteini kolesterol bağlayıcı bir protein olarak aracılık etmektedir. Kaveolin-1 hücrede oligomerize olmak için kendisiyle etkileşir ve 82.-101. aminoasit rezüdüllerinden oluşan ve "kaveolin scaffolding domain" (CSD) kısmı ile diğer proteinlere bağlanabilir. Kaveolin-1'in oksidatif stres ve shear stres uyarılarına yanıt olarak Scr kinazlar ile tirozin 14 noktasından fosforile olabileceği gösterilmiştir (Li, Couet et al. 1996).

Kaveolin-1'in eNOS için primer bağlanma noktasının 60-101. aminoasitler olduğu ve ikincil olarak ise 135-178. aminoasitler olduğu belirlenmiştir (Garcia-Cardena, Martasek et al. 1997). eNOS'un kaveolin-1 ve kaveolin-3 scaffolding domain kaynaklı peptidler ile inkübasyonunun eNOS aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Buna ilaveten eNOS'un kaveolin bağlama noktasının mutasyonu sonucunda kaveolinin NO salınımı baskılayıcı etkisinin bloke olduğu da gözlenmiştir (Garcia-Cardena, Martasek et al. 1997). Kaveolin-eNOS immunokompleksinin kaveolin scaffolding peptidler (82-101. aminosidler) varlığında bozulduğu ortaya konmuştur (Michel, Feron et al. 1997). eNOS enzim aktivitesinin kaveolin peptidleri yada kaveolinin aşırı ekspresyonu ile azalması ve bu durumun eksojen kalmodulin ilavesiyle geriye dönmesi eNOS'un kalmodulin (aktivatör) ve kaveolin (inhibitör) ile çift taraflı regüle edildiğini göstermektedir. Sonuç olarak kaveolin-eNOS etkileşmesi, NO üretimini negatif olarak regüle etmekte eNOS'un allosterik modülatörü olan kalmodulin eNOS-kaveolin dissosiyasyonunu sağlamaktadır (Michel, Feron et al. 1997). Dolayısı ile Kaveolin-1'in protein-protein etkileşimi ile sinyalizasyon molekülleri üzerinde negatif regülatör etkisi olduğu, eNOS etkileşimi ile ortaya konmuştur. In vitro çalışmalar kaveolin-1 scaffolding domain (CSD) peptidin, eNOS ile direkt etkileşiminin eNOS aktivitesini ve NO üretimini inhibe ettiğini göstermiştir. CSD'ye bağlı hücreye geçirgen peptid geliştirilmek suretiyle bu etkiler in vivo olarak da gösterilmiştir (Bucci, Gratton et al. 2000). eNOS'un uygun hücre içi

lokalizasyonu; NO üretimi ile ekstrasellüler stimülasyonun en iyi şekilde bağlantısı için kritiktir. Pasif endotel hücrelerinde işlevsel eNOS'un çoğunluğu kotranslasyonal M-miristoilasyon ve posttranslasyonal palmitoilasyon aracılığıyla Kaveola'ya hedeflenmektedir (Alderton, Cooper et al. 2001). eNOS plazma membranındaki kaveollerde bulunan kaveolin-1 proteinine, kalmodülin bağlanma noktalarından bağlıdır. Bu bağlanma sonucunda, C-terminalinden N-terminaline elektron akışını engellenir ve eNOS'un aktif halde olmasına mani olur (Ju, Zou et al. 1997). Shear stress ve östrojen gibi uyarılar kalsiyum artışını indükler ve kalsiyum/kalmodulin kompleksi onun tonik etkisinden uzakta, kaveolin-1'den eNOS'un yerine geçer. eNOS translokasyonu; kalmodulin ve Hsp90 gibi diğer proteinler ile etkileşimiyle ve eNOS aktivasyonu ile ilişkilidir (Michel, Feron et al. 1997; Feron, Saldana et al. 1998). eNOS, ayrıca asetilkolin, Ca iyonu, bradikinin, ATP, elektiriksel uyarı ve sıvı akımı gibi çeşitli agonistlerce uyarılarak aktive edilebilir. Asetilkolinin agonist aktivasyonu ile de Ca^{+2} sitozole geçer ve kalmoduline bağlanır. Ca^{+2} ile aktive olmuş kalmodulin eNOS'a bağlanır. Böylece Cav-1' in kuvvetli inhibisyonu hafifletilerek NO üretilir (Razani, Woodman et al. 2002).

Kaveolin-1'in kaveola içerisinde bazı G-protein bağlı reseptörler, Hsp90, Akt, östrojen ve VEGF reseptörleri, kalsiyum pompaları gibi düzenleyici ve sinyal proteinlerinin yerini belirlemek için etkili olduğuna inanılmaktadır (Everson and Smart 2001). Bu bakımdan kalsiyum-bağımlı ve fosforilasyon-bağımlı sinyal transdüksiyon olaylarında izin verilen hızlı ve selektif regülasyonun, ekstrasellüler uyarılara karşı enzim yanıtını değiştirdiği düşünülmektedir (Feron, Saldana et al. 1998). Ayrıca Kaveolin-1, kolesterole bağlanır ve Kaveolanın kolesterol içeriğini düzenlemek için endoplazmik retikulumdan plazma membranına kolesterol alışverişinde görev alır ve Kaveolanın yapısını ve fonksiyonunu belirler (Everson and Smart 2001).

Yüksek dansiteli lipoprotein HDL için majör reseptör olan SR-B1 (scavenger receptor class B type I) ve LDL'nin modifiye formu için süpürücü reseptörlerden olan CD36 (cluster of differentiation 36) kaveolada bulunur ve SR-B1, CD36 ve Kaveolin-1 okside LDL kaveola kolesterolünü ekstrakte edebilir, eNOS'un lokalizasyonunu bozabilir ve NO salınımını azaltabilir (Truong, Aubin et al. 2010).

Kaveolin-1 knockout farelerde gözlenen artmış eNOS aktivitesi albumin ekstravazasyonunda artışa neden olur. Bu etkinin nonspesifik bir NOS inhibitörü olan L-NAME ile geriye döndüğü gözlenmiştir. Kaveolin-1 knockout farelerin endotellerinin makromolekül değiş-tokuşu için önem taşıyan transitotik veziküllerden yoksun olduğu ve sıkı bağlantılarda bir defekt olduğu gözlenmiştir. Bu durum bazal permeabilitenin artmasına neden olur. eNOS kaynaklı NO, plazma makromoleküllerinin endotelin diğer tarafında paraselüler transportu için önemli bir bileşendir. eNOS knockout farelerde VEGF ile stimüle edilen vasküler permeabilite artışında da azalma olduğu gözlenmiştir (Fukumura, Gohongi et al. 2001). Hücreye permeabl CSD peptidin eNOS aktivitesini azalttığı, böylelikle proinflamatuvar ajanlar ve VEGF ile indüklenen vasküler permeabiliteyi ve ödemi (Bucci, Gratton et al. 2000; Gratton, Lin et al. 2003) ayrıca PAF (trombosit aktive edici faktör) ile postkapiller venüllerde mikrodamar permeabilitesini de azalttığı belirlenmiştir (Zhu, Schwegler-Berry et al. 2004). Sonuç olarak, kaveolin-1'in genetik olarak kaybı bazal NO salınımını ve buna bağlı albumin sızıntısını artırırken , eNOS blokajı vasküler sızıntıyı azaltmaktadır.

Kalmodulin eNOS'un kaveolin'den dissosiyasyonundan sorumludur. eNOS'un inhibitör proteini olan kaveolin ile allosterik modülatör olan kalmodulin arasındaki ilişki bir diğer regülatör olan Hsp90'nin keşfi ile birlikte daha ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir (Chlopicki, Kozlovski et al. 2005). Methionin ile işaretlenen endotel hücrelerde, eNOS'un immunopresipitasyonunun ardından eNOS'un radyoaktif olarak işaretlenmiş pek çok protein ile etkileştiği gözlenmiştir. İmmünopresipite

olmuş bu proteinlerin western blot analiz sonuçları eNOS, kaveolin-1 ve Hsp90'nın aynı komplekste yer aldığını göstermektedir. Heteromerik kompleks incelendiğinde eNOS'un hem Hsp90 hem de kaveolin ile etkileştiği ancak Hsp90 ve kaveolinin birbirleriyle etkileşmediği eNOS'un bu kompleksi bir arada tutan bir köprü rolü oynadığı gözlenmiştir. İlginç olarak kaveolinin eNOS'a bağlanması kaveolin scaffolding domain peptid tarafından bozulduğu halde, kalsiyumla aktive edilmiş kalmodulin ilavesinin kaveolin-eNOS bağlanmasını etkilemediği görülmüştür. Bu durum in vitro olarak kalmodulinin eNOS kaveolin kompleksini fiziksel olarak ayırma yeteneğinin olmadığını ortaya koymaktadır. Hsp90 kendi başına eNOS/kaveolin etkileşmesini etkilememekte ancak kalmodulinin kaveolini eNOS'tan ayırmasını kolaylaştırarak etmektedir (Gratton, Fontana et al. 2000) .

Plazma kolesterolünün temel taşıyıcısı olan LDL'nin, hsp90 ile eNOS'un etkileşimini azaltıp Kaveolin-1'in oluşumunu ve eNOS'la etkileşimini artırmak suretiyle, eNOS'un NO ve süperoksit üretme dengesinin denetlenmesi yönünde bozulmasına neden olarak, süperoksit radikalının üretilmesine neden olduğu gösterilmiştir (Pritchard, Ackerman et al. 2002). Eretil fizyolojide eNOS ve nNOS rolü, post-translasyonel modifikasyon etkisi ve penil vasküler disfonksiyonda temel NOS izoformlarının protein-protein etkileşimleri hala incelemektedir.

eNOS'un peniste kaveolin-1 ve Hsp90 ile bir komplekste var olduğunu ve shear stress aracılığıyla penil ereksiyonun düzenlenmesinde fonksiyonel olarak mühim olduğunu göstermektedir. Kavernoöz sinirin elektriksel stimülasyonu, eNOS ile ilişkili Kaveolin-1 miktarını azaltır. Buna göre, eNOS'a bağlanan bir Kaveolin yerine geçen AP-Cav peptidinin intrakavernoöz enjeksiyonu ile, eNOS ve kaveolin-1 arasındaki etkileşimin artması erektile yanıtı azaltır, eNOS ve kaveolin-1 etkileşmesinin peniste eNOS aktivasyonunu azalttığı ve bu nedenle eNOS-aracılıklı penil ereksiyonu engellediği öne sürülmektedir (Musicki, Ross et al. 2009).

1.1.2.3. Hsp90

Hsp90 tüm ökaryotik hücrelerde çok iyi korunmuş stress proteinleridir. Hücrelerde oldukça fazla bulunur ve sitoplazma proteinlerinin %1-2'sini oluştururken, çok az bir miktar da sitoskelet ve nükleusta bulunur. Hsp90 proteini aslen proteinlerin doğru katlanmasından sorumlu olduğu bir şaperon sisteminin üyesidir (Pratt 1997). Olgunlaşma, aktivasyon ve protein alışverişlerinde önemli rol oynar ve sinyal iletimi, hücre döngüsü kontrolü, transkripsiyonal regülasyonda yer alır.

Oysa Hsp90'nın tek fonksiyonunun bu olmayabileceği ortaya çıkarılmıştır (Garcia-Cardena, Fan et al. 1998). Endotel hücre kültürlerinde eNOS'un 90-kDa'lık tirozin-fosforile proteinle birlikte kopresipite olduğu ve bu proteinin Hsp90 olduğu gösterilmiştir. Gerçekten de eNOS'un bazal aktivite gösterdiği endotel hücreler NO salınımını 4 farklı kaynakça indüklendiklerinde (shear stres, östrojen, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve histamin) Hsp90 ve eNOS arasındaki etkileşimi arttığı gösterilmiştir (Garcia-Cardena, Fan et al. 1998; Russell, Haynes et al. 2000). 2001 yılında Song ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmaya göre de, Hsp90 eNOS'un kalmodüline olan afinitesini arttırdığı gösterilmiştir (Song, Zweier et al. 2001). Hsp90 inhibitörlerinin aortik dokularda endotelial gevşemeyi engellediği (Yetik-Anacak, Xia et al. 2006), Hsp90'ın eNOS aktivasyonunda rol alan protein kinaz olan AKT enziminin fosforilasyonunu etkileyerek eNOS'u aktive ettiği gösterilmiştir (Liao, Jin et al. 2000).

eNOS'un inhibitörü olan Kaveolin ile CaM arasındaki etkileşimin, Hsp90'nın düzenleyici özelliği ile ilgisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre eNOS'un Hsp90 ve kaveolinle etkileşim içinde olduğu ancak Hsp90 ve kaveolinin birbiriyle etkileşmediği, bunun sonucu da eNOS'un arada köprü görevi gördüğü belirtilmiştir. Kaveolin-eNOS arasındaki etkileşimin Ca^{+2}/CaM ile değil de, kaveolin skafold proteinince kesildiği gösterilmiştir. Hsp90'nın ise, kendiliğinden

eNOS/kaveolin etkileşimine etki etmediği ancak CaM'nin kaveolini eNOS'tan ayırma yetisine etki ettiği gösterilmiştir (Gratton, Fontana et al. 2000).

eNOS ve Hsp90 arasındaki etkileşimin, eNOS aktivitesini artırmanın yanı sıra süperoksit üretimini de engellediğini bildiren bir çalışma mevcuttur (Pritchard, Ackerman et al. 2001). Pulmoner endotel hücrelerinde Hsp90 miktarlarının artırılmasının eNOS'un NO üretmesine, Hsp90 inhibisyonunun ise eNOS tarafından süperoksit radikali üretilmesine neden olduğu bulunmuştur (Ou, Ou et al. 2003; Sud, Sharma et al. 2007).

Eretil fizyolojide eNOS ve nNOS rolü, post-translasyonel modifikasyon etkisi ve penil vasküler disfonksiyonda temel NOS izoformlarının protein-protein etkileşimleri hala incelemektedir.

Sıçanlarda penil düz kas hücrelerinde (Musicki, Liu et al. 2008), Musicki ve arkadaşlarının yayınladıkları bir derlemede ön verilerinin penil dokuda eNOS'un peniste Hsp90 ile bir komplekste var olduğunu ve shear stress aracılığıyla penil ereksiyonun düzenlenmesinin fonksiyonel olarak önemli olabileceği belirtilmiştir.

1.1.2.4. NADPH oksidaz (NOX)-hsp90 ilişkisi

NADPH oksidaz, birçok kardiyovasküler hastalığın patofizyolojisiyle ilişkili olan ROS'un major kaynağı NADPH oksidaz enzim ailesidir (NOXs) (Lee and Griending 2008). NADPH oksidaz enzimleri hücrenin büyüme, diferansiyasyon, migrasyon ve proliferasyon gibi fonksiyonlarıyla ilişkili redoks duyarlı sinyal yolunun modülasyonunda önemli oldukları belirlenmiştir. NADPH oksidaz bağımlı reaktif oksijen ürünleri (ROS) üretimi, eNOS'u etkileyerek NO üretiminin bozulması ve endotelial disfonksiyon aracılığıyla ateroskleroz, hipertansiyon ve kalp yetmezliği gibi hastalıkların oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Sirker, Zhang et al. 2011).

Hsp90 proteini bazı NADPH alt üniteleri (NOX-1, NOX-2 gibi) ile etkileşim içindedir. Chen ve arkadaşları (Chen, Pandey et al. 2011) Hsp90'nın farmakolojik ve genetik inhibisyonunun ikincil modifiye sinyal olayları olmaksızın NOX5 den elde edilmiş süperoksidi direkt olarak indirgediği ve bunu NOX-5'in C terminal ucuna bağlanarak gerçekleştirdiğini göstermişlerdir. Hsp90 inhibitörlerinin NOX-1, NOX-2 ve NOX-3'den salınan süperoksit üretimini azalttığı, ancak yalnızca hidrojen peroksit salınımı yapan NOX-4'ün aktivitesinin hsp90 inhibitörleri tarafından etkilenmediği bulunmuştur. Sonuç olarak Hsp90 NOX aktivitesinin düzenleyerek süperoksit üretimini regüle ederken, hidrojen peroksit salınımında hsp90'ın rolünün olmadığı gösterilmiştir.

NADPH oksidaz aktivitesinin azalması aterosklerotik lezyon alanının azalması ile ilişkilidir (Fenyo, Florea et al. 2011). Hsp90 inhibitörü 17-DMAG'nin vasküler hücrelerde NADPH oksidaz aktivitesini azalttığı, vasküler düz kas hücrelerinde (VSMCs) NADPH oksidaz bağımlı ROS üretimini azalttığı ve aynı zamanda ApoE^{-/-} farelerin aterosklerotik plaklarındaki ROS üretimini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca NADPH oksidaz altünitesi olan NOX-1 ekspresyonlarının hsp90 inhibitörleri ile azaldığı gösterilmiştir (Madrigal-Matute, Fernandez-Garcia et al. 2012).

1.1.2.5. sGC-hsp90 ilişkisi

Soluble (çözünebilir) guanilat siklazlar sGC, GC enzimlerinin bir grubudur. GTP'den GC enzimi aracılığıyla yüksek enerjili fosfat bağlarının hidrolizi sonucu ve pirofosfat (PPi) açığa çıkarılarak cGMP oluşturulur (Padayatti, Pattanaik et al. 2004; Pyriochou and Papapetropoulos 2005). sGC, α ve β olmak üzere 2 altünitesi olan dimerik yapıda "hem" içeren bir enzimdir ve yaygın bir sinyal molekülü olan nitrik oksit (NO)'in hedef proteinidir (Pyriochou and Papapetropoulos 2005). NO, hedef hücrelerde sGC hem grubuna bağlanıp cGMP yapımını aktive etmektedir.

1996'da Venema ve arkadaşları (Venema, Marrero et al. 1996), eNOS'un 90 kDA ağırlığındaki tirozin noktasından fosforillenmiş bir protein ile koekspresipite olduğunu göstermişlerdir. Daha sonraları ise bu proteinin Hsp90 olduğu ilk kez Sessa ve arkadaşlarının (Garcia-Cardena, Fan et al. 1998) purifiye proteinlerde ve sıgır mikrovasküler endotel hücrelerinde gösterilmiştir. Daha sonraları hsp90' in sadece eNOS ile değil eNOS'un ürünü olan NO reseptörü olarak kabul edilen çözünür guanilat siklaz (sGC) ile de etkileştiği ortaya çıkarılmıştır (Venema, Venema et al. 2003). Ayrıca sıçan torasik aortasında ve aortik endotelyal hücrelerde, hsp90 ve sGC'in etkileşim bölgeleri (Papapetropoulos, Zhou et al. 2005), hsp90-sGC etkileşiminin fizyolojik önemi ve hsp90 inhibitörlerinin, hem sGC hem de eNOS'a bağlı cevapları zamana bağlı geriye döndürebildiği de gösterilmiştir (Yetik-Anacak, Xia et al. 2006). Böylece hsp90'nın protein etkileşimleri ile endotelyal disfonksiyon bozukluklarında etkili olabileceği öngörülmüştür.

1.1.2.6. Diğer proteinler

eNOS aktivitesinin artışı veya NO salınımı ile ilişkili diğer proteinler intrasellüler alışveriş proteini dinamin, voltaja-bağımlı anyon/katyon kanalı porin ve NOSIPdir.

Dinamin-2; eNOS'un FAD etki alanına bağlanarak eNOS aktivitesini düzenler ve redüktaz etki alanına bağlı flavinler arasında elektron transferini teşvik eder (Cao, Yao et al. 2003).

eNOS ve porin etkileşimi, direkt ve spesifiktir ve eNOS uyaranları tarafından arttırılır (Sun and Liao 2002) ancak etki mekanizması bilinmemektedir.

NOSIP- nitrik oksit sentaz etkileşim proteininin rolü çok belirgin olmasa da, bu proteinin overeksprese olması, eNOS'un kaveolden ayrılmasını sağlamaktadır (Fulton, Gratton et al. 2001).

1.2. AMPK'nın eNOS regülasyonunda Rolü

Memelilerde, Adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK)'nin görevi yağ asidi, protein ve kolesterol sentezi gibi metabolik yolların modülasyonunu sağlamaktır. Bunun yanında hücre içine glukoz taşınması ve karaciğer ile iskelet kaslarında glikoliz mekanizmasında da rol oynamaktadır (Long YC and JR. 2006). Bu aşamalarda AMPK, hücre içi enerji sensörü olarak glukoz modülasyonu ve yağ asidi metabolizmasında görev almaktadır (Towler MC and DG 2007).

AMPK aracılıklı mekanizmanın bulunuşu 1973 yılında yayınlanan birbirinden bağımsız iki ayrı çalışma ile olmuştur. Bu araştırmalarda asetil-CoA karboksilaz (ACC) ve 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-isoprenoid (HMG-CoA) redüktazın Adenozin trifosfat (ATP) ile inkübe edilmesi sonucu inaktive olduğu rapor edilmiştir (Beg, Allmann et al. 1973; Carlson and Kim 1973). Bu yayınlarda; bulunan bu iki grubun etkinliğinin fosforilasyon sonucu ortaya çıktığı, bu fosforilasyonu sağlayan da bir protein kinaz olduğu düşünülmekteydi ki nitekim, 1987 yılında bu protein kinaz bulunarak adı AMPK olarak belirlenmiştir (Carling, Zammit et al. 1987).

AMP-aktive edilmiş protein kinaz hücre metabolizmasında regülatör rolündedir ve kolesterol biyosentezinde hız sınırlayıcı bir enzimdir. Kas hücrelerinde metabolik kontrol ve AMPK aktivitesi arasında güçlü bir ilişki olmasına rağmen, endotelial hücrelerde AMPK, shear stres, hipoksi, Ca^{2+} ile yükseltgenmiş agonistler ve adiponektin, insülin gibi hormonlarla regüle edilir (Fisslthaler and Fleming 2009).

AMPK'nın aktivasyonunun iki şekilde olduğu düşünülmektedir. Birincisi AMP'nin bağlanması sonucu AMPK'nın aktive olması (Carling, Zammit et al. 1987), ikincisi ve daha önemlisi, AMPK α alt ünitesine LKB1 kinazın bağlanarak AMPK'yı fosforile etmesidir (Woods A, Johnstone SR et al. 2003). Ayrıca AMPK'yı LKB1'den bağımsız Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı protein kinazın (CaMKK) da aktive edebildiği düşünülmektedir (Hurley, Anderson et al. 2005).

AMPK α , β ve γ alt ünitelerinden oluşan kompleks bir yapıya sahiptir ve iki farklı α isoformu ($\alpha 1$, $\alpha 2$) vardır. Her biri farklı dokularda farklı şekillerde eksprese olur. Ancak endotel hücrelerde her iki α alt ünitesi de (AMPK $\alpha 1$, AMPK $\alpha 2$ 'ye göre daha fazla) ifade edilir (Fisslthaler and Fleming 2009).

AMP-aktive protein kinazın eNOS'un fosforillenmesinde rol aldığı gerçeği ve endotel hücrelerdeki AMPK aktivitesinin, hücresel ATP düzeylerini etkileyen uyarılarla düzenlediği bilgisi gösterilmiştir (Zhang, Lee et al. 2006). Chen ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (Chen, Peng et al. 2009), farelerde eNOS'un Ser633 noktasında AMPK ile fosforillenmesi ve bunların fonksiyonel ilişkisi çalışılmıştır. Shear stres, atorvastatin ve adiponektin ile AMPK Thr172 and eNOS Ser633 fosforilasyonlarının arttırdığı gösterilmiştir. NO üretimi için eNOS Ser633 noktasında fosforillenmesi gerektiği, Nano-LC/MS/MS tekniği ile AICAR tedavisi verilen fare endotel hücrelerinde saflaştırılmış eNOS'un Ser633 ve Ser1177 noktasında fosforillendiği gösterilmiştir. Böylece AMPK'nın eNOS'u Ser663 noktasında fosforillemesi, endotel hücrelerdeki NO biyoyararlanımı için fonksiyonel bir sinyal olduğu kanıtlanmıştır.

Serin/Treonin protein kinaz Akt/PKB aracılıklı eNOS aktivasyonu ile eNOS'un fosforillenmesi ve NO üretiminin arttırdığı ayrıca Akt ile eNOS'un fosforillenmesi ,eNOS aktivasyonu için Ca^{2+} bağımlı olmayan düzenleyici bir mekanizma olduğu gösterilmiş (Dimmeler, Fleming et al. 1999).

eNOS'un maksimal aktivasyonu için Ampk'nın önemi kadar hsp90'nın da gerekli olduğu, Ampk'nın hsp90 fonsiyonu ve endotel hücre NO biyoaktivitesini değiştirdiği gözlenmiştir. Hsp90'nın eNOS ile ilişkili olduğu, dolayısı ile ER ile de ilişkili olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (Garcia-Cardena, Fan et al. 1998). Hsp90-eNOS ilişkisinde eNOS aktivasyonun arttığı, Hsp90 sinyalinin inhibe edilmesi ile agonistle indüklenen NO üretimi ve endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının azaldığı gösterilmiştir (Garcia-Cardena, Fan et al. 1998).

1.2.1. Patolojik Durumlarda AMPK

High-Runner farelerde yapılan bir çalışmada (Zhang, Lee et al. 2006), shear stres ile vasküler endotel hücrelerdeki AMPK-eNOS regülasyonu ve aortik AMPK aktivasyonu araştırılmış ve AMPK'nın eNOS'u fosforilleyen bir fizyolojik uyarıcı olduğu bilinen gerçeği desteklenmiştir. High-Runner farelerin aortasında shear stres ile endotel hücrelerdeki aortik AMPK'nın aktif hale gelerek ve eNOS'un Ser1177 noktasında fosforillendiği, dolayısı ile eNOS aktivasyonu ve NO üretiminin arttığı gösterilmiş.

Estradiol'un eNOS'u estrogen reseptor- α (ER- α), protein kinaz B/Akt, mitojen-aktivite protein kinaz ve Hsp90 içeren bir mekanizma ile aktive ettiği, metabolik stres ile hücrel adaptasyonda önemli rol oynayan bir enzim olan AMPK'nın, adiponektin ve insülin hormonları tarafından fizyolojik eNOS aktivasyonunda ilişkili olduğu bildirilmiş. Bu bilgilerin ışığı altında yapılan bir çalışmada, AMPK'nın endotel hücrelerdeki estradiol tarafından aktive edilip edilmediği ve eNOS aktivasyonunda rol oynayıp oynamadığı araştırılmış. Domuz aortik endotel hücrelerine estradiol (1 nmol/L-10mol/L, 1-30 dakika) uygulanmış, estradiol uygulamasının eNOS'un katalitik aktivitesini arttırdığı, AMPK dominant-negatif adenovirus enfekte edildiğinde ise bu aktivitenin geri çevrildiği gözlenmiş. Fakat AMPK inhibisyonunun, estradiolle indüklenen eNOS fosforilasyonunu serin 1177/treonin 495 noktalarında değiştirmedeği, Hsp90 ile eNOS etkileşimini azalttığı gösterilmiş. Bu da α 1-AMPK-null fare kan damarlarında defektif eNOS aracılı NO üretiminin estradiole cevap verdiğini gösterir. Böylece AMPK aktivasyonunun, Hsp90-eNOS etkileşiminin geliştirilmesine aracılık ederek, estradiolle indüklenen eNOS aktivasyonu için esansiyel olduğu söylenebilir. Bu bilgi AMPK'nın endotel hücrelerde NO biyoaktivitesi ve Hsp90 fonksiyonundaki modulasyonunda yeni bir rolü olduğunu gösterir (Schulz, Anter et al. 2005).

Vasküler endotelial hücrelerdeki eNOS aktivitesi (fosforilasyonu), posttranslasyonel modifikasyonlara göre değişim gösterdiği gibi AMPK aktivitesi de Tip 2 diyabet ve hiperkolesterolemi gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde rol oynayarak tedaviye bağılı değişim gösterir (Chen, Peng et al. 2009).

1.3. Endotelial Disfonksiyon

Endotelial disfonksiyon, endoteliumun normal fonksiyonlarının, azalmış vasodilatasyon, inflamasyon ve tromboz yönüne kayması olarak karakterize edilir. Bu bozukluk, hipertansiyon, koroner arter hastalığı, kronik kalp yetmezliği, periferik arter hastalığı gibi kardiyovasküler hastalıkların bir çoğunda görüldüğü gibi, diyabet ve kronik böbrek yetmezliğinde de görülür (Endemann and Schiffrin 2004). Bu bozulma, endotel kaynaklı faktörlerin sentezlenmesinde, yararlanımındaki ve etkisindeki azalma ile karakterizedir ve endotel kaynaklı gevşemelerin azalması ve vazokonstriktör agonistlere verilen yanıtın artışıyla sonuçlanır.

Hücrelerde NO'nun üretiminde veya etkinliğinde bir bozuklukla seyreden NO dengesindeki değişiklikler birçok patofizyolojik sürece katkıda bulunmaktadır. NO'nın yıkımı ve sentezi arasındaki dengenin bozulması, ateroskleroz, esansiyel ve pulmoner hipertansiyon, diyabetik anjiyopati, septik şok, inflamasyon, nörotoksisite, konjestif kalp yetmezliği, kanser, gibi çeşitli kardiyovasküler bozukluklara yol açmakta ve böylece endotelial fonksiyon bozulmaktadır.

Endotelial disfonksiyon, hiperkolesterolemiye sekonder gelişen ateroskleroz patolojisinde de önemli bir risk faktörüdür. Hipertansiyon, ateroskleroz ve erektil disfonksiyon endotelial hasarın bulunduğu en belirgin patolojik durumlardır. Hipertansif hastaların damar sistemlerinde shear stres ve agonistlere bağılı endotel kaynaklı vasodilatasyonun azaldığı ve vazokonstriktör ajanlara olan hassasiyetin arttığı gözlemlenmiştir. NO biyoyararlanımının azalması, hipertansiyondaki en temel sebeptir. Bu azalmanın nedenleri, eNOS üzerindeki Ser1177 üzerindeki

fosforilasyonunun bozulması, eNOS substratlarının ya da kofaktörlerinin, özellikle BH₄ seviyelerinin düşüşü, eNOS/kaveolin arasındaki etkileşimin, antioksidan sistemin korumasının azalması ve buna bağlı olarak artan reaktif oksijen türlerinin (ROS), NO üretiminin azalması olarak sıralanabilir (TürkFarmakolojiDerneği 2005).

Sağlıklı koroner arterlerde, endotele bağlı gevşeme baskındır. Endotel hasarının varlığında, endotele bağlı gevşeme cevabı azalırken kasılma baskın hale geçer. NO'un biyoyararlanımının azalması, aterosklerozun başlangıcında ve komplikasyonların ilerlemesinde rol oynar. eNOS tarafından üretilen NO, trombosit agregasyonunu azaltır, lökosit adhezyonunu ve düz kas proliferasyonunu engelleyerek aterosklerozdan korunmayı sağlar (TürkFarmakolojiDerneği 2005).

Ludmer ve arkadaşları (Ludmer, Selwyn et al. 1986), şiddetli KAH hastalarındaki gibi orta şiddet koroner arter hastalığı (KAH) olan hastaların arterlerinde de kasılma olduğunu bildirmişlerdir. Bu da, endotelyal disfonksiyonun, aterosklerozun erken dönemlerinde bile varlığını göstermektedir. Endotel disfonksiyonu, aterosklerozun yapısal değişikliklerinden önce oluşur ve gelecekteki kardiovasküler olayları öngörmeye yardım eden bağımsız bir faktördür.

Endotel fonksiyon bozukluğunda, endotelyal nitrik oksit sentaz aktivitesinin azalmasının nedenlerinden biri peroksinitrit artışıdır. NO ile serbest oksijen radikallerinin reaksiyona girmesiyle oluşan ve sitotoksik oksidan olan peroksinitrit, endotel disfonksiyonuna yol açar. Bu etkisini proteinlerin nitrasyonu yoluyla hücresel proteinlerin fonksiyonunu bozarak gösterir. Aynı zamanda, LDL'nin oksidasyonuna yol açarak proatrogenik rol oynar. Peroksinitrit, eNOS'un kofaktörü olan tetrahidrobiopterin ile etkileşerek enzimin aktivitesini azaltır. Oksidatif stres artışı eNOS enziminin redüktaz fonksiyonunu aktif hale getirir ve daha fazla serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Bu da damar duvarında proinflamatuvar olayları başlatır ve serbest oksijen radikallerini, adezyon moleküllerini (VCAM-1 ve ICAM-1) ve kemotaktik molekülleri (makrofaj kemotaktik peptid; MCP-1) artırır.

İnflamasyonun başlaması NO'nun aktivitesini azaltır. C reaktif proteinin de eNOS aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Endemann and Schiffrin 2004).

Diyabetteki anormal vasküler reaktiviteye NO'nun serbest oksijen radikalleri tarafından inaktivasyonunun aracılık ettiği bildirilmiştir (Li and Forstermann 2000). Gene Tip II diyabeti olan hastalarda oluşan endotelial disfonksiyon ve NO yerine süperoksit salınımı ve oluşan endotelial fonksiyon bozukluğunun folik asit tedavisi ile giderildiği gösterilmiştir (van Etten, de Koning et al. 2002).

Hipertansiyonda arteriyoller düz kasta hipertrofi gelişmekte, dolayısıyla damar düz kas hücresi / endotel hücresi oranı düz kas hücresi lehine artmaktadır. Bu nedenle gerek hipertansif hayvan modellerinde, gerekse de esansiyel hipertansif hastalarda asetilkolin, bradikinin, P maddesi, kalsiyum iyonofor gibi NO salıveren uyarılara karşı yanıt azalmakta, ancak nitrovazodilatörler gibi endotelden bağımsız olarak gevşeme sağlayan ajanlara yanıt değişmemektedir (Schulman, Zhou et al. 2006). Esansiyel hipertansif bireylerin normotansif çocuklarında nitrik oksit üretimindeki bir bozuklukla ilişki olarak asetilkolin yanıtlarının azaldığı, dolayısıyla esansiyel hipertansiyonda endotel yanıtı bozukluğunun genetik kökenli olduğu düşünülmektedir (Taddei, Virdis et al. 1996).

Hipertansiyonda NO üretimindeki bozukluk, genellikle substrat yetersizliğinden çok, sentez bozukluğu ve yıkım fazlalığı yönündedir. Hipertansif sıçanların torasik aortalarında erken evrede paradoksal bir şekilde gözlenen eNOS ekspresyonu ve NO üretimindeki artışa rağmen NO'ya verilen vazodilatatör yanıtta azalma görülmesi NO'nun süperoksit anyonu tarafından oksidasyonu ve yıkımı ile açıklanmıştır (Ulker, McMaster et al. 2003).

Hipertansif hastaların damar sistemlerinde asıl olay shear stres ve agonistlere bağlı endotel kaynaklı vasodilasyonun azalması ile NO biyoyararlanımının azalmasıdır. Bu azalmanın nedenleri, eNOS üzerindeki Ser1177 üzerindeki fosforilasyonunun bozulması, eNOS substratlarının ya da

kofaktörlerinin, özellikle BH₄ seviyelerinin düşüşü, eNOS/kaveolin arasındaki etkileşimin artması, antioksidan sistemin korumasının azalması ve buna bağlı olarak artan reaktif oksijen türlerinin (ROS), üretilen NO'yu azaltması olarak sıralanabilir.

İnflamasyon, hasar verici stimuluslara karşı organizmanın verdiği yanıtları içeren dinamik olaylar zinciridir. İnflamasyon alanında vazodilatasyonu takiben kan akımı değişiklikleri, vasküler geçirgenliğin artışı, ödem sıvısı oluşumu, lokal lökosit birikimi gözlenir. Lewis'in üçlü cevabına göre; dokunun künt travmaya maruz kalması ile açığa çıkan histamin doğrudan doğruya lokal kan damarlarına etki ederek saniyeler içerisinde kızarıklık, travmanın yakın çevresine yayılan sıcaklık ve 2-3 dakika içinde vasküler geçirgenliğin artışına bağlı olarak oluşan lokal ödem gelişimine neden olur. Birbirini takip eden bu olayların gelişiminden çeşitli mediyatörler sorumludur. NO, bu mediyatörlerden biridir. Vazodilatasyon, vasküler geçirgenlikteki değişim, ekstrasvazasyon, lökosit migrasyonu ve aktivasyonu gibi inflamasyonla beraber seyreden olaylarda NO önemli rol oynamaktadır (Coleman 2001).

Kronik inflamasyon, fibroblast ve küçük kan damarlarının proliferasyonu ve lenfosit, makrofajlar gibi kronik inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile karakterizedir. Kronik inflamasyon, bütünüyle immün sistem hücreleri ile yönetilmesi nedeni ile akut inflamasyondan ayrılır. Romatoid artrit, osteoartrit, vaskülit ve sistemik lupus eritematozus gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda iNOS kaynaklı NO'nun rolü ortaya konmuştur (Suschek, Schnorr et al. 2004).

NO'nun fizyolojik etkisi esasında koruyucu ve antiinflamatuvar yöndedir. Ancak yüksek miktarlarda salıverildiği zaman ve ortamın redoks ya da oksijenasyon durumuna bağlı olarak peroksinitrit oluşumu üzerinden moleküler hedeflerin nitrozilasyonu/nitrasyonuna neden olabilir (Moncada 1992).

1.4. Endotelyal disfonksiyonda Hsp90'nın Rolü

eNOS-Hsp90 etkileşiminin önemi, portal ven ligasyonu (Shah, Wiest et al. 1999) ve inflamasyon (Bucci, Roviezzo et al. 2005) modellerinde yapılan in vivo çalışmalarla da ortaya konmuştur. Portal hipertansif sıçanlarda mezenterik dokuda eNOS protein düzeylerinin kontrol grubuna göre farklı olmadığı, ancak eNOS aktivitesinin anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Artmış eNOS aktivitesine bağlı olarak vazokonstriktör ajan olan metoksamin'e karşı yanıtta azalma olduğu, geldanamisin'in ise metoksamin ile indüklenen vazokonstriksiyonu potansiyalize ettiği görülmüştür. Bu bulgular mezenterik mikrosirkülasyonda NO-bağımlı yanıtlarda Hsp90'nın rolünü ortaya koymaktadır (Shah, Wiest et al. 1999) . In vivo inflamasyon modelinde yürütülen çalışmalarda geldanamisinin inflamasyonu doz bağımlı olarak inhibe ettiği ve inhibitör etkinliğin streoidler kadar güçlü olduğu gösterilmiştir (Bucci, Roviezzo et al. 2005). Geldanamisinin NO salınımını azaltması ve NOS inhibitörlerinin ödem oluşumunu azaltıcı etkilerinin bilinmesi, Hsp90'nı spesifik olarak inhibe edecek moleküllerin geliştirilmesi durumunda bunların antiinflamatuvar olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Fulton, Gratton et al. 2001).

Günümüzde pulmoner hipertansiyon, sepsis, orak hücreli anemi gibi bazı patolojik durumlarda Hsp90-eNOS etkileşimi pek çok bilim adamı tarafından hızla araştırılmaya başlanmıştır (Jayachandran and Miller 2002; Murata, Sato et al. 2002; Pritchard, Ou et al. 2004; Chatterjee, Snead et al. 2008; Oishi, Wiseman et al. 2008). Aterosklerotik hastaların plaklarında hsp90 ekspresyonun arttığı ve bunun plak instabilitesi ile ilişkili olduğu ve hsp90 inhibitörlerinin vasküler düz kas hücrelerinin (VSMC) migrasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Kim, Jang et al. 2014).

Diyabetik olmayan ve streptozotocin (STZ) ile uyarılmış diyabetik sıçanlarda STZ'nin hsp90β ekspresyonlarını arttırdığı gözlemlenmiştir (Atalay, Oksala et al. 2004). Bu da diyabetin Hsp90 korunmasını bozmasının transkripsiyonel aracılığı

mekanizmalar aracılığı ile olduğunu düşündürmektedir. Diyabette insülin direncinin ısı şoku proteinler ilişkisi ilgi çeken bir araştırma konusudur.

Pulmoner hipertansif bozuklukları patofizyolojisinde, endotelial disfonksiyon regülasyonun önemi çok fazladır. Hipertansif bozukluklarda NO üretimi azalırken ve eNOS aracılı süperoksit üretiminde artış gözlenir. NO üretimi artışı ve eNOS tarafından süperoksit üretiminin inhibisyonunda Hsp90'nın önemli bir rolü olduğu pulmoner arter endotel hücreleri (PAECs) izole edilmiş pulmoner hipertansiyonlu 4 haftalık yavru ve fetal kuzularda yapılan bir çalışmada (Sud, Sharma et al. 2007) gösterilmiştir. Hsp90 miktarının artırılması ile (hsp90'nın overekpress edilmesi) NO üretimini ve uyarılmamış eNOS-hsp90 ilişkisinin arttığı ve süperoksit üretiminin azaldığı gösterilmiş. Hsp90 inhibitörü radicicol tedavisi ile pulmoner kan akışı artarak pulmoner hipertansiyonlu kuzularda eNOS-hsp90 etkileşiminin azaldığı, eNOS tarafından süperoksit radikali üretilmesine neden olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma sonucu, uyarılmış hsp90 aktivitesinin pulmoner hipertansiyon tedavisi için potansiyel bir terapötik bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir (Sud, Sharma et al. 2007).

1.4.1. Aterosklerozda Hsp90

Aterosklerotik hastaların plaklarında hsp90 ekspresyonun arttığı ve bunun plak instabilitesi ile ilişkili olduğu ve hsp90 inhibitörlerinin vasküler düz kas hücrelerinin (VSMC) migrasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Kim, Jang et al. 2014). Gene başka bir çalışmada da benzer şekilde karotid aterosklerosis patogenezinde, hastaların plaklarında ve serumlarında hsp90 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Businaro, Profumo et al. 2009).

Ancak hiperkolesterolemik tavşan modeli gibi deneysel hayvan ateroskleroz modellerinde hsp90 proteininin rolü hala netleşmemiştir. Yakın zamanda hsp90'nın ateroskleroz gelişiminde rolünü netleştirmek için yapılan bir çalışmada (Kim, Jang et al. 2014), düşük yoğunlukta lipoprotein reseptör (LDLR) eksik olan fareler 4 hafta

yüksek kolesterol diyeti ile beslenmiş ve 8 hafta hsp90 inhibitörü olan 17-AAG uygulanmıştır. Hsp90 inhibisyonu, yüksek kolesterolü diyetle uyarılmış LDLR (-/-) farelerindeki ateroskleroz plak lezyonlarının içindeki VSMC migrasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Hsp90 inhibisyonu, VSMC migrasyon ve proliferasyon baskılanması yolu ile aterosklerotik plak oluşumunu azaltmıştır.

Hiperlipidemik insan örneklerinden serum elde edilerek insan endotel hücrelerinin elde edildiği bir çalışmada ise (Ivan and Antohe 2010), elde edilen hiperlipidemik endotel hücrelerinin lipoproteinlere geçirgen hale gelerek zamanla lipid damlacıklarıyla dolduğu ve bazal karakteristiklerinin değişerek endotel kökenli sünger hücrelerine dönüştüğü gösterilmiştir. Böylece hiperlipidemik bu hücrelerde adezyon moleküllerinin (VCAM-1, VLA-4) ifade edilerek, intraselüler Ca^{+2} salınımı ve hsp90 proteininin arttığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada da, eNOS ile etkileşimde olduğu düşünülen hsp90 proteininin, hiperkolesteromiye bağlı gelişen endotel disfonksiyondaki eNOS aktivasyonunun azalmasına katkıda olabileceği düşünülmüştür.

Hsp90 proteinlerinin sentez ve/veya hücre dışına salgılanmasındaki artışta aterosklerozun önemi büyüktür. Ateroskleroz patogenezinde rol alan, önemli bir risk faktörü olan serbest oksijen radikallerinin, endotel hücreleri damar düz kas hücreleri (VSMC) tarafından üretiminin artırıldığı gösterilmiş ve bu damar düz kas hücrelerinde çoğalmaya paralel olarak, Hsp90 proteinlerinin sentez ve/veya hücre dışına salgılanmasında da artışa neden oldukları gösterilmiştir (Liao, Jin et al. 2000).

Ateroskleroz tedavisinde statinlerin hsp90 üzerinden eNOS'a bağımlı nitrik oksit (NO) üretimini etkileyerek endotele bağımlı gevşeme cevaplarını ve ateroskleroz gelişim sürecini etkileyip etkilemediği henüz araştırılmamıştır.

1.5. Endotelyal Disfonksiyonda Kaveolin'in Rolü

Kaveolin-1 knockout farelerden izole edilen aortaların vazokonstriktör ajanlara olan yanıtlarında anlamlı bir azalma, buna karşılık endotel-aracılıklı bir vazodilatatör olan asetilkoline yanıtlarının anlamlı düzeyde arttığı bildirilmiştir. Her iki etkinin de NOS inhibitörü L-NAME varlığında geriye döndüğü gözlenmiştir

(Drab, Verkade et al. 2001; Razani and Lisanti 2001).

Penil dokuda Kaveolin ekspresyonları farklı deneylerde farklı sonuçlar göstermektedir. Endotelyal disfonksiyonun bozulduğu, yaşlanma ve diabetes mellitus sıçan penisinde yapılan bir çalışmada da Kaveolin-1 ekspresyonunun yaşlılarda gençlere göre azaldığı, eNOS ekspresyonunun ise arttığı gösterilmiştir (Bakircioglu, Sievert et al. 2001). Erektile fonksiyonun bozulduğu başka bir çalışmada, 4 ay %1 kolesterolle beslenen hiperkolesterolemik sıçanlarda Kaveolin-1 ekspresyonunun arttığı, eNOS ekspresyonunun değişmediği gösterilmiştir (Bakircioglu, Hsu et al. 2000) .

Tip 2 Diyabette, insulin, insulin reseptörlerine bağlanarak otofosforilasyon ile başlayıp, insulin reseptör substrat (IRS) ailesinin fosforilasyonu ile devam eden bir fosforilasyon kaskatını uyarır. İnsulin reseptörlerinin kaveolin-bağlanma noktasının olduğunun gözlemlenmesi kaveola ve kaveolinlerin insulin sinyalizasyonunda rolü olabileceğini düşündürmüştür. Kaveolin-1 ve -3'ün insulin reseptör kinaz aktivitesini güçlü bir şekilde stimüle ettiği gözlenmiştir. Adipositlerin kolesterolünün depleksyonu, kaveolanın yapısını değiştirmenin yanı sıra insulin stimülasyonuna karşı verilen yanıtta da anlamlı düzeyde azalmaya neden olmuştur. Kaveolin-1 knockout farelerde diyabet gelişimi gözlenmemiştir. Ancak bu farelerde insulin rezistansı söz konusudur. 9 ay süre ile yüksek oranda yağ içeren diyetle beslenen kaveolin-1 knockout farelerde postprandial hiperinsulinemi gözlenmiştir. Ayrıca, bu hayvanlarda adipoz dokuda insulin reseptör proteini ekspresyonunda anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir. Kaveolin-1 ve -3'ün genetik kaybının diyabet gelişimine neden olduğu

yönünde direkt bir bulgu elde edilmemiştir. Ancak kaveolinlerin insulin sinyalizasyonu ve insulin rezistansının patofizyolojisinde önemli bir rol üstlendiği gözlenmiştir (Ishikawa, Otsu et al. 2005).

Hipertansiyon patolojisinde, Kaveolin-1 sentezi artarak eNOS'u inaktive eder ve NO üretimini azaltır. NO üretimindeki azalma ateroskleroz gelişimine veya komplike olmasına yol açan olayların artması ile sonuçlanır (Endres, Laufs et al. 1998).

Sıçanlarda hipoksi ile uyarılmış pulmoner hipertansiyonda fluvastatinin sıçan akciğerlerinde cGMP üretimini azalttığı, pulmoner arterde endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını düzenlediği gösterilmiştir. Bu yararlı etkinin protein ekspresyonu veya eNOS mRNA artışına bağlı olmadığı, kaveolin-1 ile eNOS inhibisyonuna ve hipoksi ile hsp90 aracılığıyla olarak eNOS fosforilasyonunun azalmasına bağlı olduğu gösterilmiştir (Murata, Kinoshita et al. 2005).

1.5.1. Aterosklerozda Kaveolin

Ateroskleroz oluşumunun ana mekanizmalarından biri LDL'nin oksidasyonu olarak kabul edilmektedir. Kaveolin-1'in aterosklerotik lezyon progresyonundaki rolünü aydınlatmak amacıyla, Apo E knockout hayvanlar ilave olarak kaveolin-1 knockout hale getirilmiştir (double knockout). Bu hayvanlarda proaterojenik lipid profili gözlenmiştir. Bu profil Apo E knockout hayvanlarda da benzerlik göstermektedir. İlginç olarak proaterojenik lipid profiline rağmen , kaveolin-1'in kaybı lezyonda % 80 oranında azalma sağlamıştır. Bu bulgu kaveolin-1'in LDL aracılığıyla vasküler disfonksiyonu, inflamasyonu ve lezyon progresyonunu regüle ettiğini göstermektedir. Araştırmacılar bu durumun makrofajlardaki okside LDL reseptörleri olan CD36 reseptörlerinin stabilitesinin azalması ve endotel kaynaklı NO üretimindeki artıştan kaynaklanabileceği bildirilmektedir (Graf, Matveev et al. 1999; Frank and Lisanti 2004; Gratton, Bernatchez et al. 2004).

Zhu ve arkadaşları, %3 kolesterol ve %0.5 kolik asit tuzu içeren diyetle 12 hafta beslenen sıçanların aortalarında Kaveolin-1 ekspresyonlarının normokolesterolemik sıçan aortalarına göre anlamlı düzeyde arttığını ve eNOS ve Kaveolin-1'in aorta duvarlarında yakın etkileşimde olduğu göstermişlerdir (Zhu, Li et al. 2013).

24 hafta kolesterolce zengin diyetle beslenen domuzların penisinde (Musicki, Liu et al. 2008), kaveolin-1/eNOS oranının normal diyetle beslenenlere göre anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir. Kolesterolce düşük diyet ve kronik egzersiz tedavisinin endotelial disfonksiyonu önlediği ve eNOS-Kaveolin-1 etkileşimini sınırladığı gösterilirken, zengin kolesterol diyeti ve kronik egzersizin ise eNOS-Kaveolin-1 etkileşiminin azalttığı, eNOS ve Kaveolin-1 ekspresyonlarının ise değiştirmedeği gösterilmiştir. Bu çalışma hiperkolesterolemik peniste eNOS ve Kaveolin-1 arasındaki artan etkileşimin eNOS aktivasyonunu önleyerek endotelial disfonksiyona neden olduğunu destekler niteliktedir (Musicki, Liu et al. 2008).

1.5.2. Fizyolojik Durumda Kaveolin

Glikosfingolipid, sfingomiyelin ve kolesterolce zengin plazma membranında lipid yığınlarının bir alt kümesi olan kaveollerde, esas protein Kaveolin-1'dir (Zager RA, Johnson A et al. 2002). Kolesterol, kaveolalar içerisindeki kaveolin-1 proteinine bağlı halde bulunur (Murata, Peranen et al. 1995). Kaveolinler hem kolesterolü membrana bağlı tutarlarken (Murata, Peranen et al. 1995) hem de Kaveolin-1 kaveola içerisindeki G proteinleri, nitrikoksit sentaz, epidermal büyüme faktörü ve protein kinaz C gibi diğer proteinlerle direkt ya da indirekt yollarla etkileşerek sinyalizasyonlarını pozitif ya da negatif bir şekilde düzenlemektedir (Insel, Head et al. 2005). Kolesterolün uzaklaşması ile bu enzimler aktif hale gelerek, kalsiyumun hücre içine girmesine olanak sağlanmış olunur. Bu enzim aktivasyonları ortamda serbet kalsiyum miktarı düşünceye kadar devam eder.

Kaveolin proteinlerinin kaveolin-1, kaveolin-2 ve kaveolin-3 diye isimlendirilen 3 izoformu bulunmaktadır. Cav-1, birçok kas olmayan hücre tiplerinde kaveol oluşumu için, Cav-2 membran lokalizasyonu için, Cav-3 ise çizgili (iskelet ve kardiyak) düz kas hücreleri içinde kaveol oluşumu için gereklidir (Ostrom and Insel 2004).

1.6. Ateroskleroz

Aterosklerotik damar hastalığı erişkinlerde en önemli mortalite ve morbidite nedenidir. Ateroskleroz gelişiminde sigara, alkol, şişmanlık, diyabet, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, inflamasyon, mekanik stress gibi birçok etmen rol alır. Hiperkolesterolemi gibi hiperkolesteromiye sekonder gelişen endotel disfonksiyonu da ateroskleroz patolojisinde önemli bir risk faktörüdür.

1.6.1. Ateroskleroz patolojisi ve intimal kalınlaşma

Ateroskleroz, atardamarları (arterleri) etkileyen, multifaktöriyel, gelişimi heterojenite gösteren, başlangıçtan progresyona kadar her basamağında kronik enflamasyonun rol aldığı ve çeşitli risk faktörünün altta yatan enflamatuvar süreci hızlandırarak patogeneze katkıda bulunduğu bir hastalıktır (Sary, Chandler et al. 1995).

Özellikle koroner arterde, aortada ve serebral arterde gelişim gösteren ateroskleroz, arteriyal intimanın kronik bir hastalığıdır ve ileri döneminde arterlerde aterom (plak) olarak adlandırılan yapısal bozukluklar oluşur (Sary, Chandler et al. 1995).

Aterosklerozun erken döneminde, kolesterol ve satüre yağdan zengin aterojenik diyetle ilgili olarak küçük lipoprotein partikülleri intimada birikir. Bu lipoprotein partikülleri arteriyel intimanın proteoglikanını oluşturur ve agregatlar halinde birleşme eğilimindedirler. (Camejo, Hurt-Camejo et al. 1998; Williams and Tabas 1998). Lökosit adezyon molekülleri; aterom içinde toplanan vasküler hücre adezyon

molekölü (VCAM-1), intersellüler adezyon molekülü (ICAM-1) ve E-selektinler (endotelyal selektin) erken aterogenezde önemli belirteçlerdir (Ley 2003).

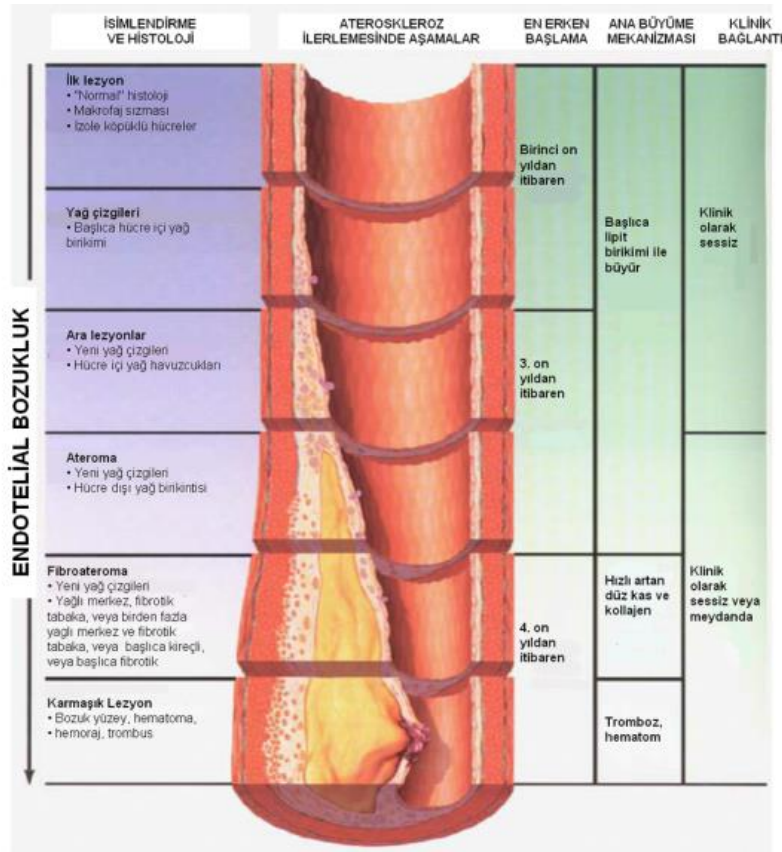
Orta ve büyük çaplı arterlerin intima ve mediasında önce endotelyal fonksiyon bozuklukları ile başlayan ateroskleroz daha sonra aterosklerotik plak gelişimi ile ilerler (Fuster, Badimon et al. 1992). İlerlemiş aterosklerotik lezyonda üç temel biyolojik olay;

1-İntimada düz kas hücreleri , makrofaj ve T-lenfositleri birikimi

2-çoğalan düz kas hücreleri tarafından kollajen, elastik lif ve proteoglikanlar içeren konnektif doku matriksinin bol miktarda yapılması

3- konnektif doku çevresinde ve hücre içinde özellikle kolesterol ester ve serbest kolesterol tarzında lipid birikimidir

Hiperkolesterolemi gibi aterojenik uyarılara maruz kalındığında, düz kas hücreleri aterosklerozun kompleks plaklar haline dönüşümünde rol alarak, endotelyuma yapışır ve endotel hücreleri arasından subintimal alana geçerek burada birikirler. Burada kolesterol lipoproteinlerin alınımı ile lipidler (yağlı izler) birikmeye başlar, köpük hücreleri oluşur ve fibröz plaklar gelişerek büyür (Spronk, van der Voort et al. 2004). Komplikasyonlardan sorumlu olan esas lezyonlar bu plaklardır. Başlıca komplikasyonlar; trombus gelişimine yol açan endotel disfonksiyonu, anevrizma, sekonder kalsifikasyon gelişimi veya arterde stenoz ve buna bağlı olarak akut veya kronik iskemik hastalık ve fonksiyon bozukluklarının gelişmesidir (Spronk, van der Voort et al. 2004).



Resim 1.1. Ateroskleroz gelişim aşamaları. Stary HC ve ark.'dan uyarlanmıştır (Stary, Chandler et al. 1995).

Aterosklerotik lezyonlar, arterin intima ve altında fokal kalınlaşmalar olarak görülür. Kalınlaşan bölgenin içeriğine bakıldığında vasküler endotelial hücreler, düz kas hücreleri, bağ dokusu ile lipidlerin yanı sıra kandan gelen enflamatuvar ve immün hücrelerin de bulunduğu görülür. Ateroskleroz patolojisinde arter damarlarında hücrelerin (özellikle monosit türevi makrofaj gibi lökositler) ve değişime uğramış lipoprotein birikmesine paralel olarak arter yapısı değişime uğrayarak damarların lümeni tıkanır ve normal kan akımı engellenir. Bunu izleyen yangı (enflamasyon), arterin intima tabakasında aterom plaklarının oluşumuna yol açar. İntima, damarda endotel ile media ve adventitia arasındaki kısımdır. Bu plaklar aşırı yağ, hücreler, kollajen ve elastinden oluşur. Lümen diye adlandırılan arter boşluğunda başlangıçta herhangi bir daralma (stenoz) oluşturmazlar.

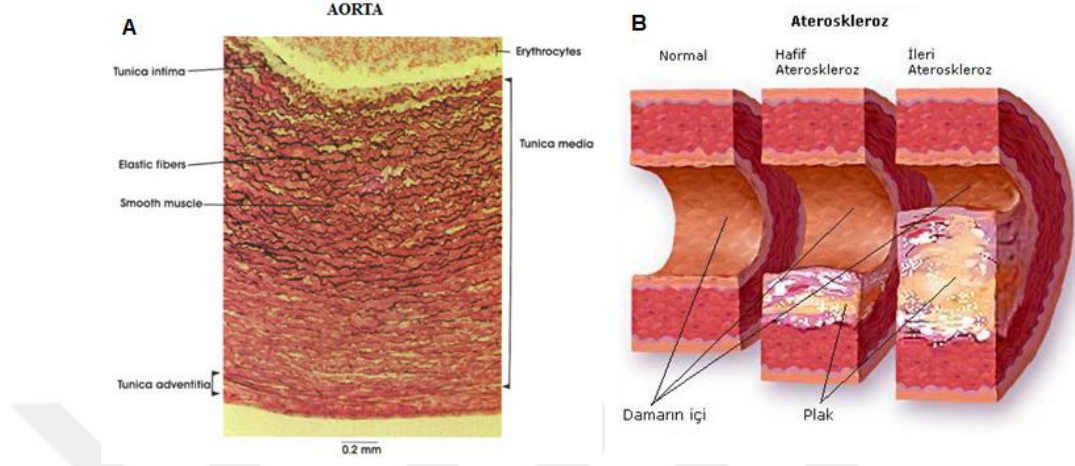
Normal bir ater yapısı 3 tabakadan oluşmaktadır; tunika intima, medya ve adventisya.

Tunika intima: En içteki tabaka olup, bazal laminaya bitişik olan endotel hücrelerinden oluşmuş tek sıralı bir yapı olarak tanımlanır. Erişkin insan intiması gerçekte çok daha kompleks heterojen bir yapıya sahiptir. Arteriyel endotelyal hücreler, arteriyel hastalıkların patogenezi sırasında ters giden olayları düzenleme ve vasküler homeostazı sağlamada çok önemli bir role sahiptir. Hiperkolesterolemi diyabet ve yaşla birlikte intima tabakası arterlerde arteriyel düz kas hücreleri ve interstisyel kollajenin fibriler formlarını (tip I ve III) içeren daha karmaşık hal alır. Düz kas hücreleri arteriyel intimanın öğelerinden olan ekstraselüler matriksi üretir. Kolesterolce zengin diyetle bağlı olarak küçük lipoprotein partikülleri intimada birikir. Bu lipoprotein partikülleri arteriyel intimanın proteoglikanını oluşturur ve agregatlar halinde birleşme eğilimindedirler.

Tunika medya: Eksternal ve internal elastik lamina arasında uzanır. Elastik lifler ve düz kaslardan oluşur. Musküler arterlerin mediası genellikle daha az stereotipik organizasyon içerir. Küçük arterlerin düz kas hücreleri genellikle laminar sıradan çok, kendilerini çevreleyen matriks içine gömülüdürler. Normal arterlerdeki düz kas hücreleri nadiren prolifer olurlar. Aslında hücrenin bölünme hızı ve hücre ölümü normal şartlar altında oldukça yavaştır. Normal arterde ekstraselüler matriks denge halindedir. Çünkü ekstraselüler matriks ne birikir ne de atrofiye olur. Arteriyel matriks sentez hız ve ölümü genellikle bir diğerinin dengesine bağlıdır.

Tunika adventisya: Arterler adventisyasının, arteriyel homeostazis ve patolojideki potansiyel rolleri incelenmektedir. Adventisya, vasküler remodeling ve nitrik oksit (NO) bioaktivitesinin kontrolü üzerinde, reaktif oksijen türlerinin oluşumu nedeniyle önemli bir rol oynamaktadır. Adventisya, genellikle intimadan daha az oranda kollajen lifleri içerir. Vazo vazorum ve sinir uçları arteriyel duvarın bu en dıştaki tabakasında yerleşmiştir. Adventisya diğer arteriyel tabakalardan daha farklı

bir hücresel popülasyona sahiptir. Bu tabakada görülen hücreler temelde fibroblastlar ve mast hücreleridir.



Resim 1.2. A. Tavşan normal aorta yapısı (50x), Ronald A. Bergman ve ark.'dan uyarlanmıştır (Ronald A. Bergman, Adel K. Afifi et al. 1999). **B.** Damarlardaki ateroskleroz sonucu oluşan plaklar.

Ateroskleroz patolojisi hakkındaki yoğun çalışmalar sonunda ateroskleroz gelişimi ile ilgili en popüler hipotezler "hasara yanıt" ve "oksidatif stres" dir . Normal durumda serbest radikaller (reaktif oksijen türleri) vücudumuza giren besinlerin oksijen kullanarak enerjiye çevrilmesi sırasında oluşur. Kararsız yapıda olan bu serbest radikaller kararlı hale gelebilmek için hücrelere saldırarak hasar oluştururlar. Hücrelerdeki bu serbest radikal artışı oksidatif hasarlara yol açarak, oksidatif stres oluşturur. Ateroskleroz gibi patolojik durumlarda, oksidan stres artmıştır ve NO üretimdeki azalmayla beraber, süperoksit düzeyinde artma gözlenmektedir. NO'nun oksidatif stres durumunda hücre hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Wink, Hanbauer et al. 1993) .

1.6.2. Deneysel ateroskleroz modelleri :

Aterosklerozun patojenezini araştırıp, tedavi yolları geliştirebilmek için çeşitli in vitro ve in vivo deneysel hayvan modelleri tasarlanmıştır.

Erken ateroskleroz modeli:

Sadece intimal kalınlaşmanın olduğu ve plakların henüz gelişmediği erken ateroskleroz yaka modeli ile oluşturulabilmektedir. Booth ve arkadaşları 1989 yılında tavşan karotid arteri çevresine biyolojik olarak inert, esnek bir silikon yaka yerleştirerek bunun intimal kalınlaşmaya neden olduğunu göstermişlerdir (Booth, Martin et al. 1989).

Genetik ateroskleroz modelleri:

Sıçanların hiperkolesterolemi ve lezyon gelişimine olan nispi dirençleri ve yüksek mortalite oranları nedeni ile birçok araştırmacı tarafından ateroskleroz araştırmalarında kullanılmamaktadır. Sonrasında gelişen genetik manipülasyonlar ateroskleroz çalışmaları açısından bir çok imkan sunmuş olsa da kemirgenlerdeki modeller hala daha değişik lipoprotein profilleri ve belirgin derecede küçük damar büyüklükleri nedeniyle model oluşturmada zorluk yaratmaktadır. Dahası, balon kateterizasyonu gibi belirli cerrahi müdahaleler kemirgenlerin arterlerinde başarılı olarak uygulanamamaktadır. Sıçanlarda oluşturulan deneysel ateroskleroz modelleri gelişmiş ateroskleroz değil aterogenez modelleridir. Bu nedenle, insanlardaki ateroskleroza dair damar oklüzyonuna neden olan plak yırtılması gibi tek bir spesifik olaya bile sıçanlarda rastlanmamaktadır.

Son dönemde yapılan genetik çalışmalarda hızlı ve çok amaçlı bir metod olan vektör enjekte edilmesi ile kemirgenlerde de ateroskleroz modelleri oluşturulabilmiştir. Örneğin, 12 hafta kolesterolce zengin diyetle beslenen farelere PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) (Maxwell and Breslow 2004)

vektörü enjeksiyonunun total kolesterolü ve fare aortasında, aterosklerotik lezyon oluşumu artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca Golden Syrian hamsterlarda da plazma enjeksiyonu ile erken dönem ateroskleroz ve hiperkolesterolemi oluşturularak aterosklerotik model oluşumu gösterilmiştir (Bjoerklund MM, Hollensen AK et al. 2014).

Ateroskleroz hayvan modeli oluşturmak için *Apolipoprotein E* (ApoE) knockout farelerin aortaları izole edilerek formalin ile fix edilmiş ve aterosklerotik plak oluşumu gösterilmiştir (Kausar, da Cunha et al. 2000). Bunun da ötesinde 16 hafta Western-tipi diyet ile beslenen farelerde eNOS'un genetik olarak defektinin de aortada aterosklerotik komplikasyonlarını arttırdığı dolayısı ile aterosklerotik bir model oluşturulduğu gösterilmiştir (Kuhlencordt, Gyurko et al. 2001).

Hiperkolesterolemiye dayalı ileri ateroskleroz modeli:

İnsanlarda ateroskleroz gelişiminin etiyolojisi ile ortaklıklar taşıdığı için tavşanlarda kolesterolle beslenmeye dayalı ateroskleroz modeli deneysel ateroskleroz araştırmaları için yaygın olarak kullanılan bir modeldir.

1908'de Ignatowski tavşanların hayvansal gıdalarla (et, süt, yumurta sarısı) beslenmesi ile oluşturulan deneysel ateroskleroz oluşumunun aşırı protein miktarına bağlı olarak gelişebileceğini önermiştir (Kritchevsky 1995). 1913 yılında ise Anitschkow ve Chalataw tavşanların kolesterolle beslenmesinin kandaki kolesterol seviyesinin arttırdığını ve tavşan arterial intimasındaki değişimlere neden olduğunu, bunun insanlarda görülene benzer şekilde, ateroskleroza neden olabileceğini göstermiştir (Finking and Hanke 1997). Ayrıca Anitschkow erken ve ileri evre ateroskleroza tanımlanmıştır. Knack tavşanlarda sadece kolesterolle beslemenin ateroskleroz oluşumuna neden olmadığını, yumurta ve yağlı besinler gibi aterojenik diyetle birlikte kolesterol verilmesinin ateroskleroza neden olduğu sonucuna varmıştır (Kritchevsky 1995). Tavşan ve tavuk dışındaki deney hayvanlarında

yapılan çalışmalarda (Kawamura, Gustav Fischer et al. 1927; Hueper 1946; Li and Freeman 1946) ise kolesterol diyeti ile ateroskleroz oluşumunun gözlenmediği gösterilmiştir. Ayrıca diyabetik tavşanlara zengin kolesterol diyeti verildiğinde de aterosklerotik lezyon oluşumu gözlenmemiştir (Mathe 1995).

Ateroskleroz patolojisinde önemli bir risk faktörü olduğu bilinen hiperkolesterolemiye dayalı olarak yapılan hayvan deneyleri çalışmalarında farklı süre ve dozlarda kolesterolle beslemenin aterosklerotik süreci etkilediği gösterilmiştir. Diyetle birlikte verilen kolesterol yüzdesi aterosklerotik aortanın morfolojisi ile direk ilişkilidir (Georg Wick and Grundtman 2011). % 0.05'den düşük kolesterol ve %6 yerfıstığı yağı içeren diyetle 8 ay (32 hafta) beslenen Yeni Zelanda tavşanlarında alınan besindeki kolesterol düzeyi %0.05 'den %0.15'e yükseltildiğinde total plazma kolesterol düzeylerinin de iki katına çıktığı gözlenmiştir. Ayrıca sadece %0.15 ve üzeri (%0.20, %0.25) 32 hafta kolesterolle beslemenin koroner arterlerde ateroskleroz oluşturduğu, aortada ise %0.15'in altında (%0.10, %0.05) 32 hafta kolesterolle beslemenin yağ çizgileri oluşturduğu , %0.15 ve üzeri (%0.20, %0.25) beslemenin ise ileri ateroskleroz oluşturduğu morfolojik olarak gösterilmiştir (Kolodgie, Katocs et al. 1996).

Tavşanlarda %1 kolesterolle 12 hafta beslenmenin aortada (Boger, Bode-Boger et al. 1998), %2 kolesterolle 8 hafta beslemenin aortada (Yang and Chen 2003), %2 kolesterolle 8 hafta beslemenin femoral arterlerde ateroskleroz oluşturduğu bildirilmiştir (Jen, Chan et al. 2002).

% 1.5 kolesterol içeren diyet ile 12 hafta beslenen tavşanların serum kolesterol düzeylerinde normokolesterolemik gruba göre anlamlı bir artış olduğu, torasik aortada aterosklerotik plak ve femoral arterlerde endotel fonksiyon bozukluğu olduğu gösterilmiştir (Wang Z, Zou J et al. 2005). %2 zengin kolesterol diyeti ile 2, 4 ve 6 hafta beslenerek erken dönem endotelial disfonksiyon oluşturulan tavşan femoral arterlerinde (Jen, Liu et al. 2005), 4 haftanın ateroskleroz oluşumu ve

tedaviye yanıtı için yeterli olduğu, 6 haftadan fazla beslemeye gerek olunmadığı gösterilmiştir. 14 gün kolesterolle beslenen tavşanların femoral arterlerine kemoatraktant (kimyasal çekici madde) bir madde olan ve hiperkolesterolemi ile bağlantılı olarak deneysel aterosklerotik lezyon oluşumunu başlattığı bilinen Fibrinopeptide B implante edilmesi ile erken aterosklerotik lezyon oluşumu gösterilmiştir (Kadowaki, Singh et al. 1991).

9 hafta %3 yerfıstığı yağı ve %3'lük hindistancevizi yağı içeren çeşitli miktarlarda kolesterol (%0.1, %0.25, %0.5, %1.0, %1.5 veya %2.0) diyeti ile beslenen tavşanların torasik aortasında aterosklerotik lezyon oluşumu gösterilirken (Bocan, Mueller et al. 1993), tavşan penil corporal dokusunda hiperkolesteroleminin vasküler endotelial büyüme faktörü bağımlı eNOS aktivasyonunu azalttığı bildirilmiştir. %1 kolesterol ile 2 hafta beslenen Yeni Zelanda türü tavşanlarda, kolesterolle beslemenin p-Akt/Akt'de değişikliğe yol açmadığı ancak 4.5, 7.5 ve 12 hafta süre ile beslenenlerde anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 4.5 hafta kolesterolle beslemede p-eNOS'un azaldığı, eNOS protein veya mRNA'nın değişmediği gözlenmiştir (Xie, Kontos et al. 2005).

%1 kolesterolle 4 hafta beslenen tavşanların korpus kavernosumunda morfolojik değişim (Kim, Klyachkin et al. 1994) olduğu ve kolesterol seviyesindeki anlamlı artışın ateroskleroz patolojisine neden olduğu gösterilmiştir (Henry, Byrne et al. 2000). %1 kolesterol içeren diyetle 24 hafta beslenen tavşanlarda hiperkolesterolemi oluşumu ve korpus kavernosum dokusunda desmin ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (Karaboga, Kilic et al. 2006). Kolesterolle beslenmenin yaşdan bağımsız olarak endotelium bağımlı gevşeme yanıtlarını azalttığı gösterilmiştir (Behr-Roussel, Bernabe et al. 2002). %0.5 kolesterol diyeti verilen ve iskemi oluşturulan Yeni Zelanda beyaz tavşanlarının 16 hafta sonunda korpus kavernosumda asetilkoline karşı olan endotelium bağımlı gevşeme cevaplarının

kontrol gruba göre azaldığı gösterilmiştir. Kavernosal NOS aktivitesinin ise sadece iskemi oluşturulan grupta azaldığı gösterilmiştir (Azadzo, Goldstein et al. 1998).

Tavşanları 6 hafta %2 kolesterolle beslemenin kolesterol plazma düzeylerinde artışa ve aortada endotelial disfonksiyona neden olduğu (Soner, Murat et al. 2010), 4 hafta %1 zengin kolesterol diyeti verilmesi sonrasında ise aortanın elastik laminanın ciddi oranda zarar gördüğü, makrofajların ve köpük hücrelerin oluşarak aterosklerotik plağın kalınlaşması ile aterosklerozun ilerlemesine yol açtığı morfolojik olarak gösterilmiştir (Lee, Cho et al. 2013). %2 kolesterol ile 6 hafta beslenen tavşanların aortalarında ultrason yöntemi ile intima- media kalınlaşması gösterilirken (Rahmani-Cherati, Mokhtari-Dizaji et al. 2014), %1 kolesterol ile 6 hafta beslenmenin İntima-media kalınlaşması morfolojik olarak gösterilmiş ve aortadan NO salınım düzeyleri azalmıştır (Medina, Alberto et al. 2014).

%1 zengin kolesterol diyeti ile 8 hafta boyunca beslenen tavşan karotid arterlerinde karotid ateroskleroz histolojisi (Nam, Yang et al. 2013), %2 kolesterolle 13 hafta diyet uygulanan tavşanların karotid arterlerinde shear stress ile aterosklerotik plak oluşumu gösterilmiştir (den Dekker, Tempel et al. 2014).

Tablo 1.1. Tavşan aorta dokusunda farklı sürelerde kolesterolle besleme ile oluşturulan ateroskleroz modelleri

	Ateroskleroz var					
Kolesterol yüzdesi Hafta	4	6	8	9	12	32
%1	(Lee, Cho et al. 2013)	(Medina, Alberto et al. 2014)			(Boger, Bode-Boger et al. 1998)	
%2		(Soner, Murat et al. 2010; Rahmani-Cherati, Mokhtari-Dizaji et al. 2014)	(Yang and Chen 2003)			
Kolesterol ve ilaveler (yağ, deoksikolik asit vb)				%3 yarfıstığı yağı ve %3 hindistan cevizi yağı içeren çeşitli miktarlarda kolesterol (%0.1, %0.25, %0.5, %1.0, %1.5 veya %2.0) diyeti uygulanması (Bocan, Mueller et al. 1993),	% 1.5 kolesterol (Wang Z, Zou J et al. 2005)	%0.15 ve üzeri (%0.20,%0.25) düşük kolesterol ve %6 yarfıstığı yağı ile besleme (Kolodgie, Katocs et al. 1996).

Tablo 1.2. Tavşan femoral arter dokusunda farklı sürelerde kolesterolle besleme ile oluşturulan ateroskleroz modelleri

		Ateroskleroz var	Ateroskleroz yok
Kolesterol yüzdesi	Hafta	4-6-8	12
%1.5		(Wang Z, Zou J et al. 2005)	2
%2		(Jen, Liu et al. 2005) (Jen, Chan et al. 2002).	(Jen, Liu et al. 2005)

Tablo 1.3. Tavşan penil dokusunda farklı sürelerde kolesterolle besleme ile oluşturulan ateroskleroz modellerinde endotelial disfonksiyondakine benzer moleküler değişiklikler

	Var				yok
Kolesterol yüzdesi / Hafta	4	4.5-7.5-12	16	24	2
%0.5			(Azadzo, Goldstein et al. 1998) Endotele bağlı gevşemelerde azalma var nörojenik gevşemelerde azalma yok		
%1	(Kim, Klyachkin et al. 1994) (Henry, Byrne et al. 2000). Erken ateroskleroz belirteçleri, noradrenalin duyarlılığında azalma, papaverin gevşemelerinde azalma	(Xie, Kontos et al. 2005). p-akt/Akt azalma var		(Karaboga, Kilic et al. 2006). Desmin ifadesinde azalma	(Xie, Kontos et al. 2005). p-akt/Akt azalma yok

1.6.3. Aterosklerozda vasküler reaktivite

NO'nun vasküler bütünlüğü koruyarak ve ateroskerozu ve damar duvarında morfolojik anlamda yeniden yapılanmayı (remodelling) önlediği, endotelial NO'nun vasküler gevşemeyi düzenleyerek, trombosit agregasyonunu ve vasküler düz kas proliferasyonunu inhibe ederek aterojenik pek çok fizyo-patolojik olguyu yok ettiği bilinmektedir (Kawashima 2004). Normal endotelde asetilkolin NO salınımını uyarak vazodilatasyon ve kan akımı artışına neden olurken, endotelial disfonksiyonu varlığında direkt olarak damar düz kas hücrelerini uyarır ve vazokonstrüksiyona yol açar. Hiperkolesterolle ateroskleroz oluşturulması ile asetilkoline cevap azalmış ya da tamamen ortadan kalkmış vazodilatasyon şeklindedir.

Kolesterolce zengin diyetle besleme veya yaka yerleştirilmesi ile oluşturulan aterosklerozda, vasküler reaktivitenin değiştiği gösterilmiştir. Tavşanların karotid arterlerine silikon yaka yerleştirilmesi ile oluşan erken dönem aterosklerozda intimal kalınlaşmadan bağımsız olarak vasküler reaktivitede de değişiklikler oluşmuştur. Yaka modeli agonistlere verilen maksimum kasılma cevaplarını (Potasyum klorür, fenilefrin, serotonin) azaltırken, serotonin duyarlığında artmaya, fenilefrin duyarlığında ise azalmaya neden olmuştur. Ayrıca arterlerin asetilkoline duyarlığı yaka uygulaması ile azalmıştır. Ancak normal ve yaka uygulanmış arterlerde fenilefrin ve asetilkoline karşı duyarlığı değiştirmemiştir (YETİK 1996).

Tavşanların 4 hafta %2 kolesterolle beslenmesinin (SEVİN 2003) aortanın maksimum KCI kasılma cevaplarını etkilemediği gösterilmiştir. Fenilefrin ve serotonin maksimum kasılma cevapları ve duyarlığı üzerinde de bir etki oluşturmamıştır. Kolesterol ile besleme asetilkolin duyarlığını azaltmış, fluvastatin tedavisi ise bu azalan duyarlığı arttırmıştır. %0.3 kolesterolle 8 hafta beslenen tavşanların aortalarında asetilkolin aracılıklı gevşeme yanıtlarında anlamlı bir değişim gözlenmezken, hiperkolesterol ve sigara dumanına maruz bırakılan

tavşanların aortalarında asetilkolin aracılıklı gevşeme yanıtlarının azalarak endotelyal hasara yol açtığı gösterilmiştir (Mudaliar, Freischlag et al. 1997). 10 hafta %1 kolesterolle beslenen hiperkolesterolemik tavşan aortasında ise asetilkolin kasılma yanıtları artmıştır (Singer, Tsao et al. 1995). %1 kolesterolle 6 ay beslenen tavşanların femoral arterlerinde ACh ile uyarılan gevşeme yanıtlarının kontrol gruba göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (White, Brock et al. 1994).

1.6.4. Aterosklerozda eNOS ve Regülasyonu

Damar endoteli kaynaklı NO, hem bazal koşullarda hem de çeşitli endojen ve ekzogen uyaranlar ile salınmakta ve damar tonusunu düzenlemektedir (Vallance, Collier et al. 1989). Güçlü bir damar düz kas gevşeticisi olan NO, hedef hücrelerde çözünerek sitoplazmik guanilil siklazın (sGC) Hem kısmına bağlanır ve onu aktive eder (Moncada and Higgs 1993). Bu enzimin aktivasyonu ile cGMP açığa çıkar. Bu da protein kinaz G I ve II 'yi aktive ederek damar düz kas gevşemesine neden olur. cGMP'nin neden olduğu gevşeme mekanizmasına aracılık eden olaylar arasında Ca^{2+} un hücre içi depolardan salınmasının inhibisyonu, voltaja bağlı kalsiyum kanallarının inhibisyonu (Ishikawa, Hume et al. 1993), Na^+/Ca^{2+} değiş tokuşunun aktivasyonu, Fosfolipaz C'nin ve IP_3 oluşumunun inhibisyonu (Schlossmann, Ammendola et al. 2000), Ca^{2+} a bağlı K^+ kanallarının aktivasyonu (Bolotina, Najibi et al. 1994) sayılabilir.

Ayrıca NO, endotel yüzeyindeki adezyon (yapışma) moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederek endotelyumu korur. Artmış lökosit adhezyonu ateroskleroz için bir risk faktörüdür. Vasküler hücre adhezyon molekülü (VCAM-1), intraselüler hücre adhezyon molekülü (ICAM), monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve E-selektin gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonu vasküler oksidan stresin artışına bağlı olarak artar (Kunsch and Medford 1999). Bu mekanizmayı destekleyen bir çalışmada, NO ve NO donörlerinin VCAM-1 ekspresyonunu inhibe

ettiği ve bu etkinin redoks duyarlı transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör κB (NF κB) ekspresyonunun inhibisyonu ve buna bağlı olarak oksidatif stresin azalması ile lökosit adhezyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (Kubes, Suzuki et al. 1991).

Nitrik oksit antitrombotik etkiye de sahiptir. Nitrik oksit inhalasyonunun, dolaşımdaki trombositlerin ve tromboembolik hipertansiyonda trombozların in vivo aktivasyonlarını azalttığı gösterilmiştir (Nong, Hoylaerts et al. 1997). NO'nun trombositlerde sGMP düzeylerini yükselterek hem in vivo hem de in vitro olarak trombosit adezyon ve agredasyonu inhibe ettiği gözlenmiştir (Malinski, Radomski et al. 1993).

NO, vasküler bütünlüğü koruyarak ateroskleroza ve damar duvarında morfolojik anlamda yeniden yapılanmayı (remodelling) önler (Aji, Ravalli et al. 1997). NOS aktivasyonunun bozulması ve regülasyonundaki genetik defekt ateroskleroz oluşumunu tetiklemektedir. Patolojik durumlarda eNOS'un aktivasyonu, eNOS'un kenetsizlenmesine neden olarak NO'dan çok süperoksit oluşumuna neden olarak endotelial fonksiyonu bozabilir ve ateroskleroza ve damar duvarında yeniden yapılanmayı tetikler (Kawashima 2004). Bu patolojik ortamda pteridin metabolizmasının düzenlenerek eNOS fonksiyonunun düzeltilmesinin, aterosklerozla seyreden vasküler bozukluklara yeni bir terapötik tedavi yaklaşımı getirebileceği düşünülmektedir (Zheng, Yang et al. 2003). BH₄ sentezine aracılık eden enzim olan GTP siklohidroksilaz I enzim geninin hipertansif DOCA-salt sıçanların karotid arter dokusuna ex vivo transferinin BH₄ düzeylerini arttırdığı ve NO aracılıklı gevşemeyi düzelttiği bildirilmiştir (Zheng, Yang et al. 2003). Gene dışarıdan BH₄ verilen apoli-poprotein E knockout farelerde aterosklerotik lezyonların inhibe edildiği gösterilmiştir (Zheng, Yang et al. 2003). Ancak diğer taraftan hiperkolesterolemi gibi patolojik durumlarda eNOS protein düzeylerinin tek başına yükseltilmesi, NO oluşumunu arttırmaktan çok süperoksit oluşumunu tetiklediğinden patolojiyi düzeltmek yerine daha da kötüleştirdiği bildirilmiştir (Triggle, Hollenberg et

al. 2003). Bu yüzden eNOS protein düzeylerini arttırırken, enzimatik aktivitenin devamlılığının sağlanmasının göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Triggle, Hollenberg et al. 2003)

1.6.4.1. Hiperkolesterolemiye bağlı aterosklerozda eNOS

Hiperkolesteroleminin, ateroskleroz için önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Hiperkolesterolemi durumunda oksidan stresin artarak, NOS kenetsizlenmesine yol açarak NO'dan çok süperoksit oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Böylece oluşan serbest radikaller endotelial fonksiyonu bozar, aterosklerozu ve damar duvarında yeniden yapılanmayı tetikler (Kawashima 2004). Önce NO sentezi ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması nedeniyle NO aracılıklı gevşeme yanıtlarında azalma gözlenir ardından dokudaki yapısal değişimler görülmeye başlar.

Aterosklerozda endotel disfonksiyon oluşumda NO yapımındaki azalmanın başlıca nedenleri; eNOS kofaktörü BH₄ (tetrahidrobiopteridin) miktarlarında azalma, substrat L-arginin kullanımındaki yetersizlik, eNOS aktivitesinde azalma, eNOS ekspresyonunda azalma, endojen NOS inhibitörlerinde artma olabilirken, NO yıkımındaki artışın başlıca nedenleri; süperoksit yapımında artış ve antioksidan savunmada azalma olabilmektedir.

Zhu ve arkadaşları %3 zengin kolesterol ve kolik asit içeren bir diyetle 12 hafta beslenen sıçanların aortalarında eNOS ve p-eNOS ekspresyonlarının normokolesterolemik sıçan aortalarına göre daha az olduğunu göstermiştir (Zhu, Li et al. 2013).

8 hafta %1 kolesterolle beslenen ateroskleroz gelişimine karşı duyarlı olan C57BL/6J (B6) farelerin aortasında da eNOS ekspresyonlarının ateroskleroza

dirençli olan C3H/HeJ (C3H) farelere oralanla daha düşük olduğu gösterilmiştir (Rathouska, Nemeckova et al. 2014).

Hiperkolesterolemik hayvanlarda L-arjinin infüzyonunun endotel bağımlı vazodilatasyonu akut olarak düzelttiği, NOS inhibitörü L-NAME ile tedavinin ise aterosklerotik lezyon oluşumunu tetiklediği bildirilmiştir. Aterosklerotik hayvan modellerinde eNOS'un genetik olarak defektinin aterosklerotik süreci hızlandırdığı ve komplikasyonları arttırdığı gözlenmiştir (Napoli, de Nigris et al. 2006).

1.6.4.2. Erken dönem aterosklerozda eNOS

Kardiyovasküler hastalığın erken evresindeki domuzların %2 yüksek kolesterol diyeti ile 20 hafta beslenerek (Henderson, Turk et al. 2004), koroner arteriollerinde endotel fonksiyonun bozulduğu ve egzersiz ile normale döndüğü gösterilmiştir .

Aynı dönem erken evre aterosklerozlu erkek domuz koroner arterlerinde yapılan bir çalışmada (Thompson, Henderson et al. 2004), 20-24 hafta kolesterol ile besleme sonucunda oluşan endotelial disfonksiyonun, egzersizle düzeldiği, bunda da eNOS ekspresyonunun artması ve beraberinde NO salınımının ve biyoaktivitesinin artmasının etkili olduğu gösterilmiş. Ayrıca moleküler mekanizmaların rolünü aydınlatmak için, erken dönem aterosklerozda kolesterolle beslenen domuzların penisinde eNOS ile Caveolin-1 proteinin etkileşimde olduğu ve eNOS ekspresyonlarının artışı önlenerek endotelial disfonksiyona neden olduğu gösterilmiş (Musicki, Liu et al. 2008).

Erken aterosklerotik insan koroner arter lezyonlarında intimada eNOS ekspresyonunun yok denecek kadar zayıf olduğu gösterilirken, ileri aterosklerotik plaklarda anventitiada fazlasıyla eNOS ekspresyonunun varlığı immunohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir (Ohishi M, Dusting GJ et al. 2010) .

1.7. Farklı dokulardaki aterosklerozda eNOS ekspresyonu

Aorta:

İnsan aorta ve koroner arter dokularında yapılan çalışmalarda (Wilcox, Subramanian et al. 1997; Fukuchi and Giaid 1999), ileri aterosklerotik durumda endotelial hücrelerdeki eNOS ekspresyonunun anlamlı bir azalma gösterdiği gözlenirken, erken aterosklerozda bu durum gözlenmemiştir. Hiperkolesterolemiyle ileri aterosklerozun oluşturulduğu sıçan aortalarında (Zhu, Li et al. 2013) ve insan aterosklerotik plaklarında (Oemar, Tschudi et al. 1998), eNOS ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir. Ancak eNOS ekspresyonun sadece azaldığını değil arttığını ve değişmediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. 10 hafta süreyle zengin kolesterol diyeti ile ateroskleroz oluşturulan tavşanların torasik aortasında eNOS ekspresyonunun azaldığı gösterilirken (Hu, Zhang et al. 2013), doğuştan hiperlipidemik WHHL (watanabe heritable hiperlipidemik tavşanlar) aortasında eNOS ekspresyonlarının arttığı (Kanazawa, Kawashima et al. 1996), 16 hafta kolesterolce zengin diyetle beslemenin ise tavşan aort kapağında (Rajamannan, Subramaniam et al. 2005) eNOS ekspresyonlarını değiştirmedeği gösterilmiştir.

Apo E eksikliğine bağlı doğuştan ateroskleroza olan fare aortasında eNOS protein ekspresyonunun normal farelere göre artmış olduğu (Ming, Barandier et al. 2004), 29 hafta boyunca hiperkolesterolemik diyetle beslenen apoE^{-/-} farelerin aortasında (d'Uscio, Baker et al. 2001) veya kolesterol ve kolik asitce zengin diyetle beslenerek hiperkolesterolemik ve aterosklerotik yapılmış sıçanların aortasında (Zhu, Li et al. 2013) eNOS ekspresyonlarının değişmediği gözlenmiştir.

Aterosklerotik aortada eNOS düzeylerinin nasıl değiştiğine ilişkin mevcut çelişkili yayınlar olması nedeniyle biz de çalışmamızda bu durumu aydınlatmaya çalıştık.

Femoral arter:

Aterosklerotik aortadakine benzer şekilde femoral arterde de eNOS ekspresyonlarının nasıl değiştiği kesinlik kazanmamıştır.

Diyabetik sıçan femoral arterlerinde eNOS protein ekspresyonlarının arttığı gösterilirken (Serizawa K, Yogo K et al. 2011), gene sıçan femoral arterinde diyabetle oluşturulan aterosklerozda ise eNOS protein ekspresyonlarının kontrole göre azaldığı gösterilmiştir (Delbin MA, Davel AP et al. 2012). Hiperkolesterolemik femoral arterde ise eNOS protein ekspresyonları hakkında herhangi bir çalışma yapıp netlik kazanılamamıştır.

Karotid arter:

Aterosklerotik insan karotid arterlerinde eNOS ekspresyon ve aktivasyonunun bozularak azaldığı gösterilirken (Oemar, Tschudi et al. 1998), hiperkolesterolemik apoE geni eksik farelerin karotid arterlerinde eNOS ekspresyonlarının değişmediği (d'Uscio, Smith et al. 2001) hiperkolesterolemik tavşan karotid arterinde ise eNOS ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (Sato, Mohacsi et al. 2000).

Penil doku :

Eretil fonksiyon, korpus kavernozumda yer alan düz kas hücrelerinin gevşemesine bağlı gelişen kompleks nörovasküler bir prosesdir. Eretil disfonksiyonun oluşmasındaki ana etken endotelial fonksiyonun bozulmasıdır (Musicki, Ross et al. 2009). Nitrik oksit sentaz formları nNOS ve eNOS ereksiyon sırasında NO oluşumunda primer rol oynadıkları kanıtlanmıştır. nNOS ve eNOS tarafından L-arjinin-NO yolu ile üretilen nitrik oksit, kaverno düz kas hücresi içine girerek siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezine aracılık eder. cGMP, düz kas hücresinde değişik mekanizmalarla Ca^{+2} düzeyini azaltır ve kaverno düz kasın

gevşemesini sağlayarak ereksiyonun başlatılmasını ve sürdürülmesini sağlar (Trigo-Rocha, Aronson et al. 1993) (Burnett, Lowenstein et al. 1992). İmmunohistokimyasal ve fonksiyonel çalışmalar nNOS'un penil otonomik sinirlerin sinir terminallerine(pelvik pleksus, kavernöz ve dorsal sinirler), eNOS'un ise kavernözal sisternaların ve arterlerin endotelyumuna lokalize olduğunu belirlemiştir (Podlasek, Zelner et al. 2001; Stanarius, Uckert et al. 2001).

Eretil disfonksiyondan sorumlu en önemli mekanizma olarak korpus kavernosumda NO sentezinin bozulması gösterilmektedir (örneğin hiperkolesterolemide, diyabette, hipertansiyonda) (Gocmen, Secilmis et al. 1998). Eretil yapılar da sGMP'nin yıkımından sorumlu enzim olan fosfodiesteraz V enzimini inhibe etmek suretiyle, sGMP düzeylerini ve buna bağlı olarak NO'nun etkisini arttıran sildenafil ve benzerleri erektile disfonksiyon tedavisinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Burnett 1995).

Hiperkolesterolemik diyetle beslenen LDLR-null farelerde, korpus kavernosumda fosforile eNOS ve eNOS ekspresyonunun kontrole göre değişmediği bildirilmiştir (Musicki, Liu et al. 2010). Benzer şekilde hiperkolesterolemik diyetle beslenen domuzların penislerinde de total eNOS ve fosforile eNOS düzeyleri değişmezken eNOS kenetlenmesinin azaldığı ve caveolin ile etkileşiminin arttığı bildirilmiştir (Musicki, Liu et al. 2008). Buna karşın diyetine kolesterol ve kolik asit eklenerek endotelial disfonksiyon oluşturulmuş sıçanlarda (Ryu, Cho et al. 2006; Ryu, Shin et al. 2006) total eNOS düzeyi değişmemesine rağmen serin fosforilasyonunun azaldığı bildirilmiştir. Tavşanlarda (Xie, Kontos et al. 2005) kolesterolce zengin diyetle beslemenin 4.5 haftalık süreden sonra total eNOS düzeylerini değiştirmeden Ser 1177 noktasında eNOS fosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir.

Yaşlı sıçan penisinde kavernöz sinirin elektriksel stimülasyonu ile meydana gelen shear stresse yanıt olarak eNOS Ser-1177 fosforilasyonunun azaldığı ve

eNOS Thr-495 fosforilasyonunun arttığı bildirilmiştir (Musicki, Kramer et al. 2005) . Shear stresse bağlı sinyalin aksine yaşlı sıçanda VEGF-uyarımli sinyale karşı eNOS duyarlılığı korunmaktadır. Bu bakımdan sıçan penisinde VEGF-bağımlı eNOS aktivasyonunun azalması, muhtemelen sınırlı endojen VEGF üretiminden ileri geldiğı düşünölmektedir.

eNOS'un Ser117 noktasında fosforillenmesi penil ereksiyonu için olmazsa olmazdır (Hurt, Musicki et al. 2002). Diyet ve egzersizin penisteki endotelyal disfonksiyonunda etkili olduğı bilinmektedir ancak peniste negatif veya pozitif protein modölatörleri ile eNOS etkileşimi ve bunun penil ereksiyondaki fizyolojik önemi hakkında çok az bilgi mevcuttur (Musicki, Liu et al. 2008).

1.7.1. Ateroskleroz patolojisinde Nitrik Oksitin rolü

Ateroskleroz dünyada önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. (WHO). Yaklaşık her dört kişiden biri kardiyovasküler hastalığa bağılı ölmektedir. Nitrik oksit sentazın regölasyonu ve nitrik oksitin biyoyararlanımı ateroskleroz gibi vasküler hastalıkların gelişiminde hayati bir öneme sahiptir. Pek çok çalışma kolesterolle beslenmiş hayvanlarda (Jayakody, Senaratne et al. 1987) veya aterosklerotik insanlarda (Liao, Bettmann et al. 1991) endotele bağılı gevşeme cevaplarının bozulduğunu ve bu bozulmanın aterosklerozun derecesi ile doğru orantılı olduğunu göstermektedir (Otsuji, Nakajima et al. 1995). Nitrik oksit sadece damar gevşemesinden değıl aterosklerozda pek çok aşamada koruyucu rolü olan bir moleküldür. Antiinflamatuvar özelliklere sahip bir molekül olan nitrik oksitin, pek çok in vitro ve invivo çalışmada endotelyal adhezyon moleküllerinin (VCAM ICAM gibi) ve doku faktörü TF ekspresyonunun (Kubes, Suzuki et al. 1991), monosit chemoattractant protein-1 (MCP-1) gibi kemokinlerin salınımını inhibe ettiğı (Zeiher, Fisslthaler et al. 1995) bilinmektedir. Üstelik NO trombosit agregasyonunu bloke eder ve fibrinolitik aktiviteye de sahiptir (Yetik-Anacak and Catravas 2006). Hem

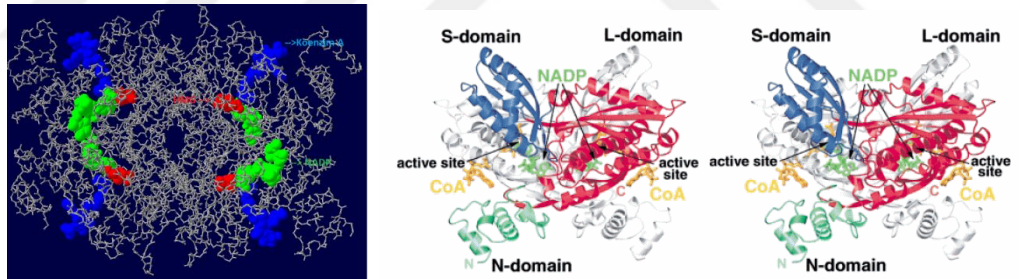
bizim NO donörleri ile yaptığımız ve intimal kalınlaşma oluşumunun engellediğini gösterdiğimiz bir çalışma (Yasa, Kerry et al. 1999) hem de diğer grupların yaptığı eNOS'un substratı olan L-arjinin uygulamasının (Aji, Ravalli et al. 1997) aterosklerotik arterlerde de gevşemeye neden olduğu ve NOS inhibitörlerinin bu koruyucu etkiyi engellediğinin (Wang, Candipan et al. 1996) gösterildiği pek çok çalışma mevcuttur. Tüm bunlar hem düz kas proliferasyonu hem de vasküler fonksiyonlarda anahtar rol oynayan nitrik oksit in ateroskleroz patojenezinde son derece önemli bir yer tuttuğunu ortaya koymaktadır.

1.8. Vasküler Sistemde Statinlerin Rolü

1.8.1. Statin grubu ilaçlar ve tedavide kullanımları

Akiro Endo ve Masao Kuroda'nın, 1976'de yaptıkları bir çalışmada *Penicillium citrinum* tarafından ilk statin (mevastatin, ML-263B) elde edilmiştir (Endo A, Kuroda M et al. 1976). "Monakolin" adlı metabolitin sıçanların kanındaki yüksek lipoprotein miktarını azalttığı gene Endo ve arkadaşları tarafından gösterilmiş, daha sonra Merck & Co ilaç şirketi japonların bu çalışmalarına ilgi gösterip *Aspergillus terreus* adlı mantardan lovastatin (mevinolin-mevakor MK803) elde etmiştir (Endo 2010); bu da ilk ticari olarak pazarlanan statin olmuştur. Daha sonraları doğal, sentetik (fluvastatin, atorvastatin) statinler ve yarı sentetik (lovastatin, simvastatin ve pravastatin) statinler geliştirilmiştir. Statinlerin kimyasal yapılarında, HMG-CoA (3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA) enziminin substratının analogu, bu bölgeye statini bağlayan hidrofobik halka sistemi ve farmakokinetik özelliklerini belirleyen halka yapılarına bağlı yan gruplar bulunur. Sentetik statinlerin kimyasal yapıları ve farmakokinetik özellikleri doğal statinlerden oldukça farklıdır. Sentetik statinlerde florofenil ve polar metan sulfomid grupları bulunmaktadır. Simvastatinde, zincirin 2. pozisyonunda bir metil grubu mevcuttur. Bu yan gruplar, lovastatin, simvastatin,

fluvastatin, atorvastatine lipofilik özellik ve hücre zarından geçişte kolaylık sağlanırken, rosuvastatin ve paravastatine hidrofobik özellik kazandırır ve hücre zarından geçişleri zordur. Simvastatinin protein bağlanma kapasitesi %5 den az serbest plazma formuyla birlikte %95 den fazla iken Paravastatinin protein bağlanma kapasitesi %45'i serbest plazma formundaki bir ilaçla birlikte %55'dir (Hamelin and Turgeon 1998). Simvastatinin sadece %25-30'nun, izole edilmiş endotelial disfonksiyonlu aorta halkalarındaki paravastatin ve hepatik kolesterol metabolizmasındaki etkiden bağımsız olarak, vasküler endotelial hücreler tarafından stimüle NO üretimi kadar efektif olduğu gösterilmiş (Kaesemeyer, Caldwell et al. 1999). Statinlerdeki bağlantı bölgelerinin artmasıyla, HMG-CoA redüktaz enzimine bağlanma affinitesini arttır. Sentetik statinlerde yer alan florofenil ve polar metan sulfomid grupları HMG-CoA redüktaz enzimine bağlanma afinitesini arttırırlar (Istvan and Deisenhofer 2001).



Şekil 1-2 : HMG-KoA redüktaz-substrat kompleksi (Mavi:Koenzim A, kırmızı: HMG ve yeşil: NADP)

1.8.2. Vasküler Sistemde Etkileri ve Etki Mekanizmaları

Statinler, gerek serum kolesterol seviyesini azaltarak, gerekse pleotropik etkileri ile kardiyovasküler mortalite ve morbiditenin azaltılmasında oldukça etkili olabilen önemli bir ilaç sınıfını oluşturmaktadırlar.

1.8.2.1. Kolesterol düşürücü etkileri

Statinlerde bulunan lakton halkası hücre içinde β -hidroksi asit formuna dönüşür. Statinlerin hiperkolesterolemik aktivitesi, HMG-CoA ara formunun ve statinlerin β -hidroksi asit formu arasındaki yapısal homoloji nedeniyle HMG-CoA redüktaz enziminin kompetitif inhibisyonuna dayanır. Kolesterol biyosentezinde statinlerin ilk adımı kolesterol sentezinde öncül madde olan mevolanat üretiminin azaltmasıdır. HMG-CoA redüktaz inhibisyonuyla, izoprenoidlerin sentezi ve kolesterol sentezinde rol alan mevolanatın iki önemli ürününün yol izi etkilenir (Barrios-Gonzalez and Miranda 2010). Hücre içi kolesterol sentezindeki azalmanın aktive ettiği proteaz ile sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinler endoplazmik retikulumdan ayrılarak çekirdeğe gider ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptör gen ekspresyonunu artırır. Bu sayede karaciğerde reseptör aracılı LDL endositozu artar ve serum LDL seviyeleri düşer. Bu şekilde statinlerin kolesterol düşürücü etkileri bir yandan hücre içi sentezi azaltıp, diğer yandan da dolaşımdaki LDL'nin hücre içine alınmasını sağlayarak gerçekleşir (Gulec 2007). Statinler hiperkolesterolemi, familial apo-B100 eksikliği ve hipertrigliseridemi ile hiperkolesteroleminin birlikte olduğu karma hiperlipidemiye bağlı koroner kalp hastalığı ve inmeye karşı primer ve özellikle sekonder profilaksi için kullanılırlar.

Statinlerin, erektil disfonksiyon tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak kullanılabileceğine dair görüşler mevcuttur. Ancak yapılan çalışmalarda değişik sonuçlar elde edildiği için tedavi etkinliği henüz kanıtlanamamıştır. Statinlerin corpus cavernosumda Rho-kinaz enziminin selektif inhibitörü olan Y-27632'ye verilen gevşeme yanıtlarında artmaya neden olduğu görülmektedir. Sentetik bir HMG-CoA redüktaz inhibitörü atorvastatinin (5 ve 30 mg) 2 haftalık tedavisinde büyük ihtimalle

penisteki RhoA/ROCK sinyaline engel olarak hipertansif sıçanlarda sildenafilin indüklediği penil ereksiyonu arttırdığı gözlenmiştir (Fibbi, Morelli et al. 2008).

Eretil disfonksiyonlu diabetik sıçanlarda statin tedavisi uygulanmasının (5 mg), RhoA/Rho-kinaz aracılıklı eretil disfonksiyonu tersine döndürdüğü gözlenmiştir (Wingard, Moukdar et al. 2009). Ayrıca Mashimo ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada statinlerin insan endotelial hücrelerinde eNOS aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada statinlerin LDL düzeyini düşürerek indirekt olarak ve pleotropik etkileriyle direkt olarak NO miktarını arttırdıkları ve böylelikle endotelial disfonksiyonu düzelttikleri düşünülmektedir (Laufs 2003).

Statinlerin eretil disfonksiyonda etkili olamayacağını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, lovastatin ve pravastatinin 57 yaşındaki bir hastada eretil disfonksiyonu düzeltmekten ziyade eretil disfonksiyona neden olduğu bildirilmiştir (Halkin, Lossos et al. 1996). Başka bir araştırmada ise eretil disfonksiyonlu hastalarda simvastatin ve plasebo çalışması yapılmış ve bu sonuçlarda önemli bir farklılık görülmemiştir. Dolayısı ile bu çalışma statinlerin ne eretil disfonksiyonda etkili olduğu ne de eretil disfonksiyona neden olduğu görüşlerine katılmamaktadır (Pedersen and Faergeman 1999).

Statinlerin aterosklerozda etkilerinin belirlenmesi aterosklerozun tedavisine yeni bir tedavi hedefin getirilmesini sağlayacaktır.

1.8.2.2. Pleiotropik etkileri

Statinlerin pleiotropik etkiler olarak adlandırılan bir takım lipit dışı etkileri de (antioksidan, antienflamatuvar, endotel disfonksiyonunun geriletilmesi, trombüs oluşumu ve emboli üzerine etkileri) söz konusudur (Mason, Walter et al. 2006). Astım, kanser (özellikle prostat, kolon kanseri), Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında sinir koruyucu olarak ve son zamanlarda gribal enfeksiyonlarda statinlerin pleiotropik etkileri vurgulanmaktadır (Mihos and Santana 2011).

Statin tedavisinin kolesterole bağımlı olmayan etkileri aterojenik lezyonların boyutlarında küçülmeye neden olduğunu gösteren anjiyografik çalışmalarla da desteklenmiştir. “Familial Atherosclerosis Treatment Study (FATS)” anjiyografik çalışmasında, statinle birlikte safra asidi bağlayan reçineler verilerek, aterosklerotik lezyon büyüklüğündeki değişim oranı%0.7 olarak saptanmışve koroner hastalıklardaki azalma oranıise %70 olarak bulunmuştur (Brown, Zhao et al. 1993). Buna karşın, “Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL)” çalışmasında, akut koroner iskemiden sonra 16 hafta uygulanan statin tedavisinin, iskemik olayların tekrarlanma oranını azalttığı bulunmuştur (Schwartz, Olsson et al. 2001). Serum total kolesterol ve düşük dansiteli lipoprotein (DDL) kolesterolünün azalmasına bağlı olarak plak stabilitesinde ve lezyon büyüklüğünde belirgin bir iyileşme sağlanabilmesi için belirtilen bu sürenin kısa olduğu bildirilmektedir. Ayrıca statinlerin, serum kolesterol düzeylerinin artmasıyla ilişkili olmayan iskemik felçlerin görülme sıklığında azalttığı gösterilmiştir. Bütün bu klinik sonuçlar kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde statinlerin kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız olarak, vasküler dokuda endotel disfonksiyonu düzeltmek (Teschke 2006), aterogenezi azaltmak ve antitrombotik etkileri (Varughese, Patel et al. 2006) gibi direkt pleiotropik etkilerin varlığını göstermektedir.

eNOS yolağı üzerine etkileri : Son zamanlarda statinlerin yararlı etkilerinin kolesterol düşürücü etkileri ile sınırlı olmadığı, kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız olarak pek çok faydalı kardiyovasküler etkileri olduğu da bilinmektedir (Laufs 2003).

Statinler hiperkolesterolemik bireylerde dolaşan adezyon kuvvet molekülü P-selektin ve hücre içi adezyon kuvvet molekülü-1 (ICAM-1)’i azaltır ve bu etki ile NO artışına yol açar (Romano, Mezzetti et al. 2000). Simvastatinin endotelial Akt’yi aktive ederek eNOS fosforilasyonunu ve NO salınımını arttırarak endotel fonksiyonunu düzeltip oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (Kureishi, Luo et al.

2000). Ayrıca statinlerin hiperkolesterolde NO'nun inaktif hale gelip serbest oksijen radikalleri üreterek, NO biyoyararlanımını azalttığı gösterilmiştir (Wilson, Simari et al. 2001) . Statinlerin NO biyoyararlanımını artırdığı da gösterilmiştir (Brouet, Sonveaux et al. 2001; Thakur, Hayashi et al. 2001; Zhou, Jaimes et al. 2004) ancak bu etkisine aracılık eden mekanizmalar üzerinde hala çalışmalar devam etmektedir ve tam olarak aydınlatılamamıştır.

Statinlerin hsp90 üzerinden eNOS regülasyonunda rol aldığına ilişkin çalışmalar da mevcuttur (Brouet, Sonveaux et al. 2001; Murata, Kinoshita et al. 2005). Örneğin sıçanlarda yapılan bir çalışmada hipoksi ile uyarılmış pulmoner hipertansiyonda fluvastatinin sıçan akciğerlerinde cGMP üretimini azalttığı, pulmoner arterde endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını düzenlediği gösterilmiş. Bu yararlı etkinin protein ekspresyonu veya eNOS mRNA artışına bağlı olmadığı, kaveolin-1 ile eNOS inhibisyonuna ve hipoksi ile hsp90 aracılıklı olarak eNOS fosforilasyonunun azalmasına bağlı olduğu gösterilmiş (Murata, Kinoshita et al. 2005).

Yapılan çalışmalarda statinlerin Hsp90'a benzer şekilde AKT enzimi üzerinde etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Brouet, Sonveaux et al. 2001; Chen, Lawrence et al. 2004; Chen and Meyrick 2004; Sun and Liao 2004; Wei and Xia 2005; Xi, Satoh et al. 2005). Ayrıca başka bir çalışmada heat shock proteinlerin transkripsiyonunda rol alan hsf1 üzerinden hsp90 ekspresyonunu artırdığı ortaya konmuştur (Uchiyama, Atsuta et al. 2007). Bununla beraber statinlerin aortik endotel hücrelerinde, hsp90 aracılıklı olarak Akt'ye bağlı eNOS fosforilasyonunu arttırdığı (Kureishi, Luo et al. 2000; Brouet, Sonveaux et al. 2001) ve eNOS aktivasyonunun inhibitörü olan kaveolini inhibe etmek suretiyle Ca^{++} a bağlı eNOS aktivasyonunu tetikleyebiliği (Feron, Dessy et al. 2001) ve bu olaylarda hsp90' ın aracılık ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca statinlerin, agonistlerin neden olduğu eNOS aktivasyonunu potansiyalize ettiği (Brouet, Sonveaux et al. 2001; Murata, Kinoshita et al. 2005; Uchiyama, Atsuta et al. 2007). Ancak daha önce de bahsedildiği gibi

statinlerin eNOS üzerindeki aktive edici etkilerinin dokuya özgü değişkenlik gösterdiği de bilinmektedir (Brouet, Sonveaux et al. 2001; Sessa 2001).

Antioksidan etkileri : Statinlerin diğer bir pleiotropik etkisi antioksidan etkileridir. Statinler, endotel kaynaklı gevşemeleri, süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi, reaktif oksijen türevlerinin (ROT) oluşumunu inhibe ederek artırır (Rikitake, Kawashima et al. 2001). Ayrıca lipid düşürücü etkileriyle vasküler oksidatif stresi zaten azaltmaktadırlar (Laufs and Liao 1998; Cai and Harrison 2000). Örneğin atorvastatinin aktif metabolitinin antioksidan etkinlik göstererek membran kolesterol birikimini azalttığı gösterilmiştir (Mason, Walter et al. 2006). Statinler, Rac-1 aracılı NADH oksidaz aktivitesini inhibe ederek ve anjiotensin tip-1 reseptör ekspresyonunu azaltarak vasküler düz kasta anjiotensin 2 ile indüklenen serbest radikal üretimini azaltmaktadır (Wassmann, Laufs et al. 2001).

Sigurdsson ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da, 6 ay öncesine kadar miyokardiyal enfarktüs veya anjio öyküsü olan orta derecede hiperkolesterollü insanlarda total serum kolesterol ve LDL-kolesterol seviyesinin fluvastatin (20mg) veya simvastatin (20mg) tedavileriyle nasıl etkilendiği araştırılmış ve her iki statinin de total serum kolesterol ve LDL-kolesterol seviyelerini azalttığı, simvastatinin fluvastatine oranla daha efektif olduğu gösterilmiş (Sigurdsson, Haraldsdottir et al. 1998).

Smilde ve arkadaşlarının hiperkolesterolemik insanlarda yaptıkları bir çalışmada (Smilde, van den Berkmortel et al. 2000), hiperkolesterolemik grupta, 1 yıl boyunca verilen statin grubu ilaçlarla (simvastatin, atorvastatin 40-80 mg/gün) tedavi edilmiş ve total kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserit (TG) düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiş. Femoral arter ve karotid arterlerdeki intimal alan ve mediada hiperkolesterolemi ile kalınlaşan tabaka, statin tedavileri ile düzelmiştir.

Kaesemeyer ve arkadaşlarının (Kaesemeyer, Caldwell et al. 1999), sığır aorta hücre kültüründe yaptıkları bir çalışmada pravastatinin LDL miktarını düşürdüğünü, pravastatin + simvastatinin de gene aynı oranda LDL miktarını azalttığı ve eNOS aktivitesini arttırdığı gösterilmiş

4 hafta 1% kolesterolle beslenen tavşanlarda oluşan damar sertliğinde Simvastatin ile 4 hafta süren tedavi sonrası ise femoral arter esnekliğinde iyileşme gözlenirken, abdominal aortada anlamlı farklılığa rastlanmamıştır (Xue, Xu et al. 2009).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar statinlerin özellikle Rho-kinaz inhibisyonu ile NO düzeylerini arttırması ve eNOS-Hsp90 olası etkileşimleri aracılığıyla henüz onaylanmasalar da erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılabilmesi muhtemeldir. Şuana kadar penil dokuda eNOS-hsp90 etkileşimini gösteren bir yayın mevcut değildir. Biz de bu çalışmada kolesterol yüklemesi ile hem ateroskleroz hem de erektil disfonksiyon oluşturululan tavşan penil dokusunda ve aortasında eNOS'un regülasyonunu sağlayan moleküler mekanizmaları aydınlatmak açısından eNOS-hsp90 etkileşimlerinin varlığını, fizyolojik ve patofizyolojik önemini ortaya koymaya ve fluvastatinlerin etkisini göstermeye çalıştık.

Çalışmamızda endotelial disfonksiyonun görüldüğü ateroskleroz patolojisinde, kolesterolle beslenen tavşanların aortasında ve femoral arterinde NOS regülasyonunda rol alan bazı proteinlerin (eNOS, AMPK, kaveolin-1, hsp90) ekspresyon düzeylerinde değişim olup olmadığı ve bunun fluvastatin uygulanmasından etkilenip etkilenmediği western blot deneyleri ile araştırılmıştır. Kolesterolle besleme sonrası izole edilen tavşan aortalarında intimal kalınlaşmanın olup olmadığının değerlendirilmesi için de hematoksilen-eosin ile boyanan aortik damar segmentlerinde intima, medya ve lümen alanları ölçülüp (intimal alan/medyal alan) analiz edilmiştir.

BÖLÜM II

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Farmakoloji ve hayvan laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından “Hiperkolesterolemik tavşanların vasküler sisteminde hsp90-eNOS etkileşimi” isimli proje ile desteklenmektedir.

Araştırmada kullanılan tüm hayvanlar T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’nden alındı. Araştırma protokolü Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı. Deney hayvanlarının bakımı ve yapılan işlemler Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Yönergesi’ne uygun olarak gerçekleştirildi.

2.1. Deney Hayvanları ve Tedavi Uygulamaları

Çalışmamızda Yeni Zelanda türünde erkek tavşanlar (2.0-2.5 kg) kullanıldı. Hayvanlar deney öncesi kontrol (n=8) ve kolesterol (n=10) besleme grubu olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubunu oluşturan hayvanlara sadece standart sığır besi yemi verilirken, diğer gruptaki hayvanlar 6 hafta süreyle %2 kolesterol+ %8 zeytinyağı içeren sığır besi yemi ile beslendi. Kolesterol diyeti uygulanan tavşanlara günlük taze olarak 90 g yem + 8 g zeytinyağı + 2 g kolesterol = 100 g yem verilirken, kontrol grubu tavşanlara 100 g standart yem verildi. Yemler günlük olarak hazırlandı, yenilmeden kalan kısımlar atıldı. Tavşanların su içmelerinde sınır tanınmadı.

2.1.1. Çalışma Protokolü:

Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşanların 6 haftalık besleme süresi bitince her gün bir tavşanın dokuları (aorta, femoral arter ve penil) çıkarılarak deneye alındı. İzole edilen dokular hsp90 inhibitörü varlığında veya yokluğunda 3 veya 15 sa fluvastatine maruz bırakıldı. Kısa süreli (3 sa) tedavi inkübasyonlarda hsp90 inhibitörü olarak DMAG'a uzun süreli (15 sa) tedavi inkübasyonlarda Radicol'e maruz bırakıldılar.

Tedavi grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

Kısa süreli invitro inkübasyon 3 saat	Uzun süreli invitro inkübasyon 15 saat
Çözücü Fluvastatin (30 µM) DMAG (hsp90 inhibitörü) (1 µg/mL) DMAG + Fluvastatin (1 µg/mL+30 µM)	Çözücü Fluvastatin, (30 µM) Radicol, (hsp90 inhibitörü) (10 µg/mL) Radicol+Fluvastatin, (10 µg/mL+30 µM)

Hiperkolesterolemik aortada NOS regülasyonunda rol alan bazı proteinlerin (eNOS, AMPK, kaveolin-1, hsp90) ekspresyon düzeylerindeki değişim normokolesterolemik aortaya göre karşılaştırılarak incelendi. Söz konusu proteinlerin ekspresyon düzeyindeki değişimin fluvastatin (30 µM, 15 saat) tedavisinden etkilenip etkilenmediği western blot yöntemi ile araştırıldı. Hiperkolesterolemik femoral arterde ise eNOS ve hsp90 düzeylerindeki değişim ve fluvastatinin (30 µM, 3 saat) bu değişimi değiştirip değiştirmeyeceği western blot yöntemi ile araştırıldı. Hiperkolesterolemik aorta ve penil dokuya fluvastatinin etkisi ve hsp90'nın rolü immunpresipitasyon yöntemi ile araştırıldı.

2.1.2. Kolesterol Ölçümü

Tavşanlarda kolesterolle beslemenin kolesterol düzeylerine etkisini araştırmak üzere 6 haftalık besleme periyodunun sonunda ve başında kontrol ve kolesterol

grubundaki tavşanların marjinal kulak veninden kan alınarak, bu kanlardan serumlar santrifüj (2000 g, 15 dk) ile ayrıştırıldı. Efendorflara alınan bu serumlar -80°C’de deney sonuna kadar saklandı. Sonra hepsinin serum kolesterol düzeyleri kolesterol ölçüm kiti kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülerek, kolesterolle beslenen hayvanların plazma kolesterol düzeylerindeki artış mg/ml ünite cinsinden gösterildi.

2.2. Dokular ve Dokulara Uygulanan İşlemler

2.2.1. Doku izolasyonu

Tavşanlar, kulak venine infüzyon edilen anestezik bir ajan olan sodyum pentobarbitalin aşırı dozu (150 mg/kg iv enjeksiyon) ile etik kurallar çerçevesinde öldürüldüler. Hemen sonrasında aortaları, femoral arterleri ve penil dokuları izole edildi. Dokular oda sıcaklığında, içinde fonksiyonlarının devamının sağlanması için 1X Krebs (Fizyolojik tuz çözeltisi) solüsyonu bulunan bir petri kabına alınarak çevre dokuları temizlendi. Eşit parçalara ayrılan dokular kısa ve uzun süreli tedavi gruplarına alındı. Tedavi süresi biten dokular efendorflara alınarak -80°C’ ye kaldırıldı.

Konsantre krebs çözeltisi hazırlamak için tablo 2-1 de belirtilen kimyasallar tartıldıktan sonra yaklaşık 800 ml distile su ile çözüldü. Daha sonra distile su eklenerek final hacim 1 L’ye tamamlandı. Daha sonra konsantre krebs çözeltisinden (20X) 25mL alınarak tablo 2-2 de belirtilen kimyasallar eklendi ve final hacim distile su ile 1 L’ye tamamlandı.

1 L krebse COX yolağını inhibe etmek için final konsantrasyonu 3×10^{-6} M olacak şekilde indometazin eklendi. İndometazin stok çözeltisi için 6,5 gram indometazin toz tartılıp 1 ml %96’lık etanolde çözüldü.

Tablo 2-1 : Konsantre Krebs çözültisi (20X)

Kimyasal adı	g/dL	Kaynak
KCL	7,00	Merck, K40610636
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,95	Merck, 5882
K ₂ PO ₄	3,20	Merck, 4871
CaCl ₂ .2H ₂ O	7,40	Merck, A862982825
NaCl	138	Merck

Tablo 2-2 : Krebs çözültisi (1X)

Kimyasal adı	g/dL	Kaynak
D(+) Glikoz-monohidrat	2,0	Riedel-de häen, S060202
NaHCO ₃	2,1	Riedel-de häen, S170701

2.2.1.1. Aorta izolasyonu ve tedavi grupları

Çevre dokuları temizlenen aorta yaklaşık 2 mm kalınlığında 8 halkaya ayrıldı. 4 halka kısa (3 sa), 4 halka uzun süreli (15 sa) tedavi grubuna alındı. Dokular 1000 µl indometazinli krebs içeren petri kuyucuklarında gerçekleştirildi.

Kısa süreli inkübasyon gruplarında 1.kuyucuğa tedavi verilmedi (Plasebo). 2.kuyucuk 30 µM fluvastatin (3 sa), 3.kuyucuk 1 µg/mL DMAG (3 sa) ve 4.kuyucuk 30 µM fluvastatin + 1 µg/mL DMAG (3 sa) tedavilerine maruz bırakıldı.

Uzun süreli tedavi grubu için ayrılanlar, 1000 µl indometazinli krebs içeren petri kuyucuklarına kondu. 1.kuyucuğa tedavi verilmedi (Plasebo). 2.kuyucuk 30 µM fluvastatin (15 sa), 3.kuyucuk 10 µg/mL RAD (15 sa) ve 4.kuyucuk 30 µM fluvastatin + 10 µg/mL RAD (15 sa) tedavilerine maruz bırakıldı.

İnkübasyon sonrası aorta dokuları normal krebs içine alınarak kısa süreli yıkama yapıp ardından ayrı ayrı efondorflara konularak hemen sıvı azotla şok dondurma yapıldı. Dokular deney gününe kadar -80°C 'ye kaldırıldı.

2.2.1.2. Femoral arter izolasyonu ve tedavi grupları

Çevre dokulardan temizlenen femoral arterler 2 parçaya ayrıldı. Sadece kısa süreli tedaviye maruz bırakıldı. 1000 μl indometazinli krebs içeren petri kuyucuklarından 1.kuyucuğa tedavi verilmedi (Plasebo). 2.kuyucuğa 30 μM fluvastatin (3 sa) uygulandı.

Tedavisi süreleri biten dokular normal krebs içine alınarak kısa süreli yıkama yapıp ardından ayrı ayrı efondorflara konularak hemen sıvı azotla şok dondurma yapıldı. Dokular deney gününe kadar -80°C 'ye kaldırıldı.

2.2.1.3. Korpus Kavernosum izolasyonu ve tedavi grupları

Krebs solüsyonu içinde bulunan penil doku bir petri kabına alınarak çevre dokulardan temizlendi. Glans penis ve üretra ayrılıp her iki korpus kavernosum dokusu arasındaki fibröz septum kesildi. Korpus kavernosum yaklaşık 7 mm uzunluğunda ve 2 mm eninde 8 şerite ayrıldı. 4'ü kısa diğer 4'ü de uzun süreli tedavi grubuna ayrıldı.

Kısa süreli tedavi grubu için ayrılanlar, 1000 μl indometazinli krebs içeren petri kuyucuklarına kondu. 1.kuyucuğa tedavi verilmedi (Plasebo). 2.kuyucuk 30 μM fluvastatin (3sa), 3.kuyucuk 1 $\mu\text{g/mL}$ DMAG (3sa) ve 4.kuyucuk 30 μM fluvastatin + 1 $\mu\text{g/mL}$ DMAG (3sa) tedavilerine maruz bırakıldı.

Uzun süreli tedavi grubu için ayrılanlar, 1000 μl indometazinli krebs içeren petri kuyucuklarına kondu. 1.kuyucuğa tedavi verilmedi (Plasebo). 2.kuyucuk 30 μM fluvastatin (15sa), 3.kuyucuk 10 $\mu\text{g/mL}$ RAD (15sa) ve 4.kuyucuk 30 μM fluvastatin + 10 $\mu\text{g/mL}$ RAD (15sa) tedavilerine maruz bırakıldı.

Tedavisi süreleri biten penil dokular normal krebs içine alınarak kısa süreli yıkama yapıp ardından ayrı ayrı efondorflara konularak hemen sıvı azotla şok dondurma yapıldı. Dokular deney gününe kadar -80°C 'ye kaldırıldı.

2.2.2. Homojenizasyon

İzolasyonun ardından -80°C 'ye transfer edilen dokular, homojenize edilmek üzere -80°C 'den çıkarıldı. Sıvı azot içeren kovada 5 dk bekletilen Bessman tip pulvarizer (paslanmaz çelikden yapılan 12 bölme ve piston içeren)'a dokular sırası ile yerleştirildi. Sonra tekrar sıvı azot içeren kova içine konularak 5 dk da böyle soğuması sağlandı. Hangi dokuların hangi kuyucuğa konulduğu karıştırılmasın diye laboratuvar defterine not edildi. Dokuları içeren pulvarizer yerdeki kalın bir bez üzerine konularak, çekiç yardımı ile pistonların üstüne sert bir şekilde vurma usulüyle toz edildi (doku toz haline gelinceye kadar dövme işlemi devam etti). Bu alet protein-protein etkileşimlerini bozmadan ve çapraz kontaminasyona neden olmadan uygun bir şekilde dokuyu parçalamak için özellikle tercih edildi. Toz edilen dokular -20°C 'de saklanan ağzı kapaklı 800 μl 'lik özel shaker tüplerine bir spatül yardımı ile tek tek alındı. Darası alınan efendorf, doku konulduktan sonra tekrar tartıldı ve dokunun mg'ı kaydedildi. Standartı yakalamak için her doku için bu tartma işlemi gerçekleştirildi. Dokuların protein yapısı ısı ile bozulduğu için bu işlemler oldukça hızlı bir şekilde buz üzerinde gerçekleştirildi.

Konsantre homojenizasyon solüsyonu (Tris-HCl 50 mM (0,789 g), EGTA 0.1 mM (0,00389 g), EDTA 0.1 mM (0.5M dan 20 μl), NP-40 (igepal) % 1 (1 ml), SDS % 0.1 (%20'den 0.5 ml), Deoksikolik asit % 0.1 (0,1 g), Distile su 97.5 ml) içerisine homojenizasyonun hemen öncesinde Bestatin (5 mM), Pepstatin (1 mM), E-64 (1.5 mM), Leupeptin Hemisulfate (2 mM), AEBSF (100 mM), Aprotinin (80 μM) içeren proteaz inhibitörleri kokteyli (1:100 dilüsyon (5 ml için 50 μl) veya 1 tablet; AG scientific P-1512 cocktail III veya tablet thermo scientific) ve Imidazole, (200 mM), Sodium Fluoride (100 mM), Sodium Molybdate (115 mM), Sodium

Orthovanadate (100 mM), Sodium Tartrate (400 mM) içeren fosfataz inhibitör kokteyli (1:100 dilüsyon (5 ml için 50 µl) veya 1 tablet; AG scientific P-1518 cocktail II veya tablet thermo scientific) eklendi. Toz edilen dokuların homejenizasyonu için öncelikle doku ağırlığına göre soğuk homejenizasyon solüsyonu (total 50 mg doku için toplamda 500 µl homejenizasyon buffer kullanıldı) , ardından 15-16 adet (toplam 500 µl homejenizasyon buffer için 15 adet) 2.0 mm Zirconia bead eklendi.

Doku ağırlığına göre hesaplanan homejenizasyon buffer miktarı 3'e bölünerek tüplere kondu. Şöyle ki; 50 mg doku için öncelikle 200 µl buffer + beads konularak bead homejenizatörde (MiniBead Beater) düşük hızda (0,3 dakika x 3 kez) nazik bir şekilde homejenize edildi. Süpernatantlar buzda bekleyen temiz bir ependorfa alındı ve ardından 150 µl buffer doku üzerine eklendi, tekrar homejenizatörde düşük hızda (0,3 dakikada 3 kez) nazik bir şekilde homejenize edildi. Süpernatantlar tekrar alındı ve son olarak 150 µl buffer doku üzerine eklenerek homejenizatörde aynı hızda homejenize edildikten sonra tüm süpernetantlar toplandı. Homejenizatörde doku ısındığı için beaderler fazla eklenmemeli ve homejenizatördeki bekleme süresi 0,3 dakikayı geçmemelidir. Her bekleme aşamasında doku buz üzerinde soğumaya alınmıştır.

Toplanan süpernatantlar 4°C de, 14.000 rpm'de 10 dakika süreyle soğutmalı santrifüj kullanılarak santrifüj edildi ve süpernatantlar yeni ependorflara alınarak protein ölçümleri yapılmak üzere buz üzerine konuldu.

2.2.3. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini, BCA assay ile belirlendi. BCA Protein Analizi aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Kitin içinde bulunan reaktif B ve A 'dan 1:50 oranında karıştırılarak yeterli miktarda BCA karışımı hazırlandı ve ışıktan korunması için folyo ile sarıldı. Bu karışım oda sıcaklığında beklerken, standart oluşturmak üzere BSA (Bovine Spine

Albumine) hazırlandı. -20 °C'de stok (1 g/L) halde bulunan BSA'dan 4 farklı oranda standartlar hazırlanarak efendorf tüplere konuldu.

Standart 1(1000 µg/ml) → 10 µl BSA

Standart 2 (500 µg/ml) → 40 µl homojenizasyon buffer + 40 µl BSA = A karışımı

Standart 3 (250 µg/ml)→ 40 µl homojenizasyon buffer + 40 µl A karışımı = B karışımı

Standart 4 (125 µg/ml) → 40 µl homojenizasyon buffer + 40 µl B karışımı

Ölçüm planı genel olarak 1000 µg/ml - 500 µg/ml - 250 µg/ml - 125 µg/ml - Blank - Örnek (doku süpernatantları) şeklinde hazırlandı. Standart hatayı azaltma adına her birinden 2'şer kuyu hazırlandı.

Dokularda protein miktarını ölçmek için örnekleri koyacağımız 96 kuyulu mikropate 'in her kuyucuğuna öncelikle 200 µl BCA karışımı kondu. Ardından her standart ve örnek için 10 µl yükleme yapıldı. Blank için 200 µl karışımın üstüne 10 µl homojenizasyon buffer (distile su) kondu. Plate alüminyum folyo ile sarılarak su banyosunda 37 °C'de yarım saat bekletildi. Daha sonra Spektrofotometrede 595 nanometre dalga boyunda absorbansları ölçülerek standartların kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Örneklerdeki protein konsantrasyonları, standartların kalibrasyon eğrisinin formülüne göre excelde hesaplandı.

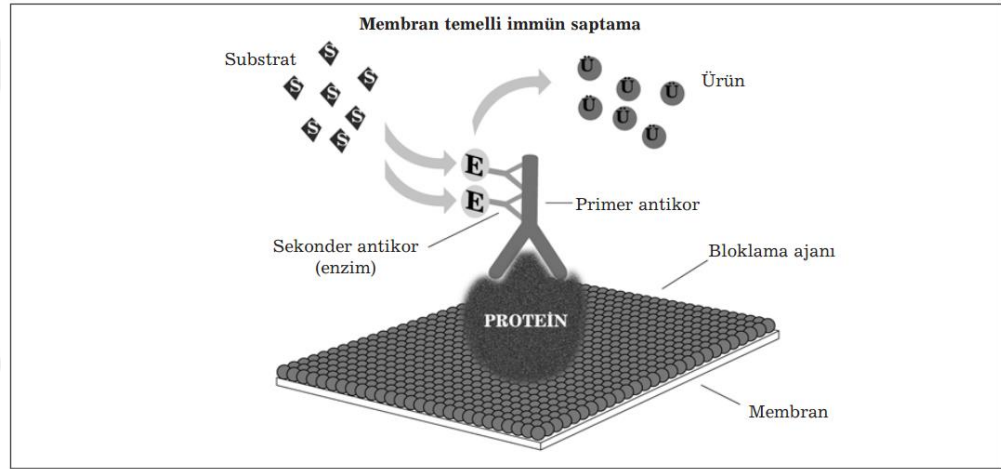
2.3. Kullanılan Deneysel Yöntemler

2.3.1. Western-blot

Western blot yöntemi, protein karışımının jel elektroforezi ile ayrıştırıldıktan sonra uygun bir membrana aktarılmasıdır. Böylece protein, spesifik olarak işaretli antikör veya antijenle reaksiyona girerek antijen varlığı ve miktarı, moleküler ağırlığı

ve antijen izolasyonunun etkinliği gibi protein antijenlerinin önemli özellikleri belirlenebilir (Şekil 2-1).

Bizim bu deneyimizde de protein konsantrasyonları belirlenen örneklerin yüklenecek protein miktarı (μg) ve kaç μl homojenat kullanılacağı hesaplandıktan sonra antijenlerin varlığını tespit etmek amacı ile western blot yöntemi kullanıldı. Öncelikle örnekler jele yükleme için hazırlandı, ardından elektroforez ile proteinler göç ettirildi ve jelden membrana transfer edilerek ,ilgili proteinimize spesifik antikorlarla blotlama işlemleri yapıldı.



Şekil 2-1 : Membran temelli immün assay

2.3.1.1. SDS PAGE Jel Elektroforez

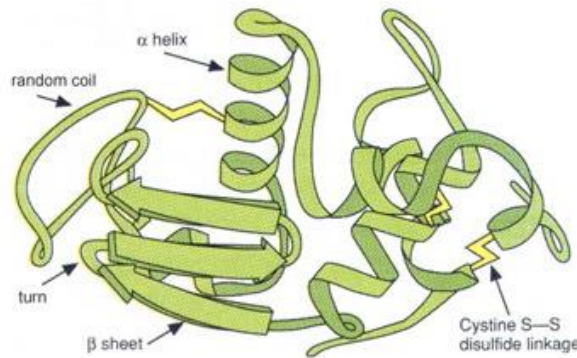
Jelin yürütülmesi

Öncelikle deneyden 1 gün önce ilgili proteinlerin molekül ağırlığına uygun olan %8'lik ayırıcı (resolving) jel Tablo 2-3'de belirtilen kimyasallar kullanılarak hazırlandı. Ayırıcı jeli hazırlamak için kullanılan "Ayırıcı jel tamponu (buffer)" , Tablo 2-4'da belirtilen kimyasallar kullanılarak önceden stok halinde hazırlanmıştı. Bu kimyasallar tartılarak distile suda çözüldü ve 500 ml'ye tamamlandı, pH 6.8'e ayarlandı ve +4 °C'de saklandı. APS (Amonyum persülfat) ise fresh taze olarak jeli dökerken

hazırlandı. Önceden yerleştirilmiş olan camların arasına bu hazırladığımız %8'lik ayırıcı jel döküldü, üzerine distile su dökülerek ayırıcı jelin donması için yaklaşık 45 dakika beklendi. Ardından pastör pipeti yardımıyla camlar arasındaki distile su alındı. Donan ayırıcı jelin üstüne dökmek üzere, Tablo 2-5'deki kimyasallar kullanılarak %4 lük toplayıcı (stacking) jel hazırlandı. "Toplayıcı jel tamponu (buffer)" önceden stok halinde, Tablo 2-6'da belirtilen kimyasallar tartılarak 500 ml'ye distile su ile tamamlanarak hazırlandı. pH 6.8'e ayarlandı ve +4 °C'de saklandı. APS (Amonyum persülfat) yine taze olarak jeli dökerken hazırlandı. Hazırlanan toplayıcı jel donan ayırıcı jelin üstüne döküldü ve hemen 10 kuyucuklu taraklar dikkatli bir şekilde takıldı. Yaklaşık 30 dakika geçtikten sonra taraklar çıkartıldı. Donan jeller camlardan ayrıldı ve +4 °C'ye nemli bir halde hava ve ışık almayacak şekilde sarılarak kaldırıldı.

Deney günü 70 µg protein içerecek şekilde örnekler hazırlandı. Daha önceden Tablo 2-7 belirtilen kimyasallar kullanılarak 100 ml hazırlanan, -20 °C 'ye 500 µl'lik alikotlar halinde kaldırılan 4X-SDS- sample loading buffer(örnek yükleme tamponu) 'in üzerine, çeker ocak altında 42 µl Betamerkaptoetanol eklendi. Bu çözeltiden örneklerin üzerine, örneklerin 3'de 1 oranında (30µl örnek +10 µl 4X-SDS gibi) eklenerek, 95 °C' de 5 dakika kaynatıldı. Böylece proteinlerin özellikle polipeptit yapıları denatüre edilerek üç boyutlu yapıları bozulmuş ve protein doğrusal hale gelmiş oldu. SDS, örnekteki protein moleküllerinin etrafında boşluk kalmayacak şekilde bir katman oluşturarak, her molekülün homojen bir şekilde (-) yükle kaplanmasını sağladı. Betamerkaptoetanol eklenmesi ile de proteinlerin disülfid bağları indirgenmiş oldu ve proteinler "random coil" konfigürasyonlarını koruyarak moleküler ağırlıklarına göre yürümeye hazır hale gelmiş oldu. Sonuçta proteinlerin ayrışması, moleküllerin kendi yükünden bağımsız olacağından, doğrudan doğruya molekül ağırlıklarına göre ayrışma gerçekleşir. Denatüre edilmiş olan örnekler hemen buz üzerine alınıp kısa spin işlemine maruz bırakıldı ve tekrar buz üzerine

alındı. Jel kuyucuklarına maksimum 40 µl örnek yüklenebileceği için, hazırlanan total örnek miktarı bu hacmi geçmeyecek şekilde hazırlandı ve tüm örneklerin total yüklencek hacmi distile su ile eşitlendi. Kasete yerleştirilen jeller elektroforez tankına uygun şekilde yerleştirildi ve üstüne yürüme solüsyonu (running buffer) döküldü. Yürüme solüsyonu daha önce Tablo 2-8 da belirtilen kimyasallar kullanılarak total hacim 1L olacak şekilde hazırlandı ve +4 °C'de saklandı. pH ayarlaması yapılmayan bu stok (10x) çözelti jel yürütüleceği zaman 10X'den 1X'e seyreltme yapılarak kullanıldı (900 ml d.su +100 ml 10X running buffer). Sırasıyla moleküler weight marker (new england biolab ® , P7710S, 2,5 µl), örnekler (maksimum 40 µl) ve pozitif kontrol ince uçlu pipet yardımıyla yavaşça yüklendi. Pozitif kontrol olarak 100 µg karaciğer homojenatı kullanıldı. Elektroforez tankının kapağı kapatıldı ve voltaja takılarak cihaz çalıştırıldı. “-” yüklü olan örnekler “-” uçtan, “+” uca doğru ilerledikçe, jel konsantrasyonu giderek artar, gözenek çapı da giderek küçülür. Başlangıçtaki büyük gözeneklerden tüm moleküller geçerken gittikçe geçirgenlik azalır. Böylece moleküller, kendi büyüklüklerine uyan gözeneklerde takılarak molekül ağırlıklarına göre ayrışırlar. Örnekler toplayıcı jeli (*stacking gel*) geçinceye kadar 75 Volt'da, ayırıcı jele (*resolving gel*) geçince de sırasıyla 100-120-150 Volt'a getirilerek yaklaşık 2 saat yürütme işlemi yapıldı.



Şekil 2-2 : Genel olarak proteinlerin sekonder yapısı, Santosh K.Patnik' den uyarlanmıştır (Patnaik 2005).

Tablo 2-4 : Toplayıcı jel (Stacking Gel) %4 içeriği

İçerik	Miktar (2 adet jel için)
H ₂ O	2.5 ml
Toplayıcı jel tamponu	3.125 ml
30 % akrilamid	1.125 ml
TEMED	6.25 µl
APS %10 luk	31.25 µl

Tablo 2-5 : Ayırıcı jel tamponu içeriği

İçerik	Miktar (500 ml için)
Trizma-baz	45.5g
SDS (Sodium dodecyl sulphate)	1.0 g
H ₂ O	450 ml

Tablo 2-6 : Toplayıcı jel tamponu içeriği

İçerik	Miktar
Trizma-baz	15.15 g
SDS	1.0 g
H ₂ O	450 ml

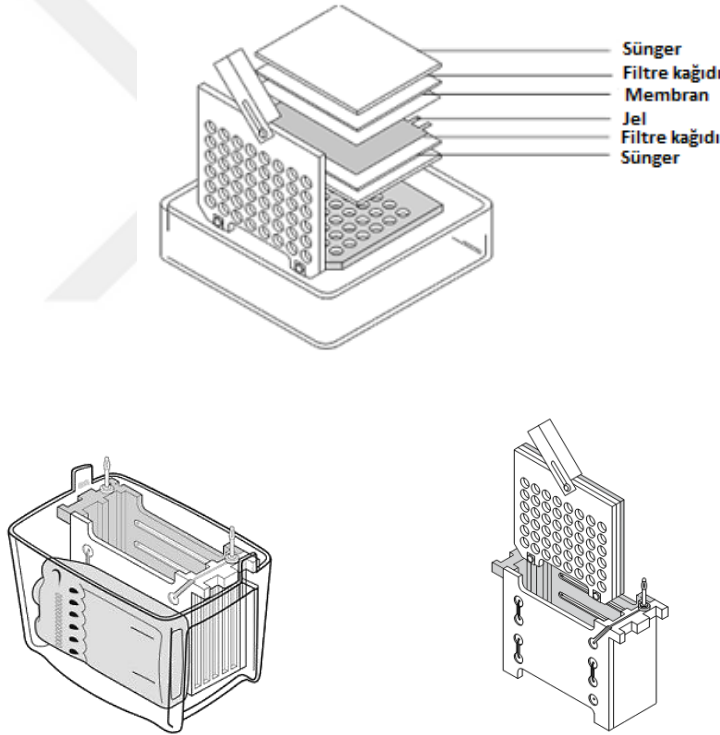
Tablo 2-7 : Örnek tampon çözeltisi (4X SDS-loading buffer) içeriği ve hazırlanışı

Kimyasal madde, kaynak	Final konsantrasyon	Stok konsantrasyon	Miktar (100 ml)	Hazırlanışı
Tris-HCl (pH:6.8)	200 mM	1 M	20 ml	100 ml distile su içinde 15.76 g çözündü, pH ayarlandı.
EDTA (pH:6.8)	8 mM	100 mM	8 ml	10 ml distile su içinde 0,372 g çözündü.
Gliserol	% 40	% 100	40 ml	Hazır haldeki şişeden 40 ml alındı.
SDS	% 8	% 10	8 g	Toz halinde 8 g tartıldı
Bromfenolblue	% 0.02	% 2	1 ml	2 ml distile su içinde 0,04 g çözündü.
H ₂ O			94 ml	

Tablo 2-8 : Jel Yürüme Tamponu (Running buffer 10X) içeriği

İçerik	Miktar
Trizma-baz	250 mM – 30 g
Glisin	1,92 M – 144 g
SDS	% 1 – 10g
H ₂ O	1 L

Transfer; Yürüme işlemi bitince cihaz kapatıldı ve kasetten jeller çıkartıldı. Jeldeki proteinlerin düşük floresans veren PVDF membranlara transferi için sünger-filtre kağıdı-jel-membran-filtre kağıdı-sünger içeren sandwich sistemi hazırlandı. PVDF membran, transfer öncesi 10 dk metanolde aktive edildi. Jeldeki proteinlerin membrana transferini sağlamak amacıyla %20 metanollü transfer buffer kullanılarak, buz içeren kutu içinde 0,250 mA de 1,5 saat ıslak transfer (wet transfer) yapıldı. Transfer buffer Tablo 2-9'da belirtilen malzemeler kullanılarak total hacim 1L olacak şekilde hazırlandı ve +4 °C'de saklandı. pH ayarlaması yapılmayan bu stok (10x) çözelti jel yürütüleceği zaman 10X'den 1X'e seyreltme yapılarak kullanıldı (100 ml 10X transfer buffer + 700 ml d.su + 200 ml Metanol).



Şekil 2-5 : PVDF Membran Transferi (Lodish and al. 2012).

Tablo 2-9 : Transfer tamponu (transfer buffer 10X) içeriği

İçerik	Miktar
Trizma-base	250 mM – 30.3 g
Glisin	1,92 M – 144 g
Metanol (Sadece 1X de)	%20 – 200 ml
H ₂ O	1 L

Membran ve Jel Kontrolü; Tablo 2-10'daki malzemelerle 100 ml hazırlanan Ponceau-O-S boyası ile membrana proteinlerin transfer olup olmadığı kontrol edildi. Ardından kırmızlık kalmasın diye distile su ile birkaç kez yıkandı. Jelde protein kalıp kalmadığını kontrol etmek amacı ile de jeller 30 dk Staining Solüsyonuna maruz bırakıldı. Staining solüsyonu Tablo 2-11'deki malzemelerle Final hacim 250 ml oluncaya kadar distile su ile tamamlanarak hazırlandı. Final solüsyon konsantrasyonu Coomassie blue R-250 %0.1, Etanol %40, Asetik asit %10 şeklinde hazırlandı. Oda sıcaklığında folyo ile sarılmış şişede saklandı. Ardından boyayı yıkamak için 30 dk de-staining solüsyona maruz bırakılarak jeldeki bantlarda protein olup olmadığının kontrolü yapıldı. De-staining solüsyon ise Tablo 2-12'de belirtilen malzemelerle final hacim 1000 ml oluncaya kadar distile su ile tamamlanarak hazırlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 2-10 : Ponceau-S solüsyonu içeriği

İçerik	Miktar
%0.1 Powder ponceau-S	5 mg
%5 Asetik asit	5 ml
H ₂ O	90 ml

Tablo 2-11 : Staining solüsyonu içeriği

İçerik	Miktar
Coomassie blue R-250	0.25 g
Etanol	100 ml
Asetik asit	25 ml
Distile su	100 ml

Tablo 2-12 : De-Staining solüsyonu içeriği

İçerik	Miktar
Etanol	400 ml
Asetik asit	100 ml
Distile su	500 ml

Bloklama ve primer-sekonder antikor inkübasyonu; Antikorların özgün olmayan bağlanmalarını azaltmak için membranlar 1:5 oranında hazırlanmış odyssey blocking buffer : %0.1 tween20'li TBS ile 1 saat shakerda bloke edildi. Böylece antikorların membranda yalnızca ilgilendiğimiz proteine bağlanma gücü arttı.

Tris tamponu (TBS) hazırlamak için Tablo 2-13'de belirtilen kimyasallar tartılarak distile suda çözüldü, total hacim 1L'ye tamamlandı. Böylece 1L 10X TBS stok hazırlandı ve +4 °C'de saklandı. Membran inkübasyonu ve yıkamalarda kullanılmak üzere 10x'den 1X'e seyreltme yapıldı. İçine %0.1 tween 20 (BioRad) eklendi. Yani 1X TBS-T (%0.1 tween içeren TBS) hazırlamak için 1000 ml lik 1X TBS içine 1 ml Tween20 eklendi. Odyssey blocking buffer ise hazır olarak alındı.

1 saat inkübasyon sonrası membranlar %0.1 tween eklenmiş TBS (TBS-T) solüsyonu ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Daha sonra 1:5 oranında odyssey bloking buffer : TBS 1X hazırlanan solüsyon içine %0.1 tween eklenerek, içine primer

antikor eklendi. Membranlar gece boyunca +4 °C'de shakerda inkübe edildiler. Ertesi gün, bağlanmayan primer antikorları uzaklaştırmak için membranlar 3 kez 5'er dakika süreyle tween içeren TBS ile yıkandıktan sonra, yine 1:5 oranında odyssey bloking buffer : TBS 1X + %0.1 tween içeren sekonder antikorla 1 saat oda sıcaklığında, karanlıkta shakerda inkübe edildi. Böylece primer antikora bağlı sekonder antikor kompleksi oluştu. İnkübasyon bitince membranlar, ortamda bağlanmadan kalan ve yüksek oranda özgül olmayan sinyal verilmesine neden olan antikorların ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla 3 kez 5'er dakika TBS-T 1X ile yıkandı. Farklı deney koşulları uygulanarak en uygun primer ve sekonder antikor, konsantrasyonu ve süresi araştırılarak en iyi sonuç veren bu koşullar tüm tavşan dokuları için uygulandı.

5-10 dakika kuruması beklenen membranlardaki bantlar Li-cor Odyssey infrared görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi. 700nm'de kırmızı ışımaya (dylight 680-antirabbit), 800 nm'de yeşil ışımaya (dylight 800-antimouse) veren primer antikora uygun sekonder antikorlar seçildi. Moleküler weight marker kırmızı ışımaya verdiği için buradaki ışımaya yerlerine metin ekleme opsiyonu kullanılarak molekül ağırlıkları ilgili yerlerin tam hizasında işaretlendi. Daha sonra kırmızı ve yeşil ışımalar, renkli veya siyah beyaz olarak görüntülendi. Bu elde edilen bantların analizi için Image J programı kullanıldı. İstatistiksel analizi için de GraphPad Prism 5 programı kullanıldı.

Tablo 2-13 : Tris tamponu (TBS – Tris Buffered Saline) içeriği

İçerik	Miktar
Trisma HCl	24.23 g
NaCl	80.06 g
H ₂ O	800 ml
pH	7.6
Total hacim	1 L

Dokularda çalışılan proteinlerin antikor inkübasyon protokolü şu şekildedir:

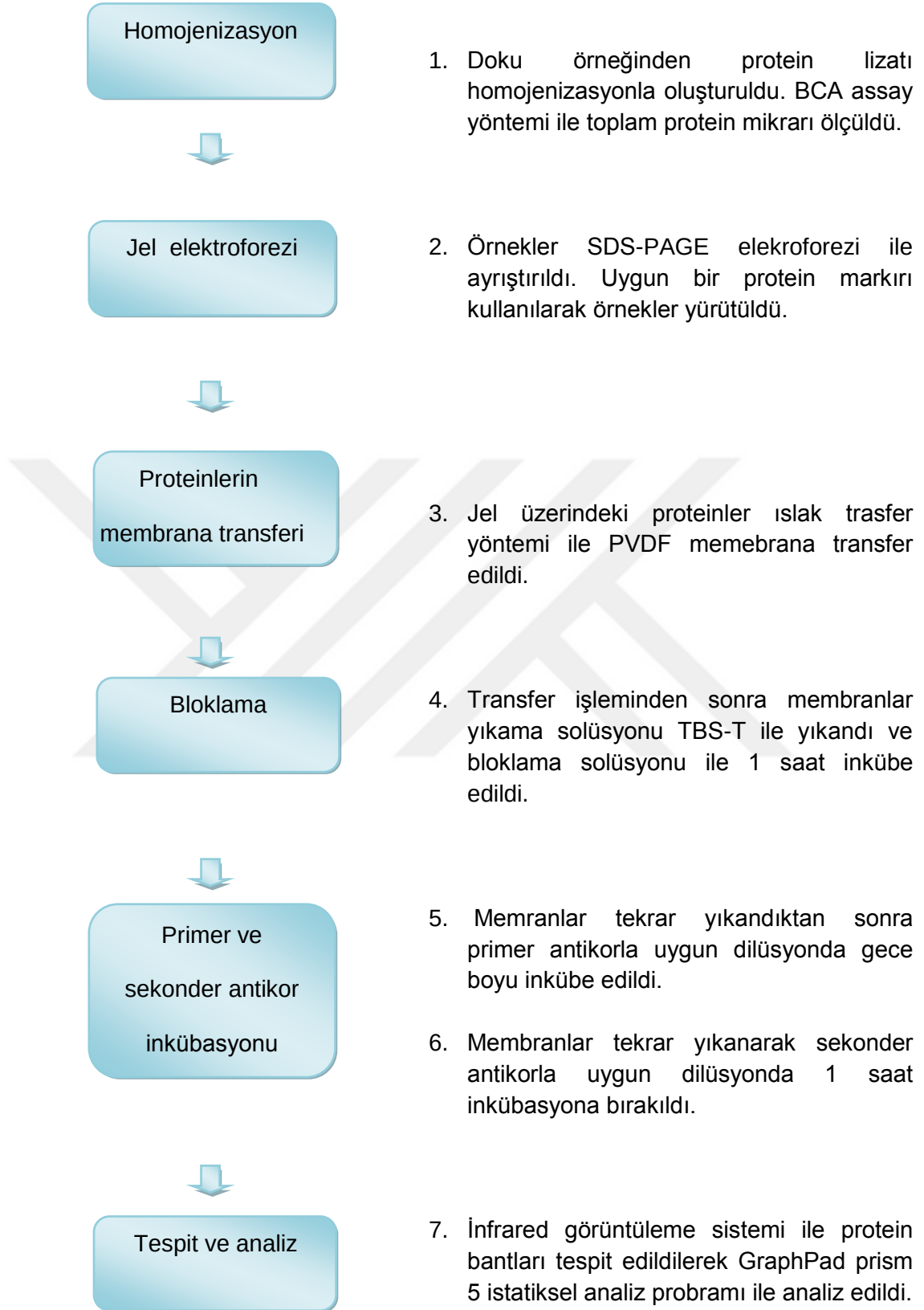
Primer antikor: eNOS (BD mouse, 610297) 1:500, gece boyu / Sekonder antikor: Anti-mouse IgG (rockland dylight 800, 610-745-124) 1:1000, 1h

Primer antikor Hsp90 (BD mouse, 610419) 1:2500, gece boyu / Sekonder antikor: Anti-mouse IgG (rockland dylight 800, 610-745-124) 1:1000, 1h

Primer antikor B-aktin (sigma, A2228) 1:50.000, 1h / Sekonder antikor: Anti-mouse IgG (rockland dylight 800, 610-745-124) 1:5000, 1h

Primer antikor Ampk (cell signaling rabbit, 2532) 1:1000, gece boyu / Sekonder antikor: Anti-rabbit IgG (rockland dylight 680, 611-744-127) 1:2500, 1h

Primer antikor Caveolin (BD mouse, 610057) 1:1000 gece boyu / Sekonder antikor: Anti-mouse IgG (rockland dylight 800, 610-745-124) 1:2500, 45 dk



Şekil 2-6 : Moleküler çalışma özeti

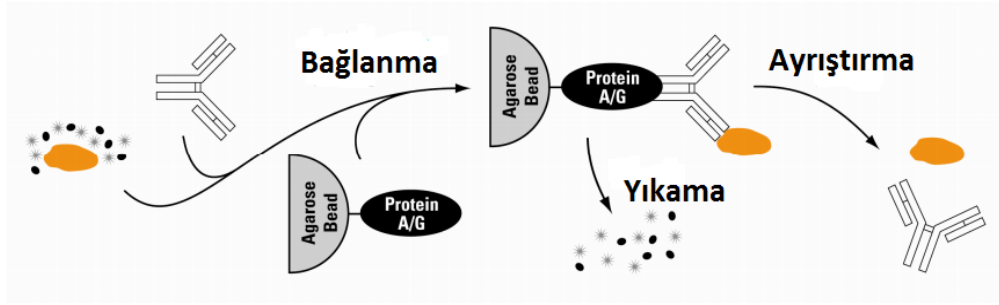
2.3.2. Eş-immünçöktürme (Ko-immunopresipitasyon, CoIP)

Karmaşık protein karışımından tek bir proteini izole etmek ve bu proteinin etkileşimde olduğu düşünülen proteini tespit etmek amacı ile protein miktarları belirlenen penil dokularda ko-immunopresipitasyon yöntemi kullanıldı. eNOS antikoru ile çöktürülen homojenatlar sadece eNOS ve ilişkili proteinler olduğu için, bu örneklerin yer aldığı membranların hsp90 primer antikorumla ile inkübasyonu sonrasında hsp90 bantlarının saptanması; ilgili örnekte sadece eNOS ile bağlı bulunan hsp90 yani hsp90-eNOS kompleksinin varlığını işaret edecektir.

eNOS çöktürmesi için, deneyden bir gün önce 750 µg protein içeren total homojenat filtreli efendorf tüplerine alındı ve homejenizasyon buffer ile 500 µl'ye tamamlandı. 500 µl olan IP örneklerinin herbirinin üzerine 8 µl eNOS antikoru (BD transduction lab rabbit, 610299) eklendi ve +4°C' de döner çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Deney günü total homojenatta hsp90 ve eNOS ekspresyon düzeylerinde karşılaştırma yapabilmek amacıyla aynı tavşanın penil dokusundan elde edilen homojenattan 100 µg inputlar (total lizat) hazırlandı (western blot örnek hazırlama protokolüyle). Bu inputlar hazırlanan IP örnekleri ile aynı jelde yürütüldü. IP örneklerinin herbirine 50 µl protein A/G plus agoroz beader (Santa cruz, 2003) eklenerek +4°C' de döner çalkalayıcıda 3 saat boyunca inkübe edildi. Böylece protein-antikor kompleksinin beadlere bağlanması sağlandı. Daha sonra beadlere bağlanmayan kısımları uzaklaştırmak için 500 µl immünçöktürme yıkama çözeltisi (IP washing buffer) ile 3 kez yıkama yapıp, düşük hızda 2000g'de 5 dakika santrifuj edilerek örnekler nonspesifik bağlanmalarından kurtarıldı. Her yıkamada süpernatantlar atıldı. Böylece Ko-immunopresipitasyon deneylerinin ilkesine göre filtreli tüplerin üst kısmındaki filtre üzerindeki pelette homojenatın eNOS ve ilişkili proteinleri içeren kısmı bulunmaktadır. Atılan süpernatant ise beadlere ve dolayısıyla IP yapılan antikora bağlanmayan kısımları içermektedir.

Tüm IP örnekleri 2X SDS örnek tampon çözeltisi içinde 5 dakika 95 °C'de inkübe edildikten sonra 10.000g de 5 dakika +4 °C 'de santrifüj edildi. Bu aşamada örneklerin de beadlerden arındırılması sağlanarak, süpernatantta sadece proteinler kaldı. Son aşamada Input ve IP örnekleri SDS-PAGE jel elektroforezine tabi tutuldu. Sonrasında western blot protokolü uygulanarak primer ve sekonder antikora maruz bırakıldı ve analiz edildi.

Hsp90-eNOS kompleksi: eNOS antikoru ile çöktürülen homojenatlar sadece eNOS ve ilişkili proteinler olduğu için, bu örneklerin yer aldığı membranların hsp90 primer antikoru ile inkübasyonu sonrasında hsp90 bantlarının saptanması; ilgili örnekte sadece eNOS ile bağlı bulunan hsp90 yani hsp90-eNOS kompleksinin varlığını işaret etmektedir.



Şekil 2-7 : Eş-immunçöktürme protein ayırma genel şeması.

2.3.3. Morfometri

Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aorta dokuları, %10' luk tamponlu formalinde bir gün fikse edildikten ve daha sonra tamamlanan doku takip işlemi sonrası parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan poli-L-lizin kaplı lamlara, 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler hematoksilin-eosin ile boyandı. Bu işlemler buraya kadar bir patoloji merkezininden sağlandı. Lamlardaki her bir damar segmentindeki alanlar mikroskopi sistemi kullanılarak Leica application suite version

2.5(LAS) programı ile 4x, 10x, 20x ve 40x büyütmede bilgisayar ortamına aktarıldı. Aktarılan görüntülerde lümen, intima ve medya alanları μm^2 cinsinden ölçülerek bir excell programına aktarıldı. GraphPad Prism 5 Project ile student t testi yapılarak normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik intimal alan karşılaştırması yapıldı.

Tablo 2-14: Deneylerde kullanılan ilaçlar

Kolesterol (Sigma,26740) : Her tavşan için günlük 2 g toz kolesterol tartıldı.
Zeytinyağı : Her tavşan için günlük 8 g tartıldı.
Sodyum pentobarbitalin (Abbott) : 250 mg tartılan toz sodyum pentobarbital %10'luk 10ml etanol çözeltisi içinde çözündürülerek hazırlandı (25 mg/mL).
İndometazin : 6,5 g toz indometazin tartılıp 1 mL %96'lık etanolde çözüldü. 1 L 1X krebs 160 μL eklenmesi ile indometezinli krebs çözeltisi hazırlandı.
Fluvastatin
17-DMAG(17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin): DMSO'da çözülerek 10mg/ml lik stoklar hazırlandı. -20 °C'de saklandı.
Radicicol (A.G. Scientific, Amerika): DMSO'da çözülerek 20mg/ml lik stoklar hazırlandı. -20 °C'de saklandı.
BCA (Bicinchoninic acid) Protein analiz kiti (Boster Immunoleader Co.Ltd, AR0146) : Bileşen B ve A 'den 1:50 oranında karışım hazırlanır.
BSA (Bovine Serum Albumin) (Boster Immunoleader Co.Ltd,10 mg, AR0146) : 10 mg/ml stok çözelti. BCA kiti içinde çıkıyor.
Odyssey blocking buffer (Li-cor Biosciences ,Q2771)

Tablo 2-15 : Deneylerde kullanılan araç ve gereçler

Bessman tip pulvarizer (BioSpec, 59012MS)
Zirconia bead (BioSpec Products, Inc. , 2 mm 11079124zx)
Homojenizatör (MiniBead Beater, Biospec products, TP-308 BSP 1003)
Santrifüj (Hettich Universal 320R Ref:1406)
Soğutmalı Santrifüj (Hettich Universal 320R Ref:1406)
Spektrofotometre (Perkin elmer Victor 3-multilabel counter)
Odyssey Infrared Görüntüleme Sistemi (LI-COR Biotechnology)
Western assay sistemi (Bio-rad®)
PVDF membran (Millipore IPFL PVDF membrane for LiCor, 0.45um)
Sıvı azot

2.4. İstatistik

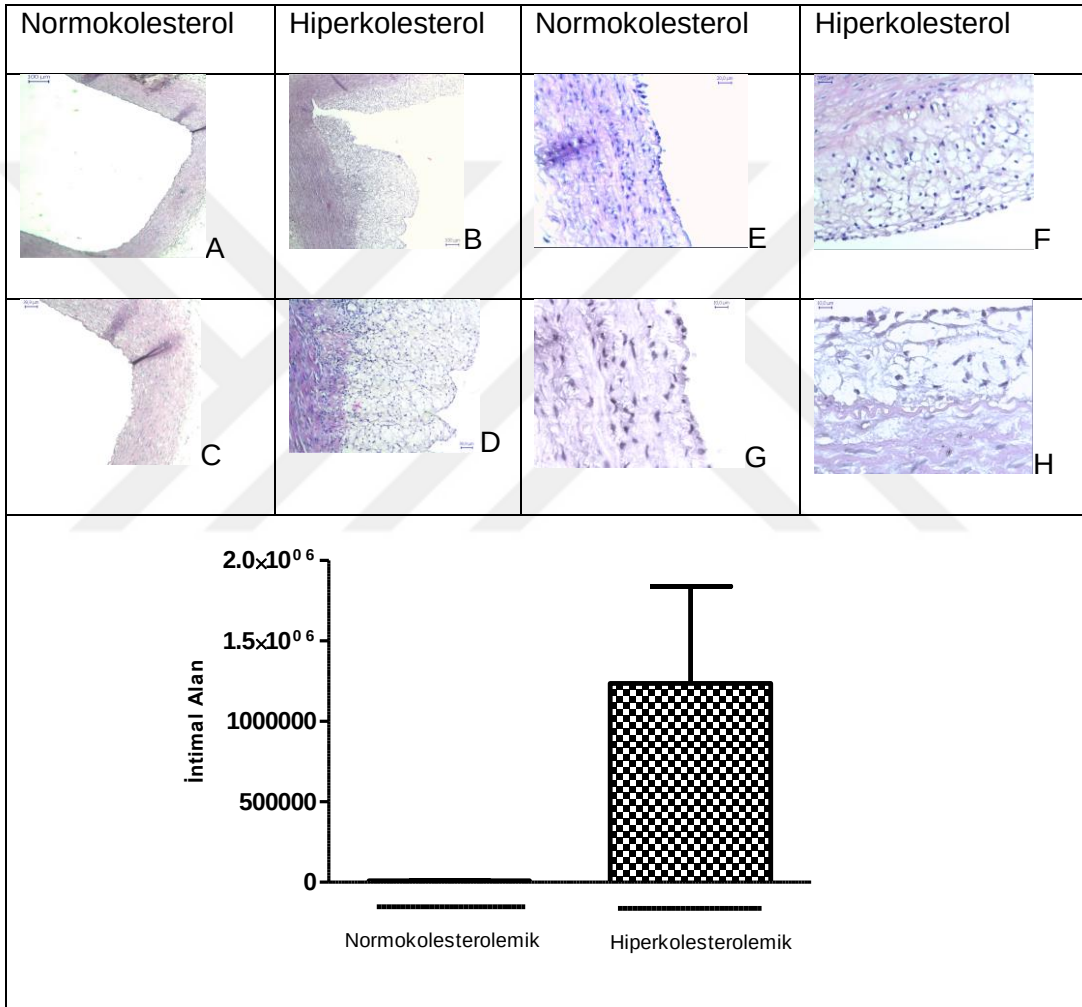
Bu çalışmada Li-cor Odyssey infrared görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenen bantların analizinde Image J (IJ 1.45m) programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizde “Student’s t testi (iki eş arasındaki farkın anlamlılık testi ve gruplar arası farkın anlamlılık testi)” kullanılmış ve “p” değeri 0,05’ten küçük olan karşılaştırmalar anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizlerde GraphPad 5 (Prism) programı kullanılmıştır.

BÖLÜM III

3. BULGULAR:

3.1. İntimal Kalınlaşma

3.1.1. Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında intimal alan



Şekil 3-1 : Aortada hemotoksilen eozin boyaması sonrası normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında ölçülen intimal alan değerlerini gösteren bar grafik ve temsili mikroskop görüntüleri, 4x (A,B), 10x (C,D), 20x (E,F), 40x (G,H).

Kolesterolce zengin diyetle besleme, tavşan aortasında intimal alanda anlamlı bir artışa neden olmuştur.

3.2. Hayvanların Ağırlıkları

Hayvan ağırlıkları kontrol ve kolesterolle beslenmiş gruplarda sırasıyla deney başında 2.169 ± 0.068 ve 2.157 ± 0.060 kg iken, deney sonunda $2,628 \pm 0.087$ ve 2.358 ± 0.129 kg olmuştur. Deney öncesi kontrol ve kolesterolce zengin diyetle beslenen grupta hayvanların ağırlıkları arasında anlamlı farklılık yoktur (2.169 ± 0.068 ve 2.157 ± 0.060 , kontrol ve hiperkolesterolemik). 6 haftalık süre sonunda her iki grupta da tavşanlar benzer biçimde ağırlık kazanmış ve deney sonunda iki grup arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($2,628 \pm 0.087$ ve 2.358 ± 0.129 , kontrol ve hiperkolesterolemik).

3.3. Hayvanların Kan Kolesterol Düzeyleri

6 hafta süreyle %2 kolesterolle besleme plazma kolesterol düzeylerini anlamlı düzeyde arttırmıştır.

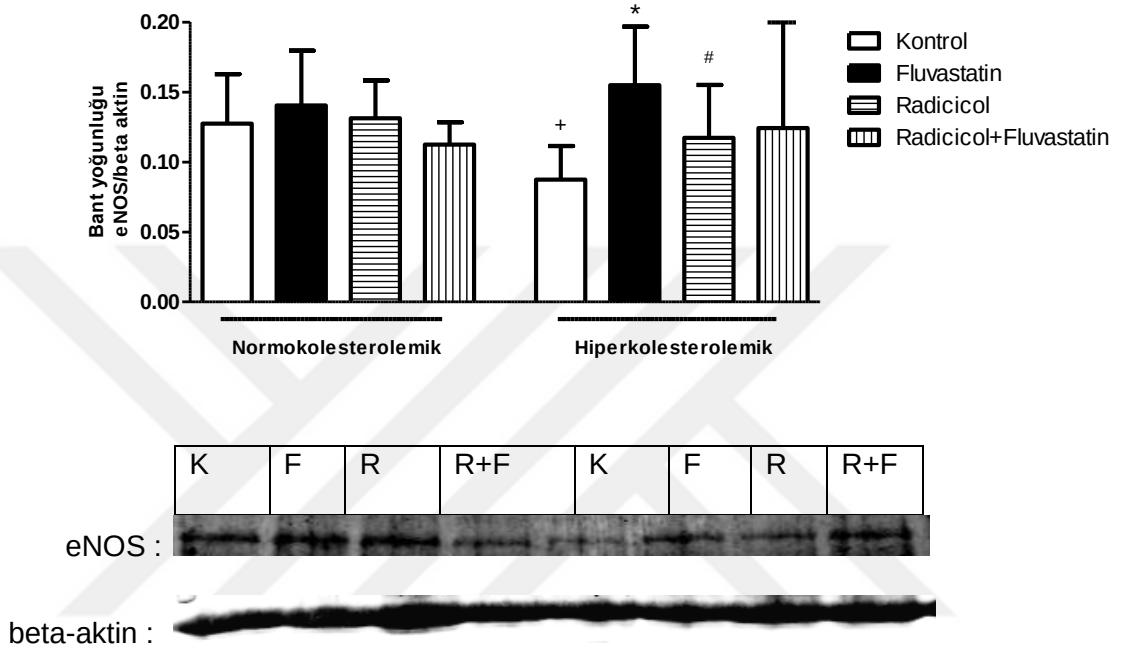
Tablo 3-1 : Kolesterol ile beslemenin serum kolesterol düzeyleri üzerine etkisi

	Total Kolesterol serum mg/ml	
	0. Gün	6. Gün
Kontrol Grubu	131.1 ± 11.57	108.9 ± 12.87
Kolesterol Grubu	173.7 ± 11.32	$1286 \pm 315.7^{***}$

*** $p < 0.0001$ kolesterol 0.gün ile 6. Gün karşılaştırılması, eşleştirilmiş t test

3.4. Western Blot Deneyleri

3.4.1. Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının eNOS ekspresyonu üzerindeki etkileri



Şekil 3-2 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının eNOS ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri. K:kontrol, R:Radicicol 10µg/ml, F:fluvastatin 30µM, R+F:radicicol 10µg/ml +fluvastatin 30µM 15 sa. Radicicol Fluvastatinden 3 sa önce uygulanmıştır.

Total homojenattaki image J programı aracılığıyla ölçülen eNOS ekspresyon düzeyleri beta aktine göre normalize edilerek verilmiştir.

+, $P < 0.05$, Normokolesterolemik Kontrol vs Hiperkolesterolemik Kontrol, $n=5$ eşleştirilmiş student t testi. *, $P < 0.05$, Hiperkolesterolemik grupta Kontrol vs Fluvastatin, $n=4$, eşleştirilmiş student t testi. #, $P < 0.05$, Hiperkolesterolemik grupta

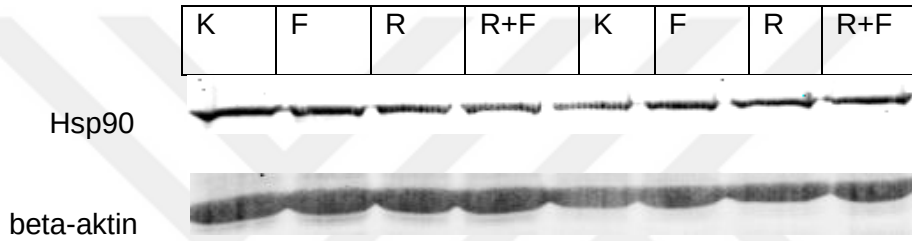
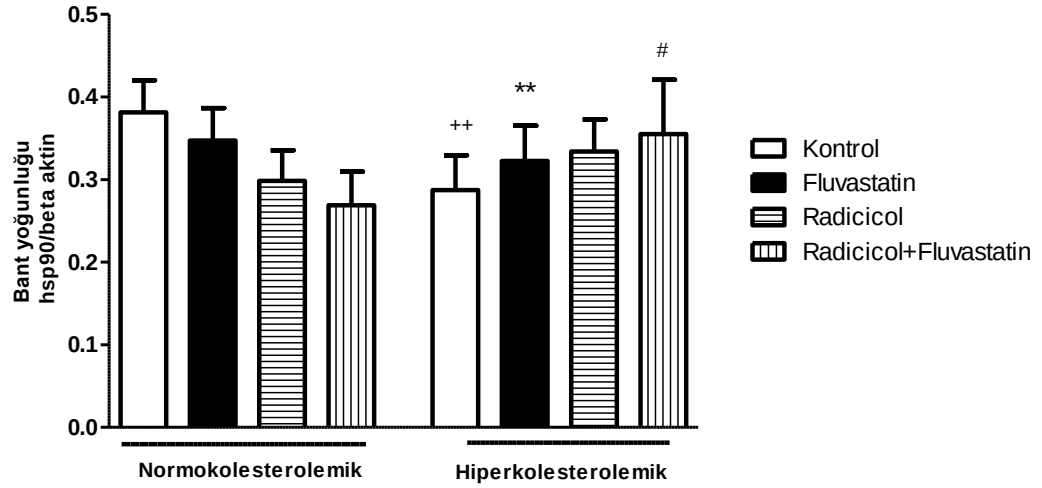
Kontrol vs Radiciol, n=5, eşleştirilmiş student t testi

eNOS ekspresyonu hiperkolesterolemik-kontrol aortada normokolesterolemik-kontrole göre azalmıştır ($^{\dagger}p<0.05$ eşleştirilmiş student t testi, n=5). Fluvastatinin ex-vivo uygulaması hiperkolesteroleminin neden olduğu eNOS ekspresyonlarındaki azalmayı geri çevirmiştir (* $p<0.05$, Hiperkolesterolemik grupta Kontrol vs Fluvastatin, n=4, eşleştirilmiş student t testi). Fluvastatinin bu etkisi sadece hiperkolesterolemi varlığında belirgin hale gelmiştir. Fluvastatinle birlikte hsp90 inhibitörü uygulaması ne NK grupta ne de HK grupta fluvastatinin neden olduğu eNOS ekspresyonlarındaki artışı değiştirmemiştir.

3.4.2. Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30 μ M ex-vivo fluvastatin uygulamasının Hsp90 ekspresyonu üzerindeki etkileri

Hsp90 ekspresyonu HK-Kontrol grubunda NK-Kontrole kıyasla azalmıştır ($^{\dagger}p<0.05$ eşleştirilmiş student t testi, n=9.) Fluvastatin uygulaması hiperkolesteroleminin neden olduğu hsp90 ekspresyonlarındaki azalmayı geri çevirmiştir (* $p<0.05$, Hiperkolesterolemik grupta Kontrol vs Fluvastatin, n=9, eşleştirilmiş student t testi).

HK grupta Radiciol hsp90 ekspresyonlarında değişikliğe neden olmamıştır ve hiperkolesterolemik grupta fluvastatinin radiciol ile birlikte uygulanması fluvastatinin neden olduğu hsp90 ekspresyonlarındaki artışı değiştirmemiştir ve HK grupta fluvastatinle birlikte hsp90 inhibitörü uygulaması HK-Kontrole kıyasla anlamlılığını korumaktadır.



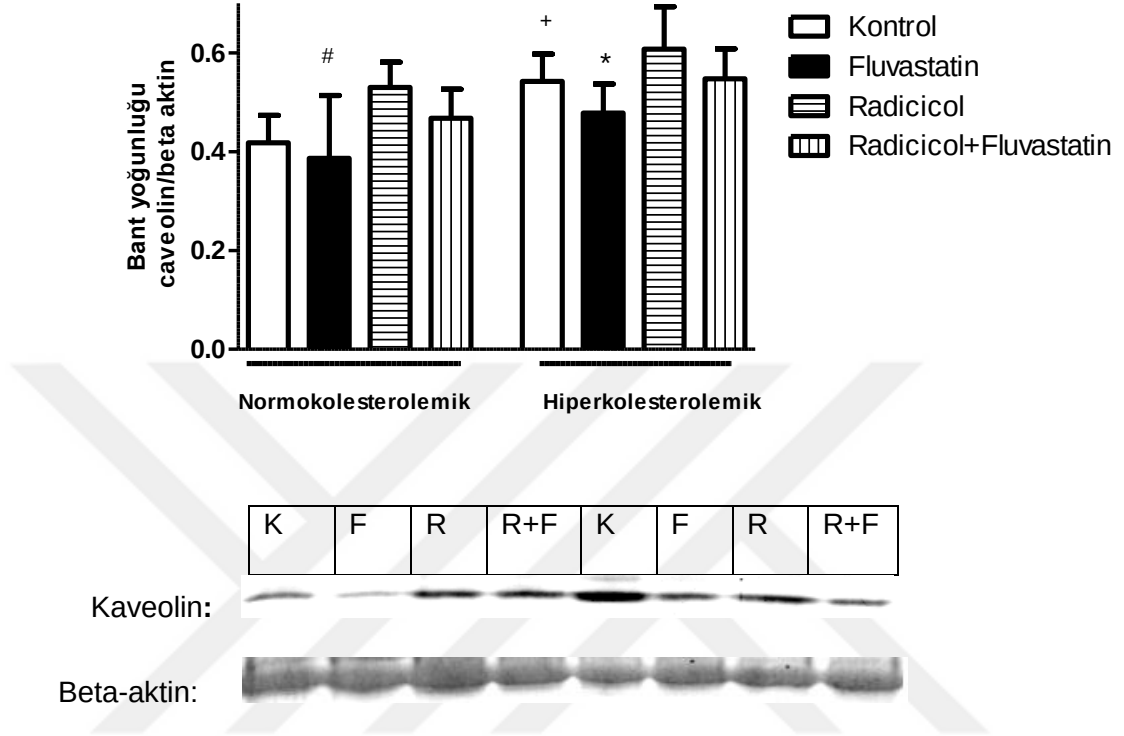
Şekil 3-3 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının hsp90 ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri . Total homojenattaki image J programı aracılığıyla ölçülen hsp90 ekspresyon düzeyleri beta aktine göre normalize edilerek verilmiştir. R:Radicol 10µg/ml, F:fluvastatin 30µM, R+F:radicol 10µg/ml +fluvastatin 30µM 15 sa. Radicol Fluvastatinden 3 sa önce uygulanmıştır.

+, $P < 0.05$, Normokolesterolemik Kontrol vs Hiperkolesterolemik Kontrol, $n=9$, eşleştirilmiş student t testi

*, $P < 0.05$, Hiperkolesterolemik grupta Kontrol vs Fluvastatin, $n=9$, eşleştirilmiş student t testi

#, $P < 0.05$, Hiperkolesterolemik grupta Kontrol vs Fluvastatin+Radicol, $n=4$, eşleştirilmemiş student t testi

**3.4.3. Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında
15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının Kaveolin
ekspresyonu üzerindeki etkileri**



Şekil 3-4 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının kaveolin ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri. R:Radicol 10µg/ml, F:fluvastatin 30µM, R+F:radicol 10µg/ml +fluvastatin 30µM 15 sa. Radicol Fluvastatinden 3 sa önce uygulanmıştır.

Total homojenattaki image J programı aracılığıyla ölçülen Kaveolin ekspresyon düzeyleri beta aktine göre normalize edilerek verilmiştir.

+++ , $P < 0.001$, Normokolesterolemik Kontrol vs Hiperkolesterolemik Kontrol, $n=8$, eşleştirilmiş student t testi

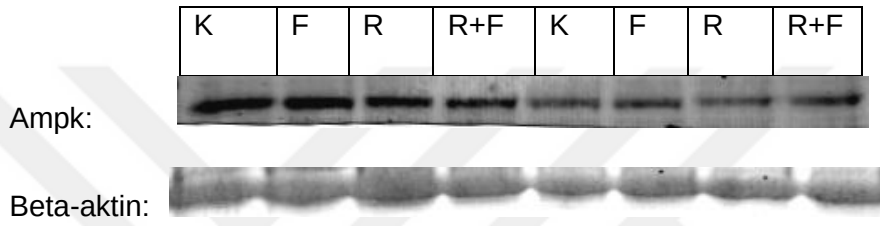
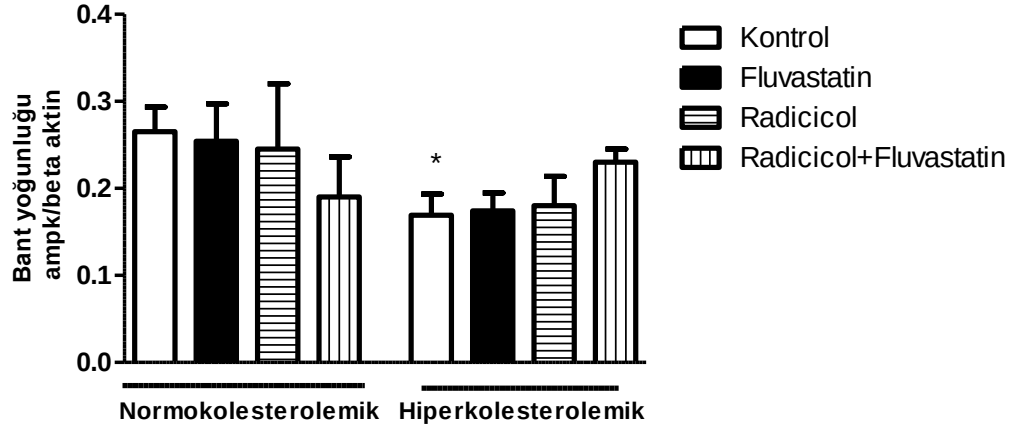
*, $P < 0.05$, Hiperkolesterolemik grupta Kontrol vs Fluvastatin, $n=8$, eşleştirilmiş student t testi

[#], P<0.05, Normokolesterolemik grupta Kontrol vs Fluvastatin, n=3, eşleştirilmiş student t testi

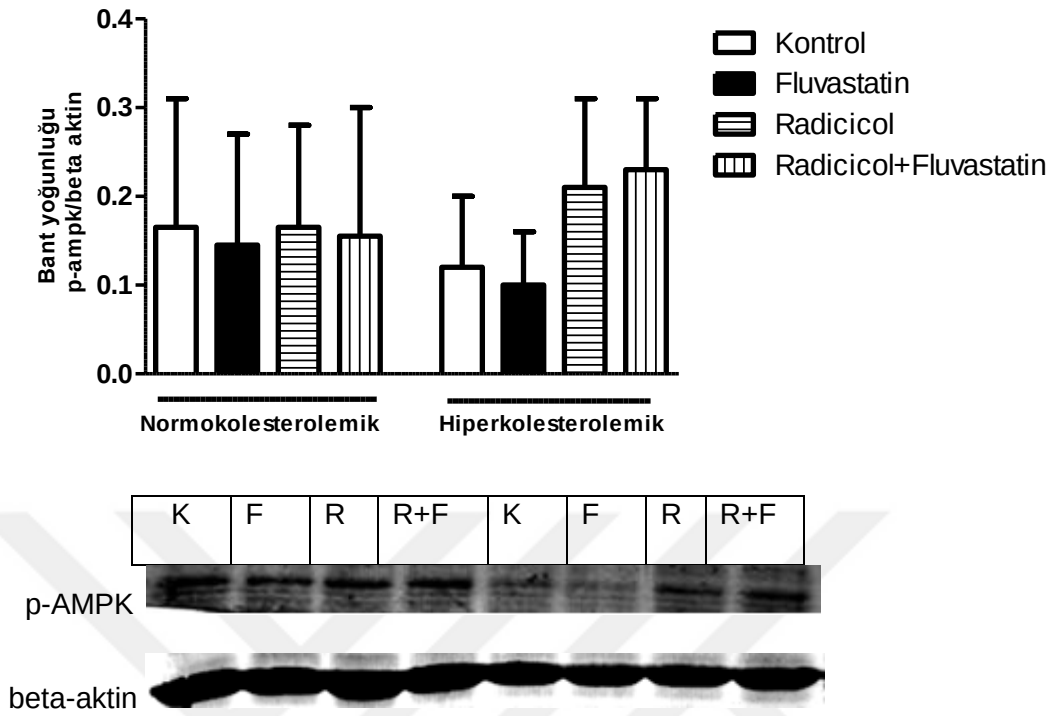
Kaveolin ekspresyonunun HK-Kontrolde NK-Kontrolle göre arttığı gözlenmiştir (+p<0.001 eşleştirilmiş student t testi, n=8.). Fluvastatin uygulaması hiperkolesteroleminin neden olduğu Kaveolin ekspresyonlarındaki artışı anlamlı ölçüde geri çevirmiştir (*p<0.05, HK grupta Kontrol vs Fluvastatin, n=8, eşleştirilmiş student t testi). Fluvastatinin kaveolin düzeyini azaltıcı etkisi NK grupta da görülmektedir ([#]p<0.05, NK grupta Kontrol vs Fluvastatin, n=3, eşleştirilmiş student t testi). Radicol ilavesi HK grupta fluvastatinin neden olduğu Kaveolin ekspresyonlarındaki azalmayı anlamlı bir şekilde değiştirmemiştir. Radicol uygulaması tek başına da kaveolin düzeylerinde bir değişikliğe neden olmamıştır.

3.4.4. Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının Ampk ve p-Ampk ekspresyonu üzerindeki etkileri

Ampk ekspresyonunun HK-Kontrolde NK-Kontrolle göre anlamlı ölçüde azaldığı görülmüştür (*p<0.05 eşleştirilmiş student t testi, n=10.) Fluvastatin ve Radicol uygulamaları ne NK grupta ne de HK da Ampk ekspresyonlarını değiştirmemiştir.



Şekil 3-5 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının ampk ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri . Total homojenattaki image J programı aracılığıyla ölçülen ampk ekspresyon düzeyleri beta aktine göre normalize edilerek verilmiştir. *, $P<0.05$, Normokolesterolemik Kontrol vs Hiperkolesterolemik Kontrol, $n=10$, eşleştirilmiş student t testi.

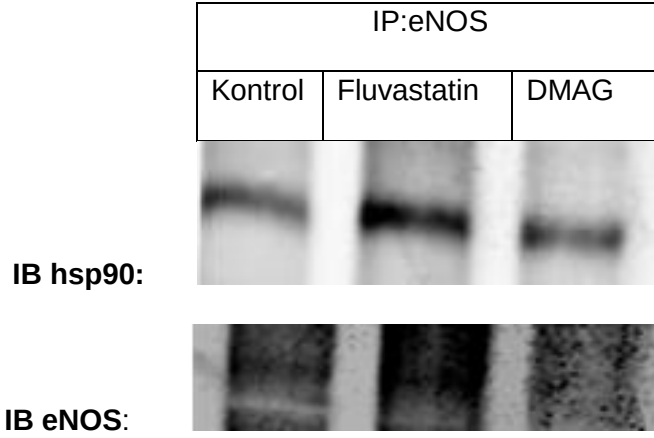


Şekil 3-6 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortasında 15 saat 30uM ex-vivo fluvastatin uygulamasının p-ampk ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri. Total homojenattaki image J programı aracılığıyla ölçülen Kaveolin ekspresyon düzeyleri beta aktine göre normalize edilerek verilmiştir. R:Radicicol 10µg/ml, F:fluvastatin 30µM, R+F:radicicol 10µg/ml +fluvastatin 30µM 15 sa. Radicicol Fluvastatinden 3 sa önce uygulanmıştır.

P>0.05, ns, Normokolesteromik Kontrol vs Hiperkolesteromik Konrol, n=2 eşleştirilmiş student t testi

p-Ampk ekspresyonunun NK grupta ve HK grupta anlamlı bir şekilde değişmediği gözlenmiştir.

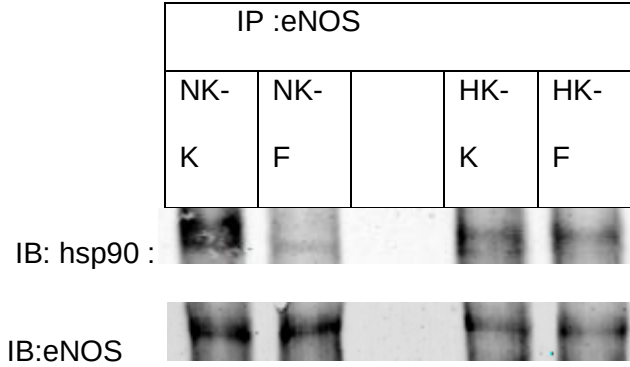
3.4.5. Tavşan penil dokusunda Hsp90-eNOS kompleksinin varlığı



Şekil 3-7 : Tavşan penil dokusunda hsp90-eNOS kompleksi. Fluvastatin ve DMAG (fluvastatin;30µM 3saat, DMAG;1µg/ml 1saat) uygulanan normokolesterolemik tavşan penil dokusunda eNOS antikoru ile immünçöktürme yapılmış homojenatlarında hsp90 ve eNOS bantları. IP örnekler ;750µg

İmmunpresipitasyon eNOS ile yapılan penil dokuda immunblotlama hsp90 ile yapıldığında, hsp90 bantlarının gözlemlendiği dolayısı ile eNOS ile hsp90 kompleksinin varlığı gösterilmiştir.

3.4.6. Tavşan aorta dokusunda hsp90-eNOS kompleks varlığı



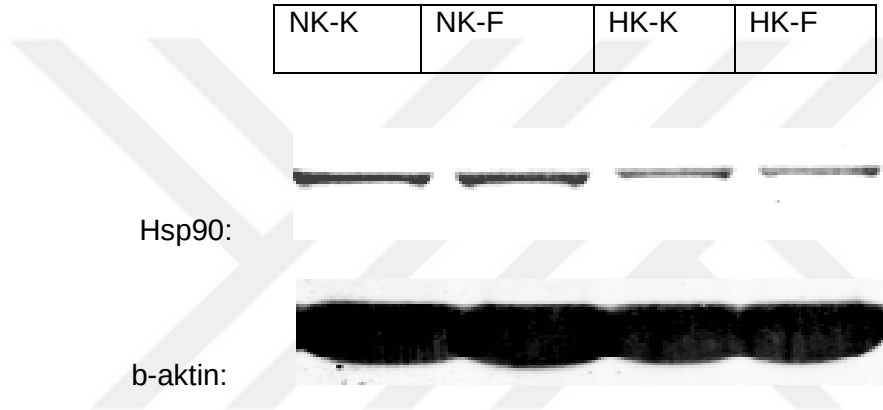
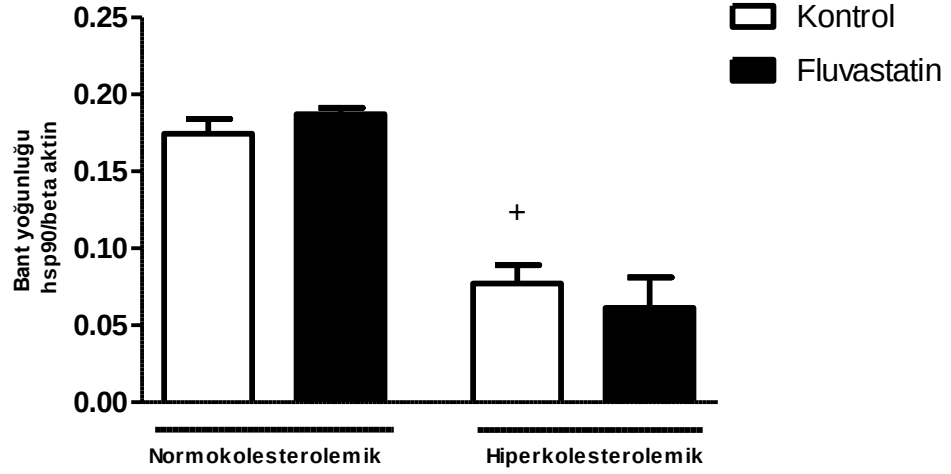
Şekil 3-8 : Tavşan aorta dokusunda hsp90-eNOS kompleksi. Fluvastatin (fluvastatin;30µM, 15saat) uygulanan normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aorta dokusunda eNOS antikoru ile immünçöktürme yapılmış homojenatlarında hsp90 ve eNOS bantları. IP örnekleri;750µg

eNOS ile immünpresipitasyonun ardından hsp90 ile immünblotlama yapılan aorta dokularında hsp90 bantlarının varlığı aortadaki hsp90-eNOS kompleksinin varlığını göstermektedir.

3.4.7. Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan femoral arterinde hsp90 ve eNOS western blot sonuçları

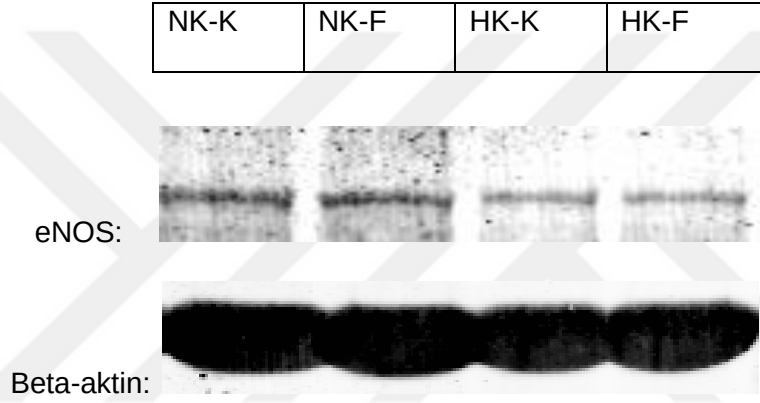
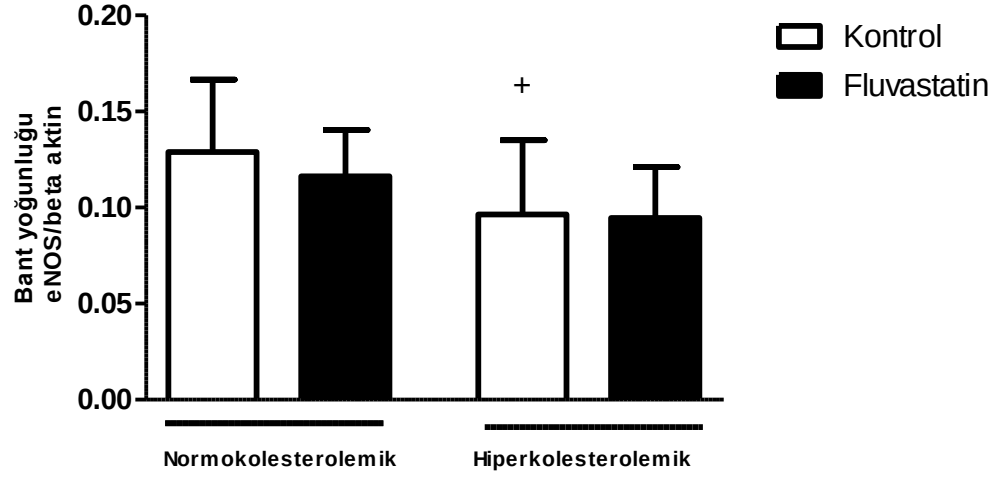
Hsp90 bantları hiperkolesterolemik kontrol grubunda normokolesterolemik kontrol grubuna göre azalmıştır. Fluvastatinin uygulanması her iki grupta hsp90 ekspresyonlarında anlamlı değişiklik göstermemiştir.

Femoral arterde aortadakinden farklı olarak fluvastatin uygulaması hsp90 ekspresyonlarındaki azalmayı tersine çevirmemiştir.



Şekil 3-9 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan femoral arterinde 3 saat 30 μ M ex-vivo fluvastatin uygulamasının hsp90 ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri. Total homojenattaki image J programı aracılığıyla ölçülen hsp90 ekspresyon düzeyleri beta aktine göre normalize edilerek verilmiştir.

+, $P < 0.05$ Normokolesterolemik Kontrol vs Hiperkolesterolemik Kontrol, $n=3$, eşleştirilmiş student t testi.



Şekil 3-10 : Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan femoral arterinde 3 saat 30 µM ex-vivo fluvastatin uygulamasının eNOS ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren bar grafik ve temsili western blot bant görüntüleri. Total homojenattaki image J programı aracılığıyla ölçülen eNOS ekspresyon düzeyleri beta aktine göre normalize edilerek verilmiştir.

+, $P < 0.05$, Normokolesterolemik Kontrol vs Hiperkolesterolemik Kontrol, $n=4$, eşleştirilmiş student t testi

eNOS bantları hiperkolesterolemik kontrol grubunda normokolesterolemik kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. HK grupta femoral arterde fluvastatin uygulaması eNOS ekspresyonlarındaki azalmayı değiştirmemiştir.

BÖLÜM IV

4. TARTIŞMA

4.1. Hiperkolesterolemiye bağlı ateroskleroz modeli oluşturulması

6 hafta süreyle %2 kolesterolle besleme periyodunda kontrol ve kolesterol grubundaki hayvanların serum kolesterol düzeyleri sonuçlarına bakıldığında kolesterolü grupta kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir (108.9 ± 12.87 vs 1286 ± 315.7 , $n=8$, $p<0.001$ student t test).

Normokolesterolemik ve hiperkolesterolemik tavşan aortalarında immünohistokimyasal yöntemle hemotoksilen-eozin boyamaları sonrası alan ölçümleri, kolesterolce zengin diyetle beslemenin, tavşan aortasında intimal alanda anlamlı bir artışa neden olduğunu göstermektedir. Bu da literatürde belirtildiği gibi hiperkolesterolemiye bağlı ateroskleroz oluştuğunun göstergesidir.

4.2. eNOS ve regülasyonunda rol alan proteinler

Bu çalışmada hiperkolesterolemik aortada NOS regülasyonunda rol alan bazı proteinlerin (eNOS, hsp90, AMPK, kaveolin-1) ekspresyon düzeylerinde değişim olup olmadığı ve kolesterol düzeyinde değişikliğe neden olmayan ex-vivo fluvastatin uygulanmasının hiperkolesterolemiye bağlı görülen eNOS regülatuar proteinlerinin ekspresyonlarını etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Ayrıca hiperkolesterolemi ve fluvastatin uygulamasına bağlı görülebilecek eNOS regülatuar proteinleri üzerindeki değişikliklerin damar türüne göre değişip değişmediğini incelemek üzere çalışmalarımız hem aorta hem de femoral arterde gerçekleştirilmiştir.

4.3. Hsp90 ve Kaveolin

Çalışmamızda, hiperkolesterolemik tavşan aortasında Hsp90 ekspresyonunun normokolesterolemik-Kontrol grubuna göre azaldığını kaveolin ekspresyonunun ise arttığını gösterdik. Bu durum, hiperkolesterolemiye bağlı gelişen endotelial disfonksiyona hsp90 aracılı eNOS aktivasyonundaki azalma ve kaveolin aracılı eNOS aktivasyonunun inhibisyonundaki artışın da katkısının olabileceğini göstermektedir. Gerçekten de bu tez kapsamı dışında laboratuvarımızda yapılan başka bir çalışmada hiperkolesterolemik aortada endotele bağlı gevşemelerin azaldığını ve hsp90 inhibitörlerinin normal diyetle beslenen tavşanların damarlarında gevşeme yanıtlarını inhibe ederken hiperkolesterolemik grupta zaten azalmış olan eNOS kaynaklı gevşemeleri daha da ileri düzeyde azaltmadığını gözlemledik. Bu tezde elde ettiğimiz sonuçlar fonksiyonel verileri destekleyecek şekilde hiperkolesterolemik grupta zaten azalmış olan hsp90 ekspresyonları nedeniyle hsp90'ın aktive ettiği eNOS gevşemelerinin azalmış olabileceğini ve bu durumda hsp90 inhibitörünün ilave bir inhibisyona neden olmadığını destekler niteliktedir. Literatürde çalışmamızdakini destekler şekilde Hiperkolesterolemik sıçan aorta (Zhu, Li et al. 2013) ve penil dokusunda (Bakircioglu, Hsu et al. 2000) kaveolin ekspresyonlarında artışın olduğu bildirilmiştir.

Fluvastatin uygulamasının ise hiperkolesteroleminin neden olduğu hsp90 ekspresyonlarındaki azalmayı ve kaveolin düzeylerindeki artışı geri çevirdiği gösterilmiştir. Laboratuvarımızda yapılan diğer çalışma kapsamında yapılan vasküler reaktivite deneylerinde de fluvastatinin ex-vivo uygulanmasının hiperkolesterolemiye bağlı azalan eNOS kaynaklı gevşemeleri düzettiği gösterilmiştir. Bu çalışmamızın sonuçları diğer çalışmayı destekleyecek şekilde hiperkolesterolemik aortada fluvastatinin neden olduğu endotelial gevşeme yanıtlarındaki iyileşmeye hsp90 ekspresyonlarındaki artışın da katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda hiperkolesteroleminin sadece

aortada değil aynı zamanda femoral arterlerde de benzer şekilde hsp90 ekspresyonlarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Aortada bu azalmanın fluvastatinin ex-vivo tedavisi ile aortada ortadan kalktığına bulunması, hiperkolesterolemiye bağlı görülen endotelial gevşeme yanıtlarındaki azalmanın hsp90 aracılı eNOS aktivasyonunun azalmasından kaynaklanabileceğini ve bu etkinin kolesterol düşürücü etkiden bağımsız olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda endotel ve düz kas hücrelerinin toplamını içeren aorta dokusunda hiperkolesterolemik grupta hsp90 düzeylerinin azaldığı bulunmasına rağmen, literatürde insan aterosklerotik damarların endotel tabakasında hsp90 ekspresyonlarında azalma değil artış görüldüğü bildirilmiştir. Ancak bu artışın daha çok fibrotik cap kısmında yoğunlaştığı bildirilmiştir. Çalışmalar arasındaki farklılık hem bizim çalışmamızda IHC ile değil göreceli olarak kantitasyonu daha yüksek bir metod olan western blot yöntemi kullanılması hem de toplam aortadaki hsp90 ekspresyonlarının incelenmesinden kaynaklanmaktadır. Uzun süre sadece endotelde üretildiği sanılan ve bu nedenle endotelial NOS olarak anılan eNOS'un daha sonraları düz kas hücrelerinde de üretildiği gösterilmiştir (Chatterjee, Gangula et al. 1996). Bu nedenle çalışmamızın sonuçları literatür ışığında değerlendirildiğinde patolojik durumlarda düz kas hücrelerindeki hsp90'ın azalması ve buna bağlı olarak düz kasdaki eNOS'un hsp90 aracılı aktivitesindeki azalma önemli hale gelebileceğine işaret edebilir.

2013 yılının sonunda yayınlanan bir çalışma bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir. Söz konusu çalışmada kolesterolce zengin diyetle beslenerek ateroskleroz oluşturulan apoE^{-/-} farelerin serumlarında hsp90 ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (Uyy, Ivan et al. 2013). Söz konusu çalışmada fluvastatin 10 mg/kg ile 2 haftalık oral tedavinin hsp90 ekspresyonlarındaki azalmayı geri çevirdiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları destekler nitelikte fluvastatinin aterosklerozdaki yararlı etkilerine hsp90'ın aracılık edebileceği

fikrini vermektedir. Bizim çalışmamızda fluvastatin tedavisinin ex vivo olarak uygulanmış olması fluvastatinin bu etkisinin kolesterol düşürücü etkiden bağımsız olduğunu göstermektedir. Fluvastatinin pulmoner hipertansiyondaki yararlı etkilerinin azalan hsp90-eNOS kompleks oluşumunu arttırması ve artan kaveolin-eNOS kompleksini azaltmasına bağlı eNOS'un aktivitesini arttırmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Murata, Kinoshita et al. 2005). Statinlerin eNOS üzerindeki etkilerinin kaveolin-eNOS kompleksi üzerindeki negatif ve hsp90-eNOS üzerindeki pozitif etkilerine bağlı geliştiğini ilk gösteren çalışma ise 2001 yılında Brouet ve arkadaşları tarafından makrovasküler endotel hücrelerinde yapılmıştır (Brouet, Sonveaux et al. 2001). Bu çalışmada atorvastatinin hsp90 ekspresyonlarını arttırdığı gösterilmiştir. İlginç olarak atorvastatin uygulamasının makrovasküler endotel hücrelerinde hsp90-eNOS kompleks oluşumunu arttırırken mikrovasküler endotel hücrelerinde bu etkinin gözlemlenmediği ve bu nedenle statinlerin etkilerinin dokuya bağımlı olabileceği ileri sürülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda sadece aorta değil aynı zamanda farklı bir damar olan femoral arterde fluvastatinin hsp90 üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bizim çalışmamızda fluvastatinin aortada gösterilen hsp90 ekspresyonlarını artırıcı etkisi femoral arterde gözlemlenmemiştir.

Atorvastatin uygulamasının HUVEC (İnsan umbilikal ven endotel hücreleri)'de hsp90 ekspresyonunu arttırdığı ve statinlerin anjiyogenezi artırıcı etkilerinin hsp90 inhibitörü geldanamycin varlığında geri döndüğü Brouet ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bildirilmiştir (Brouet, Sonveaux et al. 2001).

eNOS'un içinde bulunduğu protein – protein etkileşimlerinde yer alan hsp90'ın eNOS'u aktive ederken eNOS'un kaveolin tarafından inhibisyonuna da engel olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda hsp90 inhibitörü varlığında fluvastatinin hsp90 düzeyini artırıcı etkisi değişmemiştir. Hsp90 inhibitörleri etkilerini ekspresyon düzeyini değiştirerek değil, hsp90'ın aktivitesini ve ilişkideki proteine bağlanmasını engelleyerek gösterdikleri için, western blot sonuçlarına bakarak, fluvastatinin

kaveolin düzeylerinde yaptığı azalmanın hsp90 ekspresyonu ile ilişkili olmadığı yorumu yapılamaz.

Literatürde de yer alan bu bilgiler ışığında bizim çalışmamızda hiperkolesterolemik tavşan aortasında görülen hsp90 ekspresyonlarındaki azalma ve kaveolin ekspresyonundaki artışın ex-vivo fluvastatin tedavisi ile geri çevrilmesi statinlerin aterosklerotik aortadaki yararlı etkilerine hsp90'ın ve kaveolinin aracılık ettiği fikrini vermektedir.

4.4. eNOS

Bizim çalışmamızda da 6 hafta süreyle kolesterolle beslenen tavşanların eNOS ekspresyonu hiperkolesterolemik-kontrol aortada Normokolesterolemik-Kontrolle göre azaltmıştır. Fluvastatinin ex-vivo uygulaması hiperkolesterominin neden olduğu eNOS ekspresyonlarındaki azalmayı geri çevirmiştir. Fluvastatinin bu etkisi sadece hiperkolesterolemi varlığında belirgin hale gelmiştir. Femoral arterde de ise eNOS ekspresyonları hiperkolesterolemik kontrol grubunda normokolesterolemik kontrol grubuna göre azalmış ve fluvastatinin uygulanması eNOS ekspresyonlarındaki azalmayı geri çevirmemiştir.

Kolesterolce zengin diyetle beslemenin aortada eNOS ekspresyonlarında önemli derece azalmaya neden olduğu (Feron, Dessy et al. 1999) in-vivo serivastatin (Jimenez, Arriero et al. 2001) uygulamasının bu azalmayı geri çevirdiği çalışmalarda gösterilmiştir. Andreadou ve arkadaşları simvastatin veya paravastatinin normokolesterolemik grupta eNOS ve Akt fosforilasyonuna neden olurken hiperkolesterolemik hayvanlarda sadece paravastatinin eNOS ve Akt 'yi fosforillediği gösterilmiştir (Kaesemeyer, Caldwell et al. 1999).

Hiperkolesterolemik tavşanların femoral arterlerinde vazodilatasyonun ve eNOS ekspresyonlarının da azaldığı gösterilmiştir(Jen, Chan et al. 2002). Egzersizin

endotel hücrelerde Ca^{2+} salınımını arttıran eNOS protein ekspresyonlarını arttırarak endotelyal fonksiyonu düzelttiği gösterilmiştir.

Ancak bazı çalışmalarda da kolesterolce zengin diyetle beslemenin sıçan aortası (Zhu, Li et al. 2013), sıçan penil dokusu (Bakircioglu, Hsu et al. 2000) ve tavşan aortasında (Rajamannan, Subramaniam et al. 2005) eNOS ekspresyonlarını değiştirmedeği halde, tavşanda statin tedavisinin eNOS ekspresyonunu hiperkolesterolemik grupta artırdığı rapor edilmiştir. Ancak eNOS aktivitesinin hiperkolesterolemik tavşan penil dokusunda (Xie, Kontos et al. 2005) ve aortasında azaldığını gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (Andreadou, Farmakis et al. 2012). eNOS ekspresyon düzeylerinin hiperkolesterolemiden etkilenmediğini gösteren çalışmalarda kolesterol metabolizması farklı olan sıçan kullanılması veya tavşanlarda kısa süre veya düşük konsantrasyonda kolesterolle beslenmeden kaynaklanabilir.

4.5. Ampk

AMPK aktivitesini stimüle etme kapasitesinde olan Adenozin analogu AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) tedavisinin hiperkolesterolemik aortada AMPK aktivasyonundaki azalmayı geri çevirerek vasküler gevşeme yanıtlarını arttığı gösterilmiştir (Li, Zhang et al. 2010).

Sıçan torasik aortalarında AMPK'nın inhibitörle engellenmesinin endotelyum bağımlı gevşeme inhibe ettiği ve eNOS protein ekspresyonu azalttığı bildirilmiştir (Turkseven and Ertuna 2013),

Çalışmamızda Ampk ekspresyonu hiperkolesterolemik kontrol grubunda normokolesterolemik kontrole göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu azalmaya p-AMPK düzeylerindeki azalmanın da eşlik ettiği gözlemlenmiştir. Ancak fluvastatin uygulaması ne normokolesterolemik grupta ne de hiperkolesterolemik grupta Ampk ekspresyonlarını değiştirmemiştir. Bu sonuçlar, laboratuvarımızda aynı modelde

yaptığımız fonksiyonel çalışmalarda görülen ex-vivo fluvastatin uygulamasının aterosklerozda neden olduğu yararlı vasküler etkilere AMPK'nin aracılık etmediğini düşündürmektedir.

4.6. Hsp90 - eNOS

Endotelial fonksiyon bozukluklarının görüldüğü çeşitli patolojilerde öncelikle erektil disfonksiyon ve aterosklerozda endotelial nitrik oksit sentazın fonksiyonlarını düzgün bir şekilde yerine getirebilmesi için protein-protein etkileşimlerinin son derece önemli olduğu tartışılmakta ve araştırılmaktadır. Heteromerik kompleks incelendiğinde eNOS'un hem Hsp90 hem de kaveolin ile etkileştiği ancak Hsp90 ve kaveolinin birbirleriyle etkileşmediği eNOS'un bu kompleksi bir arada tutan bir köprü rolü oynadığı gözlenmiştir (Ramirez-Sanchez, Aguilar et al. 2012) . Dolayısı ile eNOS, kaveolin-1 ve Hsp90'nın aynı komplekste yer aldığı yapılan birçok çalışmada söylenmektedir. Ayrıca statinlerin endotelial disfonksiyonda eNOS aktivasyonu sağlayarak hsp90-eNOS kompleksini arttırdığı veya arttırmadığı , dokuya özgü değişkenlik gösterip göstermediği ve kolesterol düşürücü etkileri ile ateroskleroza bağlı disfonksiyonu tedavi edip etmediği araştırılmıştır (Brouet, Sonveaux et al. 2001; Gokkaya, Ozden et al. 2008).

Kalsiyum içermeyen ortamda, insan koroner arter endotelial hücrelerinde (HCAEC) (Ramirez-Sanchez, Aguilar et al. 2012) , kardiyak hastalıklar ve kan akışını iyileştirdiği bilinen epicatechin (EPI) veya Ca^{+2} bağımlı eNOS aktivatörü bradikinin (BK) tedavisinin HSP90/AKT/eNOS aktivitelerini uyararak intraselüler kalsiyum ve NO miktarını arttırdığı gösterilmiştir.

2003 yılında Takahashi ve arkadaşları (Takahashi and Mendelsohn 2003), sığır aortik endotelial hücrelerde (BAECs), Hsp90, Akt ve eNOS kompleks varlığını göstermiştir. Hsp90'nın Akt aracılı eNOS fosforilasyonunu ve düşük Ca^{+2} miktarını aktive ederek arttırdığı, Hsp90 yokluğunda Akt'nin eNOS kompleksinde yer almadığı,

ancak Hsp90 varlığında aktif ve aktif olmayan Akt'nin eNOS ile ilişki içinde olduğu gözlenmiştir. eNOS'un olmadığı koşullarda Hsp90 ve Akt'nin ilişkili olduğu, eNOS ile immunprespitasyonun yapıldığında süpernatantlar incelenerek gösterilmiş ve Hsp90'a çok az miktarda rastlanırken, Akt'nin de izlerinin var olduğu gösterilmiş. Hsp90 immunprespitasyonundan sonra ise, süpernatantta %10-15 oranında eNOS'a rastlanırken Akt'ye hiç rastlanmamıştır. Bu da Akt'nin Hsp90 ile çok sıkı ilişki içinde olduğunu ve eNOS ile birlikte üçlü kompleks bir yapı oluşturduklarını göstermektedir. Geldamisin tedavisi ile Hsp90-eNOS bağı bozularak, Akt ile eNOS kompleks oluşumu engellenmiş ve eNOS'un Ser-1179 noktasında fosforillenmesi önlenmiştir.

Sığır kronik endotel hücreleri (BCEC), hsp90 inhibitörü Geldanamisin ile tedavi edildikten sonra kalsiyum iyonoforla uyarılmış. Geldanamisin uyarılmış eNOS aracılı NO üretimini önemli derecede azalttığı, O₂ üretimini artırdığı gözlenmiştir. Bu da hsp90'nın eNOS ile ilişkide olduğunu gösteren bir başka çalışmadır (Pritchard, Ackerman et al. 2001).

Brouet ve arkadaşları (Brouet, Sonveaux et al. 2001), statinlerin eNOS üzerindeki aktive edici etkilerinin dokuya özgü değişkenlik gösterdiği, atorvastatin aortik endotel hücrelerinde kaveolin/eNOS etkileşimini azaltırken kardiyak mikrovasküler hücrelerde aynı etkiyi göstermediği gözlenmiştir. Kardiyak mikrovasküler hücrelerde atorvastatin uygulamasının hsp90/eNOS etkileşimini artırdığı ve buna bağlı olarak eNOS aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir.

Statinlerin kolesterol düşürücü etkileri ile ateroskleroza bağlı erektil disfonksiyonu tedavi ettiği düşünülmektedir (Gokkaya, Ozden et al. 2008). Biz bu çalışmamızda tavşan penil ve aorta dokularında Hsp90-eNOS kompleks varlığı ve hsp90-eNOS kompleksi üzerinde hiperkolesteroleminin ve fluvastatin tedavisinin etkileri araştırılmıştır. Normokolesterolemik tavşan penil dokusunda eNOS-hsp90 kompleksinin varlığı gösterilmiş ve fluvastatinin bu kompleks oluşumunu artırdığı bulunmuştur.

Tavşan aortasında hiperkolesterolemik grupta hsp90/eNOS bant oranının Normokolesterolemik-Kontrol grubuna göre azaldığı, bir başka deyişle eNOS bağımlı hsp90 düzeylerinin azaldığı görülmüştür. Fluvastatinin 30 µM 15 saat uygulamasının hiperkolesteroleminin oluşturduğu hsp90-eNOS kompleksindeki azalmayı geri çevirmediği gözlemlenmiştir.

Bu sonuçlar, hiperkolesterolemik aortada eNOS, kaveolin ve hsp90 ekspresyonlarında meydana gelen değişikliklerin fluvastatin tarafından geri çevrilmesinin hsp90-eNOS etkileşiminden bağımsız olabileceğini ancak hiperkolesterolemik aterosklerozda gelişen endotelial disfonksiyonda hsp90 aracılı eNOS aktivitesindeki azalmanın sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Hsp90 proteininin ATP bağlama bölgesini inhibe ederek hsp90 aktivitesini azalttığı bilinen hsp90 inhibitörlerinin kendi başlarına eNOS, hsp90 ve kaveolin ekspresyonları üzerinde etki göstermediği bulunmuştur.

BÖLÜM V

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda 6 hafta %2 kolesterolce zengin diyetle beslenmenin hiperkolesterolemiye ve bununla ilişkili olarak aortada intimal kalınlaşmaya neden olduğu gösterilerek hiperkolesterolemik ateroskleroz oluşumu gösterilmiştir. Hiperkolesterolemik tavşanlarda, farklı damar yataklarında Hsp90, eNOS, kaveolin ve AMPK ekspresyonları incelendiğinde, hiperkolesterolemik aortada kaveolin ekspresyonu artarken eNOS, hsp90 ve AMPK ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Hiperkolesterolemik femoral arterde eNOS ve hsp90 ekspresyonlarının anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Fluvastatin uygulaması ise aortada eNOS ve hsp90 ekspresyonlarındaki azalmayı tersine çevirirken, AMPK ekspresyonundaki azalmayı geri çevirmemiştir. Femoral arterde ise eNOS ve hsp90 ekspresyonlarındaki azalmayı değiştirmemiştir. Hiperkolesterolemik tavşan aortasında görülen hsp90 ekspresyonlarındaki azalma ve kaveolin ekspresyonundaki artışın ex-vivo fluvastatin tedavisi ile geri çevrilmesi statinlerin aterosklerozdaki yararlı etkilerine hsp90'ın ve kaveolinin aracılık edebileceği fikrini vermektedir. Fluvastatin tedavisinin hipolipidemik etkilerinden bağımsız olarak hem eNOS hem de hsp90 düzeylerini artırarak hsp90 aracılı eNOS aktivasyonunda artışa ve kaveolini azaltarak kaveolin aracılı eNOS inhibisyonunda azalmaya neden olabileceğini ve buna bağlı olarak eNOS'u aktive edip aortadaki endotelial disfonksiyonda yararlı olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda hiperkolesterolemik aterosklerozda hsp90 düzeylerinin düştüğünün bulunması ateroskleroz hem erken teşhisinde hem de tedavisinde hsp90'ın önemli olabileceğine işarte etmektedir.

BÖLÜM VI

6. ÖZET

Kardiyovasküler hastalıklar dünyadaki önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Hiperkolesterolemi, hipertansiyon, tip II diyabet, ateroskleroz gibi pek çok patolojik durumun hem nedeni hem sonucu olarak endotelial fonksiyon bozuklarının ortaya çıkması çok yaygın bir problemdir. Endotelial disfonksiyona bağlı olarak da gelişebilen erektil disfonksiyon da artık kardiyovasküler hastalıklarda bir marker olarak görülmeye başlanmıştır.

Çalışmamızda 6 hafta süreyle %2 kolesterolce zengin diyetle beslenen tavşanların aorta ve femoral arterlerinde ex-vivo olarak hsp90 inhibitörü ve/veya fluvastatin (30 μ M ex-vivo, 3 saat ve 15 saat) inkübasyonunun normal diyetle beslenen tavşanlarınkine kıyasla eNOS ve regülasyonunda rol alan proteinlerin (hsp90, eNOS, kaveolin-1 ve AMPK) ekspresyon düzeylerindeki değişim western blot yöntemiyle incelenmiştir. Ayrıca tavşan penil doku ve aortasında hsp90-eNOS kompleks varlığı ko-immunopresipitasyon deneyleriyle gösterilmiştir. Çalışmada kan kolesterol düzeyleri spektrofotometrik olarak ve aortadaki intimal alan değişiklikleri morfometrik olarak ölçülmüştür.

Çalışmamızda 6 hafta %2 kolesterolce zengin diyetle beslenmenin hiperkolesterolemi ve bununla ilişkili olarak aortada intimal kalınlaşmaya neden olduğu gösterilerek hiperkolesterolemik ateroskleroz oluşturulduğu ortaya konmuştur. Hiperkolesterolemik aorta ve femoral arter dokularında kaveolin ekspresyonunun artarken eNOS, hsp90 ve AMP-aktif protein kinazın ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Fluvastatin uygulaması aortada eNOS ve hsp90 ekspresyonlarındaki azalmayı tersine çevirirken femoral arterde bunu değiştirmemiştir. Fluvastatin hiperkolesterolemik aortada AMPK

ekspresyonundaki azalmayı geri çevirmemiştir. Hiperkolesterolemik tavşan aortasında görülen hsp90 ekspresyonlarındaki azalma ve kaveolin ekspresyonundaki artışın ex-vivo fluvastatin tedavisi ile geri çevrilmesi statinlerin aterosklerozdaki yararlı etkilerine hsp90'ın ve kaveolinin aracılık ettiği fikrini vermektedir.

Sonuçlarımız, fluvastatin tedavisinin hipolipidemik etkilerinden bağımsız olarak hem eNOS hem de hsp90 düzeylerini artırarak hsp90 aracılı eNOS aktivasyonunda artışa ve kaveolini azaltarak kaveolin aracılı eNOS inhibisyonunda azalmaya neden olabileceğini ve buna bağlı olarak eNOS'u aktive edip aortadaki endotelial disfonksiyonda yararlı olabileceğini göstermektedir. Öte yandan Hsp90 proteininin ATP bağlanma bölgesini inhibe ederek hsp90 aktivitesini azalttığı bilinen hsp90 inhibitörlerinin kendi başlarına eNOS, hsp90 ve kaveolin ekspresyonları üzerinde etki göstermediği bulunmuştur.

Ayrıca çalışmamızda tavşan penil ve aorta dokusunda eNOS-Hsp90 kompleksinin varlığı ko-immünpresipitasyon yöntemi ile gösterilmiştir. Ayrıca hiperkolesterolemiye bağlı gelişen aterosklerozda aortada hsp90-eNOS kompleks oluşumunun azaldığı görülmüştür.

Çalışmamızda hiperkolesterolemik aterosklerozda hsp90 ve hsp90-eNOS düzeylerinin düştüğünün bulunması hsp90'ın aterosklerozun tedavisinde yeni bir hedef olarak önemli olabileceğine işaret edebilir.

Anahtar sözcükler: hiperkolesterolemi, eNOS, hsp90, kaveolin, ampk, tavşan, aorta, femoral arter

6. ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading causes of death in the world. Endothelial dysfunction is a very common problem and it is both reason and the result of hypercholesterolemia, hypertension, type II diabetes atherosclerosis and many other pathological conditions. Erectile dysfunction may due to endothelial dysfunction and it has been started to be accepted as a marker of cardiovascular diseases.

In this study, the effect of hsp90 inhibitor and/or ex-vivo as fluvastatin (30 μ M ex-vivo, 3 h and 15 h) incubation in aorta and femoral arteries of 6 weeks % 2 high-cholesterol diet fed rabbits compared to the normal diet fed rabbits on the expression levels of eNOS and regulatory proteins (hsp90, eNOS, caveolin-1 ve AMPK) were investigated by western blot method. Beside hsp90-eNOS complex formation in rabbit penile tissues and aorta were demonstrated by co-immunoprecipitation. Blood cholesterol levels were measured spectrophotometrically and intimal area changes in aorta were measured morphometrically.

In our study, 6 weeks % 2 high-cholesterol diet fed caused hypercholesterolemia and as a result of this, intimal thickening in aorta. It has been shown that caveolin expression has been increased whereas AMP-activated protein kinase expression have been significantly decreased in hypercholesterolemic aorta and femoral artery tissues. Fluvastatin treatment reversed the reduction of expression in eNOS and hsp90 in hypercholesterolemic aorta but not in femoral artery. Fluvastatin did not effect the decrease in AMPK expressions in the hypercholesterolemic aorta.

The reversal effects of fluvastatin on the reduced hsp90 and augmented caveolin expressions in hypercholesterolemic rabbit aorta suggest that hsp90 and caveolin has been mediated to the beneficial effects of atherosclerosis of statin.

Our results show that, fluvastatin treatment, independent from hypolipidemic effects, may increase eNOS and hsp90 expression to cause eNOS activation through hsp90 and decrease caveolin expression which causes disinhibition of eNOS activity. These may explain why it can be beneficial in endothelial dysfunction in aorta. On the other hand it has been found that Hsp90 inhibitors which are known to reduce the activity of hsp90 by binding to ATP binding region have no effects on eNOS, hsp90 and caveolin expressions on their own.

The presence of eNOS-hsp90 complex in normocholesterolemic rabbit penile and aortic tissues have been shown by co-immunoprecipitation technique in our study. Further we have shown that hsp90-eNOS complex formation is decreased in hypercholesterolemic aorta. Decreased hsp90 and hsp90-eNOS complex formation in atherosclerotic aorta may suggest hsp90 as a new target for treatment.

Key words: : hypercholesterolemia, eNOS, hsp90, caveolin, ampk, rabbit, aorta, femoral artery

BÖLÜM VII

7. YARARLANILAN KAYNAKLAR

- (2012). "Proteinlerin Elektroforetik Saflaştırılması - Poliakrilamid Jel Elektroforezi." 19.
- Abu-Soud, H. M. and D. J. Stuehr (1993). "Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10769-10772.
- Aji, W., S. Ravalli, et al. (1997). "L-arginine prevents xanthoma development and inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice." Circulation **95**(2): 430-437.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper, et al. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.
- Andreadou, I., D. Farmakis, et al. (2012). "Short-term statin administration in hypercholesterolaemic rabbits resistant to postconditioning: effects on infarct size, endothelial nitric oxide synthase, and nitro-oxidative stress." Cardiovasc Res **94**(3): 501-509.
- Atalay, M., N. K. Oksala, et al. (2004). "Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats." J Appl Physiol (1985) **97**(2): 605-611.
- Azadzoï, K. M., I. Goldstein, et al. (1998). "Mechanisms of ischemia-induced cavernosal smooth muscle relaxation impairment in a rabbit model of vasculogenic erectile dysfunction." J Urol **160**(6 Pt 1): 2216-2222.
- Bakircioglu, M. E., K. Hsu, et al. (2000). "Effect of a Chinese herbal medicine mixture on a rat model of hypercholesterolemic erectile dysfunction." J Urol **164**(5): 1798-1801.
- Bakircioglu, M. E., K. D. Sievert, et al. (2001). "Decreased trabecular smooth muscle and caveolin-1 expression in the penile tissue of aged rats." J Urol **166**(2): 734-738.
- Barrios-Gonzalez, J. and R. U. Miranda (2010). "Biotechnological production and applications of statins." Appl Microbiol Biotechnol **85**(4): 869-883.
- Bauer, P. M., D. Fulton, et al. (2003). "Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase." J Biol Chem **278**(17): 14841-14849.
- Beg, Z. H., D. W. Allmann, et al. (1973). "Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol." Biochem Biophys Res Commun **54**(4): 1362-1369.
- Behr-Roussel, D., J. Bernabe, et al. (2002). "Distinct mechanisms implicated in atherosclerosis-induced erectile dysfunction in rabbits." Atherosclerosis **162**(2): 355-362.
- Bjoerklund MM, Hollensen AK, et al. (2014). "Induction of Atherosclerosis in Mice and Hamsters Without Germline Genetic Engineering."
- Bocan, T. M., S. B. Mueller, et al. (1993). "The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation." Atherosclerosis **102**(1): 9-22.
- Boger, R. H., S. M. Bode-Boger, et al. (1998). "Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits." Atherosclerosis **136**(1): 67-77.
- Bolotina, V. M., S. Najibi, et al. (1994). "Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle." Nature **368**(6474): 850-853.

- Boo, Y. C., G. P. Sorescu, et al. (2003). "Endothelial NO synthase phosphorylated at SER635 produces NO without requiring intracellular calcium increase." Free Radic Biol Med **35**(7): 729-741.
- Booth, R. F., J. F. Martin, et al. (1989). "Rapid development of atherosclerotic lesions in the rabbit carotid artery induced by perivascular manipulation." Atherosclerosis **76**(2-3): 257-268.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1990). "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(2): 682-685.
- Brouet, A., P. Sonveaux, et al. (2001). "Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells." J Biol Chem **276**(35): 32663-32669.
- Brouet, A., P. Sonveaux, et al. (2001). "Hsp90 and Caveolin Are Key Targets for the Proangiogenic Nitric Oxide-Mediated Effects of Statins 10.1161/hh2201.100319." Circ Res **89**(10): 866-873.
- Brouet, A., P. Sonveaux, et al. (2001). "Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins." Circ Res **89**(10): 866-873.
- Brown, B. G., X. Q. Zhao, et al. (1993). "Lipid lowering and plaque regression. New insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease." Circulation **87**(6): 1781-1791.
- Bucci, M., J. P. Gratton, et al. (2000). "In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation." Nat Med **6**(12): 1362-1367.
- Bucci, M., F. Roviezzo, et al. (2005). "Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 904-908.
- Burnett, A. L. (1995). "Nitric oxide control of lower genitourinary tract functions: a review." Urology **45**(6): 1071-1083.
- Burnett, A. L., C. J. Lowenstein, et al. (1992). "Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection." Science **257**(5068): 401-403.
- Businaro, R., E. Profumo, et al. (2009). "Heat-shock protein 90: a novel autoantigen in human carotid atherosclerosis." Atherosclerosis **207**(1): 74-83.
- Busse R, M. A. (1990). "Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin." FEBS Lett.: 265(261-262).
- Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res **87**(10): 840-844.
- Camejo, G., E. Hurt-Camejo, et al. (1998). "Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis." Atherosclerosis **139**(2): 205-222.
- Cao, S., J. Yao, et al. (2003). "The proline-rich domain of dynamin-2 is responsible for dynamin-dependent in vitro potentiation of endothelial nitric-oxide synthase activity via selective effects on reductase domain function." J Biol Chem **278**(8): 5894-5901.
- Carling, D., V. A. Zammit, et al. (1987). "A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis." FEBS Lett **223**(2): 217-222.
- Carlson, C. A. and K. H. Kim (1973). "Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation." J Biol Chem **248**(1): 378-380.
- Chatterjee, A., C. Snead, et al. (2008). "Heat shock protein 90 inhibitors attenuate LPS-induced endothelial hyperpermeability." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294**(4): L755-763.

- Chatterjee, S., P. R. Gangula, et al. (1996). "Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-III in reproductive organs of female rats during the oestrous cycle." Histochem J **28**(10): 715-723.
- Chen, F., D. Pandey, et al. (2011). "Hsp90 regulates NADPH oxidase activity and is necessary for superoxide but not hydrogen peroxide production." Antioxid Redox Signal **14**(11): 2107-2119.
- Chen, J. X., M. L. Lawrence, et al. (2004). "HSP90 and Akt modulate Ang-1-induced angiogenesis via NO in coronary artery endothelium." J Appl Physiol **96**(2): 612-620.
- Chen, J. X. and B. Meyrick (2004). "Hypoxia increases Hsp90 binding to eNOS via PI3K-Akt in porcine coronary artery endothelium." Lab Invest **84**(2): 182-190.
- Chen, Z., I. C. Peng, et al. (2009). "AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633." Circ Res **104**(4): 496-505.
- Chlopicki, S., V. I. Kozlovski, et al. (2005). "Compensation of endothelium-dependent responses in coronary circulation of eNOS-deficient mice." J Cardiovasc Pharmacol **46**(1): 115-123.
- Coleman, J. W. (2001). "Nitric oxide in immunity and inflammation." Int Immunopharmacol **1**(8): 1397-1406.
- d'Uscio, L. V., T. A. Baker, et al. (2001). "Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(6): 1017-1022.
- d'Uscio, L. V., L. A. Smith, et al. (2001). "Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxations in common carotid arteries of apolipoprotein e-deficient mice." Stroke **32**(11): 2658-2664.
- Delbin MA, Davel AP, et al. (2012). "Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats." PLoS One. 2012;7(12):e53318. doi: [10.1371/journal.pone.0053318](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053318). **7**(12): e53318.
- den Dekker, W. K., D. Tempel, et al. (2014). "Effect of shear stress alteration on atherosclerotic plaque vulnerability in cholesterol-fed rabbits." Vasc Med **19**(2): 94-102.
- Dimmeler, S., I. Fleming, et al. (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature **399**(6736): 601-605.
- Drab, M., P. Verkade, et al. (2001). "Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice." Science **293**(5539): 2449-2452.
- Endemann, D. H. and E. L. Schiffrin (2004). "Endothelial dysfunction." J Am Soc Nephrol **15**(8): 1983-1992.
- Endo, A. (2010). "A historical perspective on the discovery of statins." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **86**(5): 484-493.
- Endo A, Kuroda M, et al. (1976). "Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity." FEBS Lett. 1976 Dec **31**;72(2):323-6.
- Endres, M., U. Laufs, et al. (1998). "Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8880-8885.
- Erwin, P. A., D. A. Mitchell, et al. (2006). "Subcellular targeting and differential S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase." J Biol Chem **281**(1): 151-157.

- Everson, W. V. and E. J. Smart (2001). "Influence of caveolin, cholesterol, and lipoproteins on nitric oxide synthase: implications for vascular disease." Trends Cardiovasc Med **11**(6): 246-250.
- Fenyo, I. M., I. C. Florea, et al. (2011). "Tyrostatin AG490 reduces NADPH oxidase activity and expression in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice." Vascul Pharmacol **54**(3-6): 100-106.
- Feron, O., L. Belhassen, et al. (1996). "Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells." J Biol Chem **271**(37): 22810-22814.
- Feron, O., C. Dessy, et al. (2001). "Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance." Circulation **103**(1): 113-118.
- Feron, O., C. Dessy, et al. (1999). "Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase." J Clin Invest **103**(6): 897-905.
- Feron, O., F. Saldana, et al. (1998). "The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle." J Biol Chem **273**(6): 3125-3128.
- Fibbi, B., A. Morelli, et al. (2008). "Atorvastatin but not elocalcitol increases sildenafil responsiveness in spontaneously hypertensive rats by regulating the RhoA/ROCK pathway." J Androl **29**(1): 70-84.
- Finking, G. and H. Hanke (1997). "Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research." Atherosclerosis **135**(1): 1-7.
- Fisslthaler, B. and I. Fleming (2009). "Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells." Circ Res **105**(2): 114-127.
- Fleming, I. and R. Busse (2003). "Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **284**(1): R1-12.
- Frank, P. G. and M. P. Lisanti (2004). "Caveolin-1 and caveolae in atherosclerosis: differential roles in fatty streak formation and neointimal hyperplasia." Curr Opin Lipidol **15**(5): 523-529.
- Fukuchi, M. and A. Giaid (1999). "Endothelial expression of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in human coronary artery disease. Specific reference to underlying lesion." Lab Invest **79**(6): 659-670.
- Fukumura, D., T. Gohongi, et al. (2001). "Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2604-2609.
- Fulton, D., J. E. Church, et al. (2005). "Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83." J Biol Chem **280**(43): 35943-35952.
- Fulton, D., J. P. Gratton, et al. (1999). "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt." Nature **399**(6736): 597-601.
- Fulton, D., J. P. Gratton, et al. (2001). "Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough?" J Pharmacol Exp Ther **299**(3): 818-824.
- Fuster, V., L. Badimon, et al. (1992). "The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and the Acute Coronary Syndromes." New England Journal of Medicine **326**(4): 242-250.
- Garcia-Cardena, G., R. Fan, et al. (1998). "Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90." Nature **392**(6678): 821-824.
- Garcia-Cardena, G., P. Martasek, et al. (1997). "Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo." J Biol Chem **272**(41): 25437-25440.
- Georg Wick and C. Grundtman (2011). "Inflammation and Atherosclerosis." Inflammation and Atherosclerosis: 138.

- Gocmen, C., A. Secilmis, et al. (1998). "A possible role of S-nitrosothiols at the nitrergic relaxations in the mouse corpus cavernosum." Eur J Pharmacol **361**(1): 85-92.
- Gokkaya, S. C., C. Ozden, et al. (2008). "Effect of correcting serum cholesterol levels on erectile function in patients with vasculogenic erectile dysfunction." Scand J Urol Nephrol **42**(5): 437-440.
- Graf, G. A., S. V. Matveev, et al. (1999). "Class B scavenger receptors, caveolae and cholesterol homeostasis." Trends Cardiovasc Med **9**(8): 221-225.
- Gratton, J. P., P. Bernatchez, et al. (2004). "Caveolae and caveolins in the cardiovascular system." Circ Res **94**(11): 1408-1417.
- Gratton, J. P., J. Fontana, et al. (2000). "Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1." J Biol Chem **275**(29): 22268-22272.
- Gratton, J. P., M. I. Lin, et al. (2003). "Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice." Cancer Cell **4**(1): 31-39.
- Gulec, S. (2007). "Statinlerin Etkinligi (Efficacy of statins)." Türk Kardiyol Dern Arfl - Arch Turk Soc Cardiol **35** Suppl 1:8-14.
- Halkin, A., I. S. Lossos, et al. (1996). "HMG-CoA reductase inhibitor-induced impotence." Ann Pharmacother **30**(2): 192.
- Hamelin, B. A. and J. Turgeon (1998). "Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors." Trends Pharmacol Sci **19**(1): 26-37.
- Harris, M. B., H. Ju, et al. (2001). "Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation." J Biol Chem **276**(19): 16587-16591.
- Henderson, K. K., J. R. Turk, et al. (2004). "Endothelial function in coronary arterioles from pigs with early-stage coronary disease induced by high-fat, high-cholesterol diet: effect of exercise." J Appl Physiol (1985) **97**(3): 1159-1168.
- Henry, G. D., R. Byrne, et al. (2000). "Intracavernosal injections of vascular endothelial growth factor protects endothelial dependent corpora cavernosal smooth muscle relaxation in the hypercholesterolemic rabbit: a preliminary study." Int J Impot Res **12**(6): 334-339.
- Hu, Z., J. Zhang, et al. (2013). "Granulocyte colony-stimulating factor promotes atherosclerosis in high-fat diet rabbits." Int J Mol Sci **14**(3): 4805-4816.
- Hueper, W. C. (1946). "Experimental Studies in Cardiovascular Pathology: XIV. Experimental Atheromatosis in Macacus rhesus monkeys." Am J Pathol **22**(6): 1287-1291.
- Hurley, R. L., K. A. Anderson, et al. (2005). "The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases." J Biol Chem **280**(32): 29060-29066.
- Hurt, K. J., B. Musicki, et al. (2002). "Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 4061-4066.
- Insel, P. A., B. P. Head, et al. (2005). "Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae." Biochem Soc Trans **33**(Pt 5): 1131-1134.
- Ishikawa, T., J. R. Hume, et al. (1993). "Regulation of Ca²⁺ channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells." Circ Res **73**(6): 1128-1137.
- Ishikawa, Y., K. Otsu, et al. (2005). "Caveolin; different roles for insulin signal?" Cell Signal **17**(10): 1175-1182.

- Istvan, E. S. and J. Deisenhofer (2001). "Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase." Science **292**(5519): 1160-1164.
- Ivan, L. and F. Antohe (2010). "Hyperlipidemia induces endothelial-derived foam cells in culture." J Recept Signal Transduct Res **30**(2): 106-114.
- Jagnandan, D., W. C. Sessa, et al. (2005). "Intracellular location regulates calcium-calmodulin-dependent activation of organelle-restricted eNOS." Am J Physiol Cell Physiol **289**(4): C1024-1033.
- Jayachandran, M. and V. M. Miller (2002). "Ovariectomy upregulates expression of estrogen receptors, NOS, and HSPs in porcine platelets." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(1): H220-226.
- Jayakody, L., M. Senaratne, et al. (1987). "Endothelium-dependent relaxation in experimental atherosclerosis in the rabbit." Circ Res **60**(2): 251-264.
- Jen, C. J., H. P. Chan, et al. (2002). "Chronic exercise improves endothelial calcium signaling and vasodilatation in hypercholesterolemic rabbit femoral artery." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(7): 1219-1224.
- Jen, C. J., Y. F. Liu, et al. (2005). "Short-term exercise training improves vascular function in hypercholesterolemic rabbit femoral artery." Chin J Physiol **48**(2): 79-85.
- Jimenez, A., M. M. Arriero, et al. (2001). "Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in the vascular wall and in mononuclear cells from hypercholesterolemic rabbits." Circulation **104**(15): 1822-1830.
- Ju, H., R. Zou, et al. (1997). "Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity." J Biol Chem **272**(30): 18522-18525.
- Kadowaki, M. H., T. M. Singh, et al. (1991). "The effect of hypercholesterolemia on early atherosclerotic lesions initiated by fibrinopeptide B." J Surg Res **51**(6): 524-528.
- Kaesemeyer, W. H., R. B. Caldwell, et al. (1999). "Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions." J Am Coll Cardiol **33**(1): 234-241.
- Kanazawa, K., S. Kawashima, et al. (1996). "Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation." Am J Pathol **148**(6): 1949-1956.
- Karaboga, R., O. Kilic, et al. (2006). "Long-term effect of experimental hypercholesterolemia on cavernosal tissues." Urology **67**(2): 431-434.
- Kausar, K., V. da Cunha, et al. (2000). "Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(5): H1679-1685.
- Kawamura, R., Gustav Fischer, et al. (1927). "Neue Beitrge zur Morphologie der Cholesterinsteatose." 267 pp, references 262; 1289 pp.
- Kawashima, S. (2004). "The two faces of endothelial nitric oxide synthase in the pathophysiology of atherosclerosis." Endothelium **11**(2): 99-107.
- Kim, J., S. W. Jang, et al. (2014). "The role of heat shock protein 90 in migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in the development of atherosclerosis." J Mol Cell Cardiol **72**: 157-167.
- Kim, J. H., M. L. Klyachkin, et al. (1994). "Experimental hypercholesterolemia in rabbits induces cavernosal atherosclerosis with endothelial and smooth muscle cell dysfunction." J Urol **151**(1): 198-205.
- Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." Biochem J **298** (Pt 2): 249-258.
- Kolodgie, F. D., A. S. Katocs, Jr., et al. (1996). "Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary

- cholesterol and development of lesion type." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(12): 1454-1464.
- Kritchevsky, D. (1995). "Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history." J Nutr **125**(3 Suppl): 589S-593S.
- Kubes, P., M. Suzuki, et al. (1991). "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 4651-4655.
- Kuhlencordt, P. J., R. Gyurko, et al. (2001). "Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice." Circulation **104**(4): 448-454.
- Kunsch, C. and R. M. Medford (1999). "Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature." Circ Res **85**(8): 753-766.
- Kureishi, Y., Z. Luo, et al. (2000). "The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals." Nat Med **6**(9): 1004-1010.
- Laufs, U. (2003). "Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide." Eur J Clin Pharmacol **58**(11): 719-731.
- Laufs, U. and J. K. Liao (1998). "Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase." J Biol Chem **273**(37): 24266-24271.
- Lee, L. S., C. W. Cho, et al. (2013). "Hypolipidemic and antioxidant properties of phenolic compound-rich extracts from white ginseng (*Panax ginseng*) in cholesterol-fed rabbits." Molecules **18**(10): 12548-12560.
- Lee, M. Y. and K. K. Griending (2008). "Redox signaling, vascular function, and hypertension." Antioxid Redox Signal **10**(6): 1045-1059.
- Ley, K. (2003). "The role of selectins in inflammation and disease." Trends Mol Med **9**(6): 263-268.
- Li, C., L. Ruan, et al. (2007). "Role of eNOS phosphorylation at Ser-116 in regulation of eNOS activity in endothelial cells." Vascul Pharmacol **47**(5-6): 257-264.
- Li, D., Y. Zhang, et al. (2010). "Adenosine monophosphate activated protein kinase regulates ABCG1-mediated oxysterol efflux from endothelial cells and protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(7): 1354-1362.
- Li, H. and U. Forstermann (2000). "Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease." J Pathol **190**(3): 244-254.
- Li, S., J. Couet, et al. (1996). "Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases." J Biol Chem **271**(46): 29182-29190.
- Li, T. W. and S. Freeman (1946). "Experimental lipemia and hypercholesterolemia by protein depletion and by cholesterol feeding in dogs." Am J Physiol **145**: 660-666.
- Liao, D.-F., Z.-G. Jin, et al. (2000). "Purification and Identification of Secreted Oxidative Stress-induced Factors from Vascular Smooth Muscle Cells." J. Biol. Chem. **275**(1): 189-196.
- Liao, J. K., M. A. Bettmann, et al. (1991). "Differential impairment of vasodilator responsiveness of peripheral resistance and conduit vessels in humans with atherosclerosis." Circ Res **68**(4): 1027-1034.
- Lodish, H. and e. al. (2012). "TRANSFERENCE OF PROTEINS ON A MEMBRANE AND SPECIFIC DETECTION WITH ANTIBODIES-WESTERN BLOT."
- Long YC and Z. JR. (2006). "AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation." J Clin Invest. **116**(7): 1776-1783.

- Ludmer, P. L., A. P. Selwyn, et al. (1986). "Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries." N Engl J Med **315**(17): 1046-1051.
- Madrigal-Matute, J., C. E. Fernandez-Garcia, et al. (2012). "HSP90 inhibition by 17-DMAG attenuates oxidative stress in experimental atherosclerosis." Cardiovasc Res **95**(1): 116-123.
- Malinski, T., M. W. Radomski, et al. (1993). "Direct electrochemical measurement of nitric oxide released from human platelets." Biochem Biophys Res Commun **194**(2): 960-965.
- Mason, R. P., M. F. Walter, et al. (2006). "Active metabolite of atorvastatin inhibits membrane cholesterol domain formation by an antioxidant mechanism." J Biol Chem **281**(14): 9337-9345.
- Mathe, D. (1995). "Dyslipidemia and diabetes: animal models." Diabete Metab **21**(2): 106-111.
- Maxwell, K. N. and J. L. Breslow (2004). "Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype." 101: 7100-7105.
- McCabe, T. J., D. Fulton, et al. (2000). "Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation." J Biol Chem **275**(9): 6123-6128.
- Medina, M., M. R. Alberto, et al. (2014). "Hypercholesterolemia Increases Plasma Saturated and n-6 Fatty Acids Altering Prostaglandin Homeostasis and Promotes Endothelial Dysfunction in Rabbits." Lipids.
- Michel, J. B., O. Feron, et al. (1997). "Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin." J Biol Chem **272**(25): 15583-15586.
- Michel, J. B., O. Feron, et al. (1997). "Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase." J Biol Chem **272**(41): 25907-25912.
- Michell, B. J., Z. Chen, et al. (2001). "Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase." J Biol Chem **276**(21): 17625-17628.
- Mihos, C. G. and O. Santana (2011). "Pleiotropic effects of the HMG-CoA reductase inhibitors." Int J Gen Med **4**: 261-271.
- Ming, X. F., C. Barandier, et al. (2004). "Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction." Circulation **110**(24): 3708-3714.
- Moncada, S. (1992). "Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity." J Lab Clin Med **120**(2): 187-191.
- Moncada, S. and A. Higgs (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway." N Engl J Med **329**(27): 2002-2012.
- Mudaliar, J. H., J. A. Freischlag, et al. (1997). "Combined exposure to cigarette smoke and hypercholesterolemia decreases vasorelaxation of the aorta." J Vasc Surg **25**(5): 884-889.
- Murata, M., J. Peranen, et al. (1995). "VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10339-10343.
- Murata, T., K. Kinoshita, et al. (2005). "Statin protects endothelial nitric oxide synthase activity in hypoxia-induced pulmonary hypertension." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(11): 2335-2342.
- Murata, T., K. Sato, et al. (2002). "Decreased endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) activity resulting from abnormal interaction between eNOS and its regulatory proteins in hypoxia-induced pulmonary hypertension." J Biol Chem **277**(46): 44085-44092.

- Musicki, B., M. F. Kramer, et al. (2005). "Age-related changes in phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in the rat penis." J Sex Med **2**(3): 347-355; discussion 355-347.
- Musicki, B., T. Liu, et al. (2010). "Hypercholesterolemia-induced erectile dysfunction: endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling in the mouse penis by NAD(P)H oxidase." J Sex Med **7**(9): 3023-3032.
- Musicki, B., T. Liu, et al. (2008). "Low-fat diet and exercise preserve eNOS regulation and endothelial function in the penis of early atherosclerotic pigs: a molecular analysis." J Sex Med **5**(3): 552-561.
- Musicki, B., A. E. Ross, et al. (2009). "Posttranslational modification of constitutive nitric oxide synthase in the penis." J Androl **30**(4): 352-362.
- Nam, H., H. J. Yang, et al. (2013). "Impact of chronic simulated snoring on carotid atherosclerosis in rabbits." J Clin Neurol **9**(4): 269-273.
- Napoli, C., F. de Nigris, et al. (2006). "Nitric oxide and atherosclerosis: an update." Nitric Oxide **15**(4): 265-279.
- Nong, Z., M. Hoylaerts, et al. (1997). "Nitric oxide inhalation inhibits platelet aggregation and platelet-mediated pulmonary thrombosis in rats." Circ Res **81**(5): 865-869.
- Oemar, B. S., M. R. Tschudi, et al. (1998). "Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis." Circulation **97**(25): 2494-2498.
- Ohishi M, Dusting GJ, et al. (2010). "Increased expression and co-localization of ACE, angiotensin II AT(1) receptors and inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic human coronary arteries." Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. **2**(2): 111-124.
- Oishi, P. E., D. A. Wiseman, et al. (2008). "Progressive dysfunction of nitric oxide synthase in a lamb model of chronically increased pulmonary blood flow: a role for oxidative stress." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **295**(5): L756-766.
- Ostrom, R. S. and P. A. Insel (2004). "The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology." Br J Pharmacol **143**(2): 235-245.
- Otsuji, S., O. Nakajima, et al. (1995). "Attenuation of acetylcholine-induced vasoconstriction by L-arginine is related to the progression of atherosclerosis." Am Heart J **129**(6): 1094-1100.
- Ou, J., Z. Ou, et al. (2003). "Inhibition of heat shock protein 90 (hsp90) in proliferating endothelial cells uncouples endothelial nitric oxide synthase activity." Free Radic Biol Med **34**(2): 269-276.
- Padayatti, P. S., P. Pattanaik, et al. (2004). "Structural insights into the regulation and the activation mechanism of mammalian guanylyl cyclases." Pharmacol Ther **104**(2): 83-99.
- Papapetropoulos, A., Z. Zhou, et al. (2005). "Interaction between the 90-kDa heat shock protein and soluble guanylyl cyclase: physiological significance and mapping of the domains mediating binding." Mol Pharmacol **68**(4): 1133-1141.
- Patnaik, S. K. (2005). "Alignment And Prediction Of Secondary Structures Of Proteins."
- Pedersen, T. R. and O. Faergeman (1999). "Simvastatin seems unlikely to cause impotence." BMJ **318**(7177): 192.
- Podlasek, C. A., D. J. Zelner, et al. (2001). "Characterization and localization of nitric oxide synthase isoforms in the BB/WOR diabetic rat." J Urol **166**(2): 746-755.

- Pratt, W. B. (1997). "The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 297-326.
- Pritchard, K. A., A. W. Ackerman, et al. (2002). "Native low-density lipoprotein induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction: role of heat shock protein 90 and caveolin-1." Free Radic Biol Med **33**(1): 52-62.
- Pritchard, K. A., Jr., A. W. Ackerman, et al. (2001). "Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase." J Biol Chem **276**(21): 17621-17624.
- Pritchard, K. A., Jr., J. Ou, et al. (2004). "Hypoxia-induced acute lung injury in murine models of sickle cell disease." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(4): L705-714.
- Pyriochou, A. and A. Papapetropoulos (2005). "Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed." Cell Signal **17**(4): 407-413.
- Rahmani-Cherati, T., M. Mokhtari-Dizaji, et al. (2014). "Evaluation of Statin Therapy on Endothelial Function in Hypercholesterolemic Rabbits by Automatic Measurement of Arterial Wall Movement Using Ultrasound Images." Ultrasound Med Biol.
- Rajamannan, N. M., M. Subramaniam, et al. (2005). "Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve." Heart **91**(6): 806-810.
- Ramirez-Sanchez, I., H. Aguilar, et al. (2012). "(-)-Epicatechin-induced calcium independent eNOS activation: roles of HSP90 and AKT." Mol Cell Biochem **370**(1-2): 141-150.
- Randriamboavonjy, V. and I. Fleming (2005). "Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in platelets: how is it regulated and what is it doing there?" Pharmacol Rep **57 Suppl**: 59-65.
- Rathouska, J., I. Nemeckova, et al. (2014). "Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta of normocholesterolemic mice with different predispositions to atherosclerosis." Heart Vessels.
- Razani, B. and M. P. Lisanti (2001). "Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease." J Clin Invest **108**(11): 1553-1561.
- Razani, B., S. E. Woodman, et al. (2002). "Caveolae: from cell biology to animal physiology." Pharmacol Rev **54**(3): 431-467.
- Rikitake, Y., S. Kawashima, et al. (2001). "Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits." Atherosclerosis **154**(1): 87-96.
- Romano, M., A. Mezzetti, et al. (2000). "Fluvastatin reduces soluble P-selectin and ICAM-1 levels in hypercholesterolemic patients: role of nitric oxide." J Invest Med **48**(3): 183-189.
- Ronald A. Bergman, P. D., M. D. Adel K. Afifi, et al. (1999). "Atlas of Microscopic Anatomy: Section 8: Cardiovascular System." Atlas of Microscopic Anatomy- A Functional Approach: Companion to Histology and Neuroanatomy: Second Edition: Plates 8.148 to 148.161.
- Russell, K. S., M. P. Haynes, et al. (2000). "Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release." J Biol Chem **275**(7): 5026-5030.
- Ryu, J. K., C. H. Cho, et al. (2006). "Combined angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor gene transfer restores cavernous angiogenesis and erectile function in a rat model of hypercholesterolemia." Mol Ther **13**(4): 705-715.

- Ryu, J. K., H. Y. Shin, et al. (2006). "Downregulation of angiogenic factors and their downstream target molecules affects the deterioration of erectile function in a rat model of hypercholesterolemia." Urology **67**(6): 1329-1334.
- Sato, J., T. Mohacsi, et al. (2000). "In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to carotid arteries from hypercholesterolemic rabbits enhances endothelium-dependent relaxations." Stroke **31**(4): 968-975.
- Schlossmann, J., A. Ammendola, et al. (2000). "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β ." Nature **404**(6774): 197-201.
- Schulman, I. H., M. S. Zhou, et al. (2006). "Interaction between nitric oxide and angiotensin II in the endothelium: role in atherosclerosis and hypertension." J Hypertens Suppl **24**(1): S45-50.
- Schulz, E., E. Anter, et al. (2005). "Estradiol-mediated endothelial nitric oxide synthase association with heat shock protein 90 requires adenosine monophosphate-dependent protein kinase." Circulation **111**(25): 3473-3480.
- Schwartz, G. G., A. G. Olsson, et al. (2001). "Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial." JAMA **285**(13): 1711-1718.
- Serizawa K, Yogo K, et al. (2011). "Nicorandil prevents endothelial dysfunction due to antioxidative effects via normalisation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase in streptozotocin diabetic rats." Cardiovasc Diabetol. **doi: 10.1186/105**: 1475-2840-1410-1105.
- Sessa, W. C. (2001). "Can modulation of endothelial nitric oxide synthase explain the vasculoprotective actions of statins?" Trends Mol Med **7**(5): 189-191.
- Sessa, W. C. (2004). "eNOS at a glance." J Cell Sci **117**(Pt 12): 2427-2429.
- SEVİN, G. (2003). "Hiperkolesterolemik tavşanlarda fluvastatinin damar morfometrisi, biyokimyasal parametreler ve vasküler reaktivite değişiklikleri üzerindeki etkisi."
- Shah, V., R. Wiest, et al. (1999). "Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension." Am J Physiol **277**(2 Pt 1): G463-468.
- Sigurdsson, G., S. O. Haraldsdottir, et al. (1998). "Simvastatin compared to fluvastatin in the reduction of serum lipids and apolipoproteins in patients with ischaemic heart disease and moderate hypercholesterolaemia." Acta Cardiol **53**(1): 7-14.
- Singer, A. H., P. S. Tsao, et al. (1995). "Discordant effects of dietary L-arginine on vascular structure and reactivity in hypercholesterolemic rabbits." J Cardiovasc Pharmacol **25**(5): 710-716.
- Sirker, A., M. Zhang, et al. (2011). "NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies." Basic Res Cardiol **106**(5): 735-747.
- Smilde, T. J., F. W. van den Bergmortel, et al. (2000). "The effect of cholesterol lowering on carotid and femoral artery wall stiffness and thickness in patients with familial hypercholesterolaemia." Eur J Clin Invest **30**(6): 473-480.
- Soner, B. C., N. Murat, et al. (2010). "Evaluation of vascular smooth muscle and corpus cavernosum on hypercholesterolemia. Is resveratrol promising on erectile dysfunction?" Int J Impot Res **22**(4): 227-233.
- Song, Y., J. L. Zweier, et al. (2001). "Heat-shock protein 90 augments neuronal nitric oxide synthase activity by enhancing Ca²⁺/calmodulin binding." Biochem J **355**(Pt 2): 357-360.
- Spronk, H. M., D. van der Voort, et al. (2004). "Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship." Thromb J **2**(1): 12.
- Stanarius, A., S. Uckert, et al. (2001). "Immunocytochemical distribution of nitric oxide synthase in the human corpus cavernosum: an electron microscopical

- study using the tyramide signal amplification technique." Urol Res **29**(3): 168-172.
- Stary, H. C., A. B. Chandler, et al. (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **92**(5): 1355-1374.
- Sud, N., S. Sharma, et al. (2007). "Nitric oxide and superoxide generation from endothelial NOS: modulation by HSP90." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(6): L1444-1453.
- Sun, J. and J. K. Liao (2002). "Functional interaction of endothelial nitric oxide synthase with a voltage-dependent anion channel." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13108-13113.
- Sun, J. and J. K. Liao (2004). "Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(12): 2238-2244.
- Suschek, C. V., O. Schnorr, et al. (2004). "The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all?" Curr Mol Med **4**(7): 763-775.
- Taddei, S., A. Virdis, et al. (1996). "Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients." Circulation **94**(6): 1298-1303.
- Takahashi, S. and M. E. Mendelsohn (2003). "Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex." J Biol Chem **278**(33): 30821-30827.
- Tesfamariam, B. (2006). "The effects of HMG-CoA reductase inhibitors on endothelial function." Am J Cardiovasc Drugs **6**(2): 115-120.
- Thakur, N. K., T. Hayashi, et al. (2001). "HMG-CoA reductase inhibitor stabilizes rabbit atheroma by increasing basal NO and decreasing superoxide." Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(1): H75-83.
- Thompson, M. A., K. K. Henderson, et al. (2004). "Exercise preserves endothelium-dependent relaxation in coronary arteries of hypercholesterolemic male pigs." J Appl Physiol (1985) **96**(3): 1114-1126.
- Towler MC and H. DG (2007). "AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling." **100**(103):328-141.
- Triggle, C. R., M. Hollenberg, et al. (2003). "The endothelium in health and disease--a target for therapeutic intervention." J Smooth Muscle Res **39**(6): 249-267.
- Trigo-Rocha, F., W. J. Aronson, et al. (1993). "Nitric oxide and cGMP: mediators of pelvic nerve-stimulated erection in dogs." Am J Physiol **264**(2 Pt 2): H419-422.
- Truong, T. Q., D. Aubin, et al. (2010). "SR-BI, CD36, and caveolin-1 contribute positively to cholesterol efflux in hepatic cells." Cell Biochem Funct **28**(6): 480-489.
- Turkseven, S. and E. Ertuna (2013). "Prolonged AMP-activated protein kinase induction impairs vascular functions." Can J Physiol Pharmacol **91**(12): 1025-1030.
- TürkFarmakolojiDerneği (2005). "Nitrik Oksidin Farmakolojisi Farmakoloji " Türk Farmakoloji Derneği(Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Program).
- Uchiyama, T., H. Atsuta, et al. (2007). "HSF1 and constitutively active HSF1 improve vascular endothelial function (heat shock proteins improve vascular endothelial function)." Atherosclerosis **190**(2): 321-329.
- Ulker, S., D. McMaster, et al. (2003). "Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation." Cardiovasc Res **59**(2): 488-500.

- Uyy, E., L. Ivan, et al. (2013). "High-fat diet alters protein composition of detergent-resistant membrane microdomains." Cell Tissue Res **354**(3): 771-781.
- Vallance, P., J. Collier, et al. (1989). "Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo." Cardiovasc Res **23**(12): 1053-1057.
- van Etten, R. W., E. J. de Koning, et al. (2002). "Impaired NO-dependent vasodilation in patients with Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus is restored by acute administration of folate." Diabetologia **45**(7): 1004-1010.
- Varughese, G. I., J. V. Patel, et al. (2006). "Novel concepts of statin therapy for cardiovascular risk reduction in hypertension." Curr Pharm Des **12**(13): 1593-1609.
- Venema, R. C., V. J. Venema, et al. (2003). "Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(2): H669-678.
- Venema, V. J., M. B. Marrero, et al. (1996). "Bradykinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation promotes endothelial nitric oxide synthase translocation to the cytoskeleton." Biochem Biophys Res Commun **226**(3): 703-710.
- Wang, B. Y., R. C. Candipan, et al. (1996). "Arginine restores nitric oxide activity and inhibits monocyte accumulation after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits." J Am Coll Cardiol **28**(6): 1573-1579.
- Wang Z, Zou J, et al. (2005). "Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels." Int J Mol Med **Oct;16**(4): 533-540.
- Wassmann, S., U. Laufs, et al. (2001). "HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species." Hypertension **37**(6): 1450-1457.
- Wei, Q. and Y. Xia (2005). "Roles of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function by heat shock protein 90." J Biol Chem **280**(18): 18081-18086.
- White, C. R., T. A. Brock, et al. (1994). "Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(3): 1044-1048.
- WHO "CDC the atlas of heart disease and stroke." World Health Organization (WHO).
- Wilcox, J. N., R. R. Subramanian, et al. (1997). "Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(11): 2479-2488.
- Williams, K. J. and I. Tabas (1998). "The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced." Curr Opin Lipidol **9**(5): 471-474.
- Wilson, S. H., R. D. Simari, et al. (2001). "Simvastatin preserves coronary endothelial function in hypercholesterolemia in the absence of lipid lowering." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(1): 122-128.
- Wingard, C. J., F. Moukdar, et al. (2009). "Reversal of voltage-dependent erectile responses in the Zucker obese-diabetic rat by rosuvastatin-altered RhoA/Rho-kinase signaling." J Sex Med **6 Suppl 3**: 269-278.
- Wink, D. A., I. Hanbauer, et al. (1993). "Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 9813-9817.
- Woods A, Johnstone SR, et al. (2003). "LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade." Curr Biol **13**(22): 2004-2008.
- Xi, W., H. Satoh, et al. (2005). "Stimulated HSP90 binding to eNOS and activation of the PI3-Akt pathway contribute to globular adiponectin-induced NO production: vasorelaxation in response to globular adiponectin." Biochem Biophys Res Commun **332**(1): 200-205.

- Xie, D., C. D. Kontos, et al. (2005). "Cholesterol feeding reduces vascular endothelial growth factor signaling in rabbit corporal tissues." J Sex Med **2**(5): 634-640.
- Xue, L., W. H. Xu, et al. (2009). "Effect of cholesterol lowering on stiffness of aortic and femoral arterial walls in rabbits on a high fat diet." Chin Med J (Engl) **122**(12): 1444-1448.
- Yang, A. L. and H. I. Chen (2003). "Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae." Atherosclerosis **169**(1): 11-17.
- Yasa, M., Z. Kerry, et al. (1999). "Effects of treatment with FK409, a nitric oxide donor, on collar-induced intimal thickening and vascular reactivity." Eur J Pharmacol **374**(1): 33-39.
- Yetik-Anacak, G. and J. D. Catravas (2006). "Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease." Vascul Pharmacol **45**(5): 268-276.
- Yetik-Anacak, G., T. Xia, et al. (2006). "Effects of hsp90 binding inhibitors on sGC-mediated vascular relaxation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(1): H260-268.
- YETİK, G. (1996). "Kalsiyum giriş blokörü lasidipin ile tedavinin tavşan karotid arterinde intimal kalınlaşma ve vasküler reaktivite üzerine etkisi."
- Zager RA, Johnson A, et al. (2002). "Altered cholesterol localization and caveolin expression during the evolution of acute renal failure." Kidney Int. **2002 May**; **61**(5): 1674-1683.
- Zeiher, A. M., B. Fisslthaler, et al. (1995). "Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells." Circ Res **76**(6): 980-986.
- Zhang, Y., T. S. Lee, et al. (2006). "AMP-activated protein kinase is involved in endothelial NO synthase activation in response to shear stress." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(6): 1281-1287.
- Zheng, J. S., X. Q. Yang, et al. (2003). "Gene transfer of human guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial function in low renin hypertension." Circulation **108**(10): 1238-1245.
- Zhou, M.-S., E. A. Jaimes, et al. (2004). "Atorvastatin Prevents End-Organ Injury in Salt-Sensitive Hypertension: Role of eNOS and Oxidant Stress 10.1161/01.HYP.0000136395.06810.cf." Hypertension **44**(2): 186-190.
- Zhu, L., D. Schwegler-Berry, et al. (2004). "Internalization of caveolin-1 scaffolding domain facilitated by Antennapedia homeodomain attenuates PAF-induced increase in microvessel permeability." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(1): H195-201.
- Zhu, X. Y., P. Li, et al. (2013). "Xuezhikang, extract of red yeast rice, improved abnormal hemorheology, suppressed caveolin-1 and increased eNOS expression in atherosclerotic rats." PLoS One **8**(5): e62731.

8. ÖZGEÇMİŞ

2005 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimime başladım. 2010 yılında lisanstan mezun olduktan sonra 2011 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda özel öğrenci olarak eğitim aldım. Aynı yıl Eylül ayında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım.

Sema Sarıgül

