

Böbrek hastalıklarında nitrik oksit sentaz aktivitesi ve düzenlenme mekanizmaları

NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVITY AND REGULATION MECHANISMS IN KIDNEY DISEASES

 Ayşegül Cemre ŞAHİN¹,  Caner ÇAVDAR²,  Zahide ÇAVDAR¹

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

² Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Nefroloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZ

Nitrik oksit (NO) gaz yapıda, 5-6 saniyelik yarılanma ömrüne sahip, birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alan bir moleküldür. Fizyolojik şartlarda böbrekte renal ve glomerüler hemodinamiğin düzenlenmesi, natriürezis, medullar perfüzyon, tübüloglomerüler feedback, tübüler sodyum reabsorpsiyonu ve renal sinir aktivitesi gibi birçok olayda rol almaktadır. NO sentezinin bozulması sonucu çeşitli böbrek hasarı hastalıkları ortaya çıktığından bu mekanizmaların bilinmesi böbrek hasarına yönelik geliştirilecek tedavi yöntemlerinde önemli bir kilit noktasıdır. NO sentezinden sorumlu olan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinin insanda tanımlanan üç izoformu; nöronal NOS (nNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) ve endotelial NOS (eNOS)'dur. Bu enzimler ilk buldukları doku ve işlevlerine göre adlandırılmış olsa da böbrekte geniş bir lokalizasyona sahip ve birçok böbrek hastalığıyla ilişkilendirilmiş enzimlerdir.

Böbrek hastalıklarıyla ilgili yapılan çalışmalarda NO düzeyi ve NOS enzim aktivitesindeki değişiklikler önemli rol oynadığından, NOS'ların düzenlenmesinden sorumlu moleküler mekanizmalar birçok çalışmanın temelini oluşturmaktadır. Bu nedenle, bu derlemede NOS'ların moleküler düzenlenme mekanizmaları ve çeşitli böbrek hastalıklarıyla olan ilişkisi incelenmiş, bu mekanizmalara bütüncül bir bakış açısıyla böbrek patofizyolojisinde NO'nun rolü açıklanmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz, kronik böbrek hastalığı

ABSTRACT

Nitric Oxide (NO) is a gaseous molecule with a half-life of 5-6 seconds, involved in many physiological and pathological events. Under physiological conditions, it plays a role in the regulation of renal and glomerular hemodynamics, natriuresis, medullary perfusion, tubuloglomerular feedback, tubular sodium reabsorption and renal nerve activity.

Ayşegül Cemre ŞAHİN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

E-posta: a.cemresahinn@gmail.com

 orcid.org/ 0000-0002-0513-4986

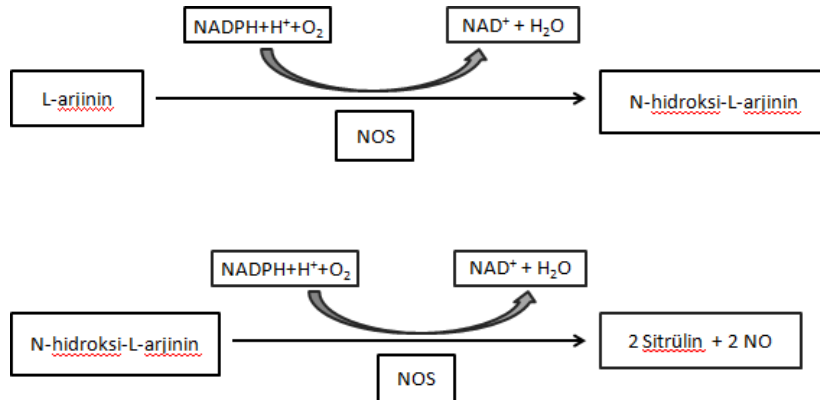
Impairment of NO synthesis causes various kidney diseases. Therefore, the elucidation of these mechanisms is important in the treatment methods to be developed against kidney damage. Three isoforms of nitric oxide synthase (NOS) enzymes have been identified responsible for NO synthesis; neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), and endothelial NOS (eNOS). Although these enzymes are called according to the tissue and functions in which they were first found, they are enzymes that have a wide localization in the kidney and have been associated with many kidney diseases. In previous studies, it has been shown that kidney diseases are caused by changes in NO level and NOS enzyme activity. Therefore, the molecular mechanisms responsible for the regulation of NOSs form the basis of many studies. In this review, the molecular regulation mechanisms of NOS and their relationship with various kidney diseases were investigated, and the role of NO in the kidney pathophysiology was aimed to explain.

Nitrik oksit (NO) ilk kez 1772’de tanımlanmış, bir oksijen ve bir nitrojen molekülünden oluşan, 5-6 saniyelik yarılanma ömrüne sahip gaz yapıda bir moleküldür. 1980’lerde vazodilatasyon ve kan basıncının düzenlenmesi ile ilgili yapılan araştırmalarda asetilkolinin vazodilatör etkisi keşfedilmiş ve daha sonra asetilkolinin damar iç yüzeyindeki endotel tabakadan gaz yapıda bir molekülün salınımına neden olduğu ve bu sayede etkisini gösterdiği saptanmıştır. Bu gaz yapıda molekül, başlarda endotel türevli gevşetici faktör (EDRF) olarak tanımlansa da daha sonra molekülün NO olduğu anlaşılmıştır (1). NO fizyolojik şartlarda endotelyumdan salındığında

vazodilatör etkisi; merkezi sinir sisteminde bir nörotransmitter olarak çalışması ve hafıza oluşumunda rol oynaması, periferik sinirler aracılığıyla nörojenik vazodilatasyona aracılık etmesi, platelet agregasyonunun inhibisyonu ve kardiyak kontraktilitenin kontrolü gibi işlevleri sayesinde geniş çaplı etkilere yol açmaktadır (2).

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından L-arjinin aminoasidinden üretilmekte ve sentezi sırasında yan ürün olarak L-sitrülin açığa çıkmaktadır. NO sentezinin ilk basamağında NOS L-arjinini N ω -hidroksi-L-arjinine hidroksillemekte, ikinci basamakta N ω -hidroksi-L-arjinin L-sitrülin ve NO’ya okside olmaktadır (Şekil 1).

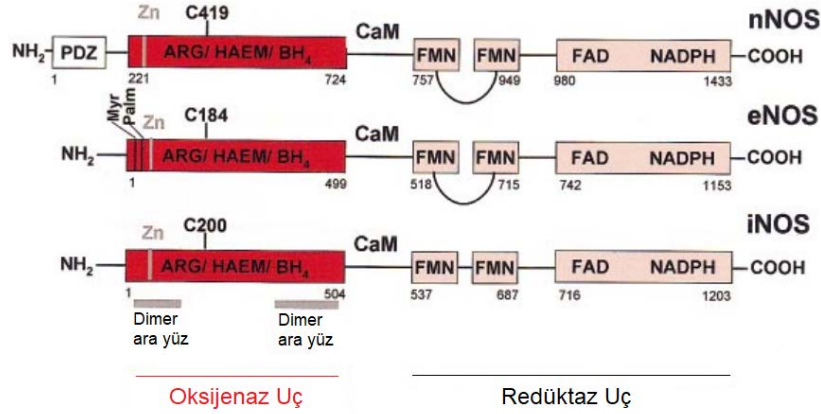
Şekil 1. NOS’ların iki basamaklı bir reaksiyon sonucu L-arjinin molekülünden NO sentezi.



İnsanda tanımlanmış en yaygın üç NOS izoformu; nöronal NOS (nNOS/NOS1), indüklenebilir NOS (iNOS/NOS2) ve endotelial NOS (eNOS/NOS3)'dur (3). Her NOS izoformu L-arjinin substratından iki basamaklı bir reaksiyon sonucunda NO üretmek için moleküler oksijen ve indirgenmiş nikoatinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ı ko-substrat olarak kullanmaktadır. NOS'ların tüm izoformları kalmomodulin (CaM) bağlar. nNOS ve eNOS'un CaM'e bağlanması, intrasellüler Ca²⁺ artışıyla meydana gelmektedir. Kalmomodulinin NOS enzimine afinitesinin artması elektronların redüktaz uçtaki NADPH'dan oksijenaz uçtaki Hem'e akışını kolaylaştırmaktadır. iNOS, CaM bağlanma bölgesindeki farklı aminoasit yapısından dolayı çok düşük düzeylerdeki intrasellüler Ca²⁺ konsantrasyonlarında (40 nM altı) bile bağlanabilmektedir. Tüm NOS proteinleri dimer ara yüzde

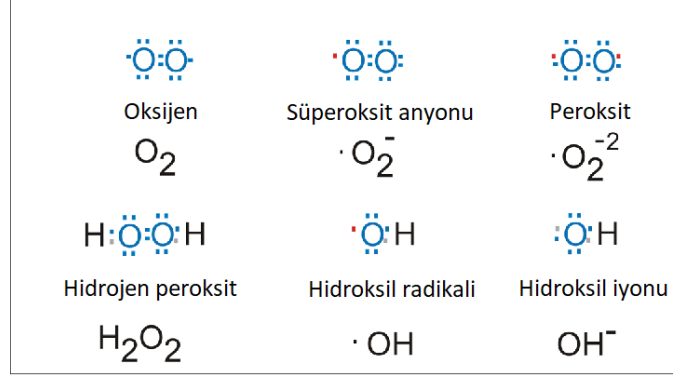
bulunan iki CysXXXXCys motifi ile koordine çinko iyonu tarafından oluşturulmuş çinko-tiyolat kümesi içermektedir. Enzimdeki çinko, katalitik fonksiyondan çok yapısal işleve sahiptir. Flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve (6R-)5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterin (BH₄), NOS enzimlerinin kofaktörü olarak işlev görmektedir. Fonksiyonel olarak aktif olan NOS, FAD ve FMN aracılığıyla karboksiterminal redüktaz uca NADPH'dan, amino-terminal oksijenaz uca bulunan Hem bölgesine elektron transferi gerçekleştirmektedir. Hem bölgesinde, elektronlar O₂'i indirgemek, enzimi aktifleştirmek ve L-arjinini L-sitrülin ve NO'ya oksidize etmek için kullanılmaktadır. Hem bölgesinin yanında konumlanan sistein ligandı L-arjinin ve BH₄ bağlanma bölgeleri içermektedir (4) (Şekil 2).

Şekil 2. NOS moleküler yapısı (5)



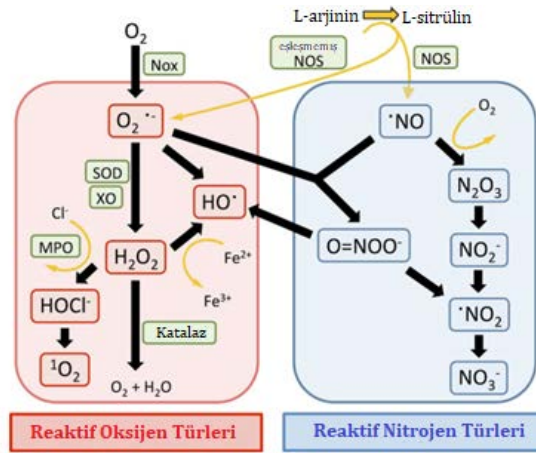
Reaktif Oksijen Türleri ile NO Arasındaki İlişki

Reaktif oksijen türleri (ROT), moleküler oksijenden türeyen reaktif molekülleri ve serbest radikalleri ifade etmektedir. Bu moleküller aerobik solunumda mitokondriyal elektron transport sırasında yan ürün olarak üretilmekle birlikte NADPH oksidaz, ksantin oksidaz gibi enzimatik kaynaklar aracılığı ile de üretilmektedir. Son yörüngesinde eşleşmemiş iki elektrona sahip oksijene elektronların eklenmesi ve oksijenin indirgenmesi ile süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve hidroksil iyonunu içeren bir dizi ROT üretilmektedir (Şekil 3) (6). (18, 19, 15, 16, 20, 21, 22).

Şekil 3. Reaktif oksijen türlerinin elektron yapıları. “·” eşleşmemiş elektronu ifade etmektedir.

Bu moleküller fizyolojik şartlar altında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPX) glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST), peroksiredoksin (PRX), tiyoredoksin (TRX) ve non-enzimatik sistemler olarak gruplandırılan askorbik asit, α -tokoferol, karotenoidler, flavonoidler ve indirgenmiş glutatyon (GSH) organik bileşikleri tarafından elimine edilmektedir (7). Düşük düzeyde üretilen ROT, vasküler

reaktivite, renal hemodinamikler, glomerüler filtrasyon, tübüler reabsorbsiyon ve hormonal sekresyon olaylarını içeren böbrek fonksiyon ve homeostazının sürdürülmesinde görevlidir (8). ROT üretimi antioksidan savunma sistemi tarafından karşılanamayacak düzeye ulaştığında meydana gelen oksidatif stresin doku hasarına yol açtığı kanıtlanmıştır (7) (Şekil 4).

Şekil 4: XO, ksantin oksidaz; SOD, süperoksit dismutaz; NOS, nitrik oksit sentaz, MPO, miyeloperoksidaz; NOX, NADPH oksidaz (10).

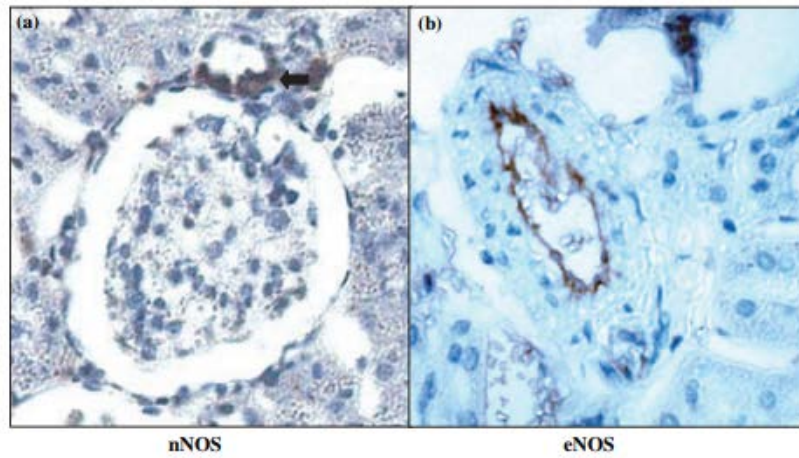
NOS'lar tarafından üretilen NO^{\cdot} biyolojik sistemlerde reaktif azot türlerinin (RNT) en önemlisidir. NO^{\cdot} vücuttaki ROT'lar ile tepkimeye girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti (ONOO^-) oluşturmaktadır. ROT ve RNT

arasındaki bu etkileşim tirozin, sistein, metiyonin, triptofan gibi aminoasitlerin oksidasyonu ve nitrasyonu ile renal patofizyolojilere neden olan protein modifikasyonlarına yol açmaktadır (9).

Böbrek Hastalıklarında NO ve NOS'lar

ROT ve antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulması, böbrekte inflamasyon, apoptoz ve fibrozis ile birlikte kronik böbrek yetmezliğinin ilerlemesine neden olmaktadır (9). Akut ve kronik böbrek yetmezliğinde gelişen böbrek hasarının aşırı miktarda üretilen ROT ile ilişkisi olduğu deneysel çalışmalar ile kanıtlanmıştır (8-9,11-14)

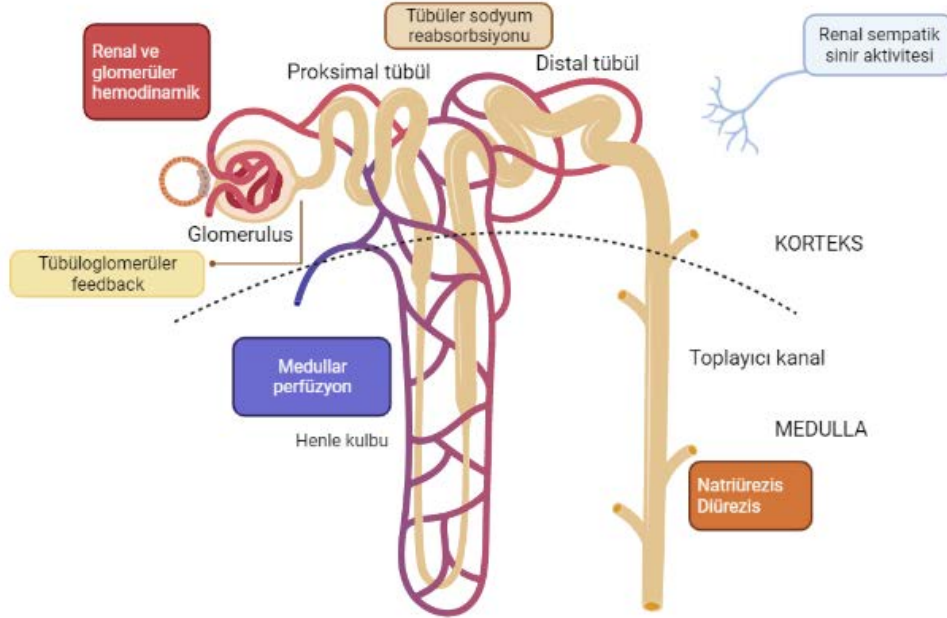
Şekil 5: nNOS ve eNOS'un böbrekteki lokalizasyonları (3).



iNOS hem sağlıklı bir böbreğin fonksiyonel rolünü gerçekleştirmesinde hem de inflamasyon, böbrek iskem/reperfüzyon hasarı, üretral obstrüksiyon, sepsis, kronik böbrek yetmezliği (KBY) gibi patolojik durumlarda aktif hale gelerek efektör molekülleri üzerinden bu patolojik olaylara katkı sağlamaktadır (15).

Böbrekte üretilen NO, renal ve glomerüler hemodinamiğin düzenlenmesi (16), natriürezis basıncının ayarlanması (17), medullar perfüzyonun sürdürülmesi (18), tübüloglomerüler feedback kontrolü (19), tübüler sodyum reabsorpsiyonu (20) ve renal sempatik sinir aktivitesinin düzenlenmesi (21) gibi çeşitli fizyolojik rollere sahiptir (Şekil 6).

Şekil 6. NO'nun nefron fonksiyonundaki fizyolojik etkisi.



Böbrekte NO'nun net etkisi, diyetle alınan tuza renal adaptasyonu sağlayarak natriürezis ile diürezisin dengelenmesinde de önemlidir. Diyetle alınan tuzda artış olması, NO üretiminin bozulmasına neden olarak hipertansiyon gelişiminde rol oynamaktadır (3).

KBY'de NO sentezinin bozulduğu ve komplikasyonların NO düzeyi ile ilişkili olarak geliştiği gözlenmiştir. KBY'de NO sentezinin bozulması; L-arjininin biyosentezinde, erişilebilirliğinde ya da hücre içine alınmasında azalma, asimetrik dimetil arjinin (ADMA) gibi L-arjininle yarışmalı aktivite gösteren endojen NOS inhibitörlerinde artış, renal korteksteki hasara yanıt olarak lokalize NO miktarındaki azalma gibi durumlara bağlı olabilmektedir (22). Deneysel olarak indüklenen kronik NOS inhibisyonunun ise sistemik ve glomerüler hipertansiyon, glomerüler iskemi, glomerüloskleroz, tübülointerstisyel hasar ve proteinüriye neden olduğu gösterilmiştir (23). Ayrıca KBY'nin bir sonucu olarak da NO eksikliğinin meydana gelebileceği bildirilmektedir (22).

Böbrekte NOS Aktivitesi ve Düzenlenme Mekanizmaları

Böbrekte faaliyet gösteren NOS'ların aktiviteleri çeşitli spesifik moleküller aracılığıyla düzenlenmektedir. Tablo 1.'de gösterilen bu moleküllerin etki mekanizmaları aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Tablo 1. NOS enzim aktivitesinin spesifik düzenleyicileri

nNOS	iNOS	eNOS
<p>PDZ Etkileşimli Düzenleyici: CAPON (NOS1AP)</p> <p>Dimerizasyon: 7-NI, PIN</p> <p>Fosforilasyon: Ser 847</p>	<p>Sitokinler: LPS, TNF-α, NFκB, IL-1β, IL-6, TGF-β</p> <p>Seçici iNOS İnhibitörü: 1400W</p>	<p>Substrat İlişkili Düzenleyici: L-NMMA, ADMA</p> <p>Fosforilasyon: Ser 633, Ser 1176, Ser 1177, Thr 494, Thr 495</p> <p>Protein-Protein Etkileşimi: NOSTRIN</p> <p>S-Nitrozilasyon</p> <p>Asetilasyon: Lys 497, Lys 507</p>

ADMA: asimetrik dimetil arjinin; IL-1 β : İnterlökin-1 Beta; IL-6: İnterlökin-6; L-NMMA: NG-monometil-l-arjinin; LPS: Lipopolisakkarit; Lys 497: Lizin 497; Lys 507: Lizin 507; NF κ B: Nükleer Faktör Kappa B; NOS1AP: Nitrik Oksit Sentaz 1 Adaptör Protein; NOSTRIN; Nitrik Oksit Sentaz Trafığı Uyarıcısı; PIN: nNOS'un Protein İnhibitörü; Ser 633: Serin 633; Ser 847: Serin 847; Ser 1176: Serin 1176; Ser 1177: Serin 1177; TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta; Thr 494: Treonin 494; Thr 495: Treonin 495; TNF- α : Tümör Nekroz Faktör-Alfa; 1400W: N-[3-(aminometil)benzil]asetamidin; 7-NI:7-Nitroindazol

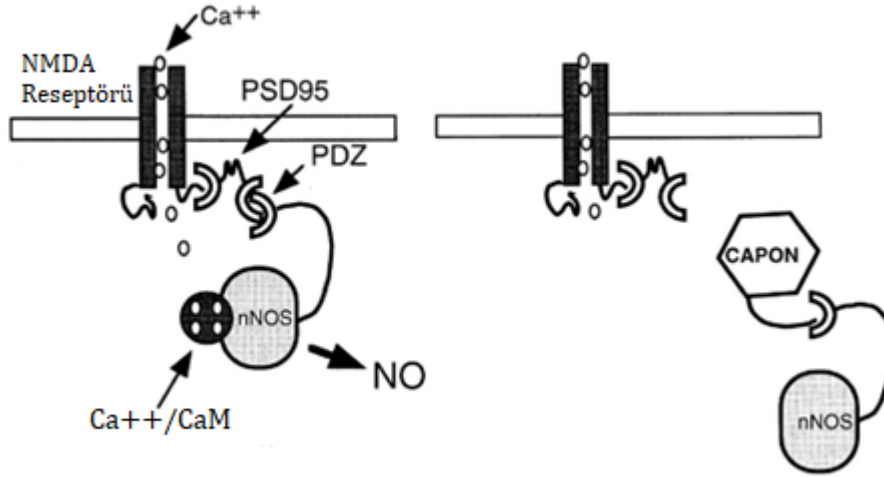
nNOS

Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS/NOS1) ilk kez sinir dokusunda bulunmuş ve bu nedenle bu isimle adlandırılmıştır. nNOS temel olarak beyin ve nöronda bulunsa da daha sonra birçok dokuda fizyolojik ve patolojik rollere sahip olduğu kanıtlanmıştır (3). 1434 aminoasitten oluşan ve 160,8 kDa moleküler ağırlığa sahip nNOS'un aktivitesi hücre içi aktivasyonla; Ca²⁺ ve CaM'e bağımlı olarak düzenlenmektedir. nNOS monomer haldeyken inaktif formdadır (24). nNOS enzimleri yapılarında bulunan PDZ bölgesi aracılığıyla diğer proteinlere bağlanabilmektedir (3). nNOS aktivitesini düzenleyen moleküler mekanizmaların başında PDZ etkileşimli düzenleyiciler, enzimin dimerizasyonu ve fosforilasyon gelmektedir:

PDZ Etkileşimli Düzenleyiciler

nNOS NH₂ terminalinde PDZ bölgesi taşımaktadır. nNOS'a özgü olan bu PDZ bölgesi enzimin çeşitli proteinlerle etkileşim kurmasına imkan sağlamaktadır. nNOS, PDZ-PDZ etkileşimi aracılığıyla postsinaptik dansite proteini (PSD)95 ve PSD93 ile etkileşim içindedirler ve N-metil-D-aspartat asit (NMDA) reseptörüne bağlanarak hücre içine Ca²⁺ girişinin düzenlenmesine aracılık etmektedir. Hücre içine giren Ca²⁺ miktarının artması ile enzim aktivitesinde artış meydana gelmektedir (25) (Şekil 7).

Şekil 7: nNOS ve PSD-95 etkileşimiyle enzim aktivitesinin düzenlenmesi (26).



PSD-93, Henle kulbunun çıkan kalın kolundaki bazolateral membranda, makula densa hücrelerinde, distal tübülde, kortikal toplayıcı kanalda, iç ve dış medullar toplayıcı kanalda, glomerüler epitelde ve Bowmann kapsülünde ifade edilmektedir. nNOS ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğu makula densanın bazolateral membran ve sitoplazmik vezikülünde PSD-93, nNOS ile birlikte yerleşim göstermektedir (27). nNOS'un PDZ bölgesine bağlanan PSD-93 ve PSD-95 ile yarışmalı aktivite gösteren nNOS'un karboksi-terminal PDZ ligandı CAPON (NOS1AP), sitoplazmik bir proteindir (26). CAPON, yapısında bulunan NH₂-terminal fosfotirozin bağlayan bölge, monomerik küçük G proteini Dexas1'e bağlanarak nNOS aktivitesi üzerinde düzenleyici etki göstermektedir (25).

Daha çok nöropsikiyatrik hastalıklar, şizofreni, kardiyak aksiyon potansiyeli hastalıkları, uzamış QT segmenti ile ilişkili rahatsızlıklar ve diyabetle ilişkili hastalıklardaki etkilerine yoğunlaşmış olsa da çocuklarda kronik böbrek hastalıkları ve böbrek yetmezliğinin önemli ve nadir görülen bir nedeni olan steroide dirençli nefrotik sendromda NOS1AP'nin 2 patojenik varyantına rastlanmıştır (28). Bu patolojik varyantların her ikisi de nefropatiye yol açmaktadır (29).

Dimerizasyon

nNOS, BH₄ ve L-arjinin bağlayarak dimerize olmakta ve böylece elektron akışı kolaylaştırılarak enzimin aktivasyonu sağlanmaktadır (24). Sağlıklı böbrek dokusunda nefron, makula densa, proksimal tübül, Henle kulbunun çıkan kalın kolu, distal tübül ve proksimal tübülde protein ve mRNA ekspresyonu saptanan nNOS (15), makula densada üretmiş olduğu NO ile tübüloglomerüler filtrasyonu baskılamaktadır. Nitroindazol (7-NI) perfüze edilen farelerde tübüloglomerüler filtrasyon artmış, nNOS^{-/-} farelerde bu etki saptanmamış olması nNOS'un filtrasyondaki rolünü kanıtlamıştır (30).

Enzim dimerizasyonunda etkili diğer bir molekül ilk kez sıçan hipokampusundan izole edilen nNOS'un protein inhibitörü (PIN), nNOS'un 17 aminoasitlik sekansına bağlanarak enzimin dimer yapısını destabilize etmekte, böylece enzim aktivitesini baskılamaktadır (31). Rocznik ve arkadaşları, 5/6 nefrektomi modelinde iç medullada PIN ekspresyonunun önemli oranda arttığı ve kronik böbrek yetmezliğinde yüksek düzeyde seyreden NO sentezini baskıladığı, buna bağlı olarak da tuz

tutulumu ve kan basıncının artmasına yol açtığını göstermişlerdir (32).

Fosforilasyon

nNOS fosforilasyonu enzim aktivitesinin düzenlenmesinde kritik role sahip olduğundan bazı kinazlar ve fosfatazların düzenlenmesi, nNOS aktivitesinin kontrolünde önemli bir role sahip olmuştur. Bu amaçla protein kinaz A (PKA), CaM bağımlı kinazlar, protein kinaz C (PKC) ve fosfataz 1 gibi enzimler nNOS aktivitesinin düzenlenmesinde sıklıkla çalışılan moleküller arasında yer almaktadır (24). Bununla birlikte enzimin farklı bölgelerindeki fosforilasyon, enzim aktivasyonunda farklılıklara yol açabilmektedir (33). nNOS'un fosforilasyonu, serin (Ser), treonin (Thr) ve tirozin (Tyr) amino asitlerinde meydana gelmektedir. En iyi karakterize edilen nNOS fosforilasyon bölgesi, enzimin redüktaz alanında bulunan Ser-847'dir (34). nNOS'un Ser 847 fosforilasyonu ile posttranslasyonel modifikasyonu, artmış sodyum tutulumuna ve hipertansiyona yol açabilecek bir değişime neden olmaktadır (35).

iNOS

iNOS (NOS2) Ca²⁺ bağımlı olmayan ve diğer NOS izoformlarına kıyasla yüksek miktarda NO üreten bir enzimdir. Böbrekte iNOS, intersitisyel hücreler, glomerüler parietal epitelyal hücreler, çıkan kalın kolun proksimal bölgesi, çıkan kalın kolun üst ve orta papiller parçası, toplayıcı kanalın meduller kısmında yer alan hücreler ile kaliks ve papillar epitelyal hücrelerde saptanmıştır (36).

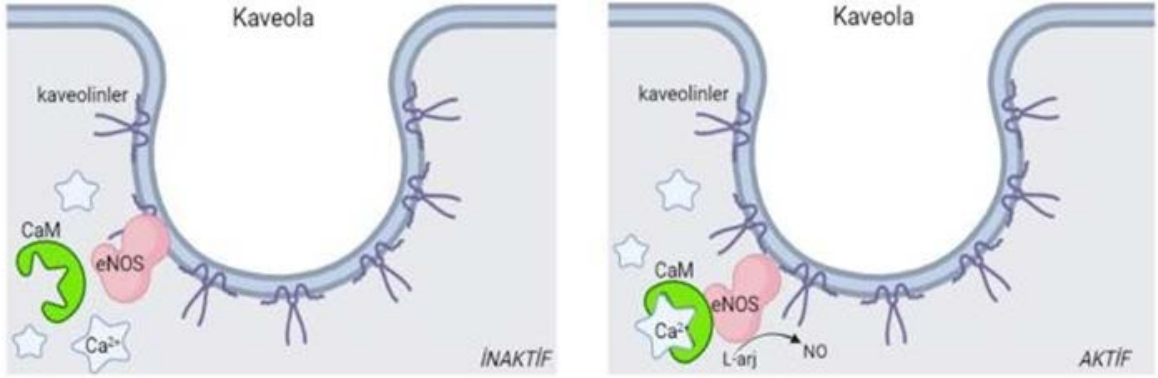
Proinflamatuvar sitokin salınımıyla ilişkili böbrek hastalıklarında iNOS aktivitesindeki artış LPS, TNF- α , NFkB, IL-1 β , IL-6 ile TGF- β molekülleri tarafından tetiklenmektedir (37, 38). 18-80 yaş arası endotoksemi hastaları ve sağlıklı bireylerde yapılmış olan bir çalışmada 2 ng/kg LPS uygulaması ile hasta grubunda renal iNOS enzim aktivitesinin tetiklendiği ve sepsis hastalarının idrar ve plazmalarında NO düzeyi ve renal iNOS'un arttığı saptanmıştır. Bununla birlikte renal iNOS, kontrol grubunda saptanamamışken LPS ile uyarılan hastalarda yüksek oranda eksprese olduğu bulunmuştur. Bu veriler böbrek hasar belirteçleri ile desteklendiğinde LPS ile uyarılan renal iNOS artışının hastalarda proksimal tübül hasarını tetiklediği kanıtlanmıştır (38). Bununla birlikte

renal hasar oluşturulan sıçan modelinde iNOS inhibitörü N-[3-(aminometil)benzil]asetamidin (1400W) uygulanan sıçanlarda histolojik hasar, artmış proteinüri, artmış böbrek hasar molekülü (KIM-1) ve azalmış kreatin klirensi gibi renal disfonksiyonlar ile tübülointersitisyel infiltrasyonun düzeldiği gözlenmiştir (39).

eNOS

eNOS, glomerulusun endotelial hücrelerinde, peritübüler kapillerde ve vasküler demette güçlü düzeyde eksprese edilen dimer yapıda bir enzimdir (3, 40). Sıklıkla kaveolin molekülüne bağlı kaveola bölgesinde lokalize olan bu enzim, intrasellüler Ca²⁺ düzeyindeki artışla Ca/CaM kompleksinin oluşumu ve eNOS'un kaveolinden ayrışması sonucu aktive olmaktadır (Şekil 8).

İntrasellüler Ca düzeyi düşene kadar aktif haldeki eNOS enzimi L-arjinin, oksijen ve NADPH substratları mevcut olduğu sürece NO sentezini sürdürmektedir (41).

Şekil 8: Kaveola bölgesinde eNOS'un Ca²⁺/CaM ile aktivasyonu.

eNOS enzim aktivitesini düzenleyen moleküler değişimler; enzim lokalizasyonundaki değişiklikler, substrat ilişkili düzenlenme, fosforilasyon, protein-protein etkileşimi, S-nitrozilasyon ve protein asetilasyonu olarak sınıflandırılmaktadır (42).

Substrat İlişkili Düzenleyiciler

eNOS aktivitesi endojen metilarjininler; NG-monometil-L-arjinin (L-NMMA) ve asimetrik dimetil arjinin (ADMA)'in enzimin aktif bölgesine arjinin ile yarışmalı olarak bağlanmasıyla inhibe edilebilmektedir (43). KBY hastalarında NOS aktivitesinin baskılandığı kanıtlanmış olup (44), Martinez ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada KBY modeli oluşturulan sıçanlarda eNOS aktivitesinin azalması, L-arjinin düzeyindeki yetersizlik ya da plazma ADMA düzeyindeki artış ile açıklanmıştır. L-arjinin ile yarışmalı aktivite gösteren endojen eNOS inhibitörü ADMA, aynı zamanda Ser1177 fosforilasyonunu da engelleyerek eNOS aktivitesinde inhibitör etki göstermektedir (45). Serum kreatinin değerleri ve kreatin klirensi bulguları ile böbrek fonksiyon kaybı olduğu desteklenen akut ve kronik böbrek yetmezliği olan 89 hastanın plazmasında kontrol grubuna göre daha yüksek oranda metilarjinin olduğu saptanmıştır (46).

Fosforilasyon

eNOS, yapısındaki fosforillenen serin, treonin ve tirozin kalıntıları sebebiyle dinamik olarak düzenlenebilen bir enzimdir. Buna göre yapılan çalışmalarda Ser633, Ser1176 ve Ser1177 fosforilasyonu enzim aktivitesinde artışa ve NO üretiminin sürdürülmesine neden olurken,

Thr494 ve Thr495 fosforilasyonu enzim aktivitesinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (35, 47). Bununla birlikte L-arjinin uygulanması sonucu eNOS dimerizasyonunda artış ve Hsp90 kompleksi oluşumunun gözlenmesi, böbrek vasküler tonusunun ve renal perfüzyonun düzelmesiyle renal kan akımı ve kreatin klirensinin artışı sağlanmıştır (45).

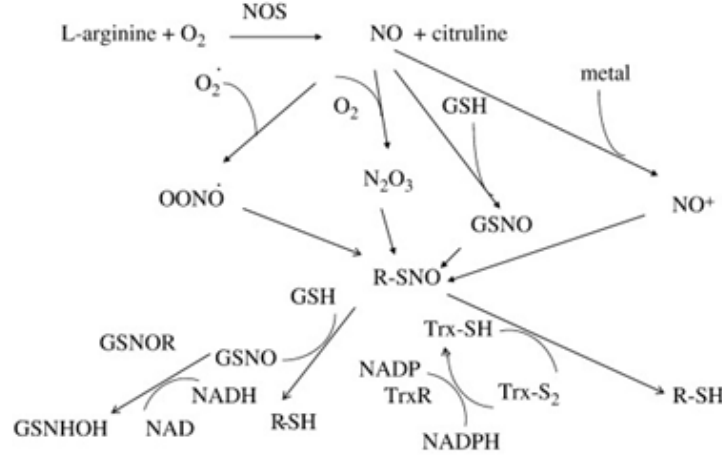
Protein- Protein Etkileşimi

NOSTRIN, eNOS ile protein-protein etkileşimi aracılığıyla enzimin kaveoladan ayrılmasına ve hücre içi bölgelere translokale olarak enzim aktivitesinin baskılanmasına neden olmaktadır (48, 49). Şimdiye kadar böbrek hasarında NOSTRIN'in fonksiyonu ile ilişkili yapılmış bir çalışma bulunmamasına rağmen preeklemsi hastalarında vasküler komplikasyonların yanı sıra sıklıkla ortaya çıkan sistemik karaciğer ve böbrek hasarı, bu dokularda da eNOS aktivitesinin NOSTRIN aracılığıyla düzenlenebileceğini düşündürmektedir (50).

S-Nitrozilasyon

S-nitrozilasyon, sisteinin tiyol grubuna NO'dan nitrozol grubu ekleyerek S-nitrozotiyol oluşturmak üzere gerçekleşen bir posttranslasyonel modifikasyondur. eNOS proteininin sistein kalıntılarında meydana gelen S-nitrozilasyon, enzim dimerizasyonunu bozarak aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır (51) (Şekil 9).

Şekil 9: S-nitrozilasyon reaksiyonları (GSH: Glutatyon, GSNO: S-nitrozoglutatyon, GSNOR: GSNO redüktaz R-SNO: S-nitrozotiyol türevi, R-SH: Sistein tiyol/sülfidril, Trx: Tiyoredoksin, TrxR: tiyoredoksin redüktaz) (52).



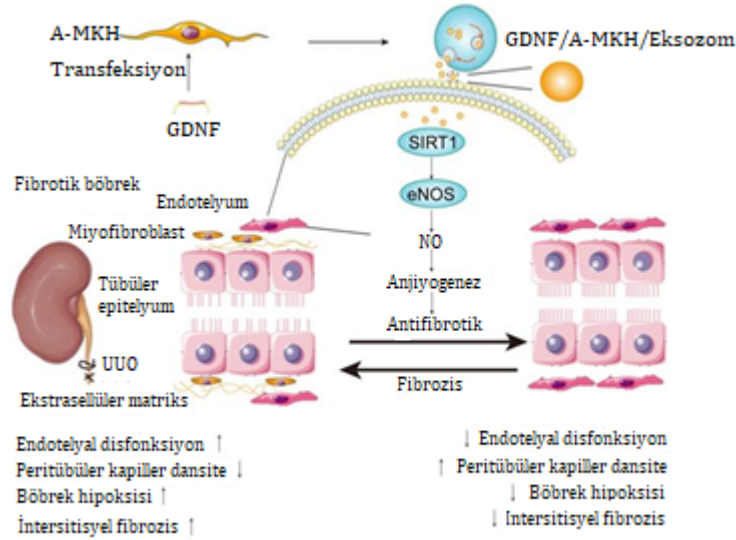
Böbrekte protein S- nitrozilasyonun, NO aracılı hüresel sinyal mekanizmalarına aracılık eden, böbrek hasarına karşı bir moleküler koruma mekanizması olduğu ve sağkalımı artırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, eNOS delesyonunda bu koruma mekanizmasının ortadan kalktığı gözlenmiştir (53).

Asetilasyon

Proteinlerin asetilasyonu, lizin gruplarının ε-amino gruplarında gerçekleşen ve lizin asetiltransferazlar tarafından uyarılan bir posttranslasyonel modifikasyondur. Aspirin ve asetilleyici ajanlar tarafından, eNOS'un CaM bağlanma bölgesindeki Lys 497 ve Lys 507 doğrudan asetillenmekte ve böylece enzim aktivitesi inhibe olmaktadır (54). eNOS'un deasetilasyonundan sorumlu enzim, histon deasetilaz 3 (HDAC3)'dür (42). eNOS asetilasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan sirtuin ailesi üyelerinden SIRT-1, sınıf III NAD⁺-bağımlı HDAC ailesinin bir üyesidir (54). Son yıllarda renal hasarın iyileşmesinde mezenkimal

kök hücre (MKH)'lerin terapötik etkisine glial hücre türevli nörotrofik faktörün aracılık ettiği kanıtlanmış, tübülointerstisyel fibrozisde peritübüler kapiller kaybın önlenmesi amacıyla unilateral üreteral obstrüksiyon fare modelleri oluşturulduğunda GDNF-MKH ile uyarılan anjiyojenik yanıtta SIRT-1 ve eNOS'un aracılık ettiği gösterilmiştir (Şekil 10) (55).

Şekil 10: GDNF gen transfeksiyonu yapılan insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerinden (A-MKH) elde edilen ekzozomların, unilateral üreteral obstrüksiyon (UUO) fare modellerinde SIRT1/eNOS aracılığıyla böbreklerdeki hasarı iyileştirdiği önerilen mekanizma (55).

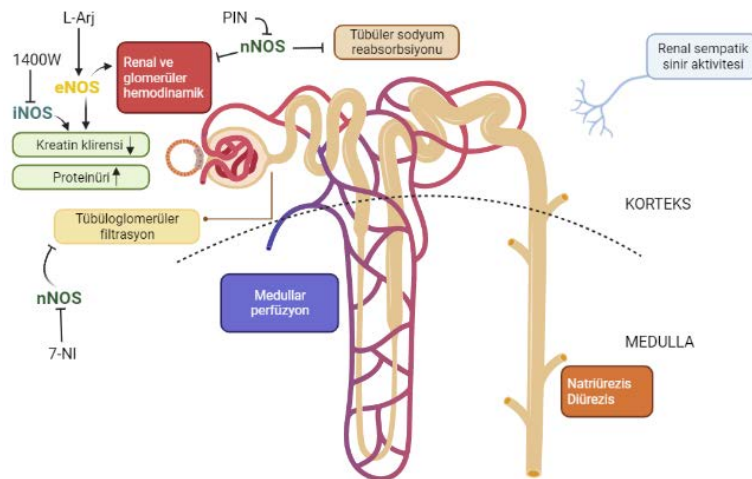


SONUÇ

Literatürlerden elde edilen bilgilere göre çeşitli böbrek fonksiyonlarında rol oynayan NO sentezinin bozulması ile böbrek hastalıkları arasında yakın bir ilişki olduğu anlaşılmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, böbrekte tübüler ve glomerüler fonksiyonların bozulmasına eşlik eden NOS aktivitesinin

düzenlenmesinin, gelişen patolojik durumun düzeltilebilmesi için kritik önem taşıdığını göstermiştir. Yapılan araştırmalara göre çeşitli böbrek hastalıklarında NOS aktivitesinin spesifik ajanlarla düzenlenmesi renal hemodinamik, tübüloglomerüler filtrasyon, kreatin klirensi, natriürezis ve diürezis gibi böbrek fonksiyonlarının düzelmesinde önemli rol oynamaktadır (Şekil 11).

Şekil 11. Böbrek hastalıklarında kullanılan NOS düzenleyicileri ve fonksiyonları.



Bu nedenle fizyolojik ve patolojik durumlarda NO'nun rolü ve NOS aktivitesinin düzenlenme mekanizmalarının anlaşılması ve geniş bir perspektifle değerlendirilebilmesi, çeşitli böbrek hastalıklarının gelişim mekanizmalarının aydınlatılmasında ve bunlara karşı yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesinde önemli bir paya sahip olacaktır..

KAYNAKLAR

1. Moncada S, Higgs E A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*. 2006;147, S193–S201.
2. Garcia X, Stein F. Nitric oxide. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 2006;17(2):55-57.
3. Mount P F, Power D A. Nitric oxide in the kidney : functions and regulation of synthesis. *Acta Physiologica*. 2006;187(4):433–446.
4. Förstermann U, Sessa W C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012;33, 829–837.
5. Alderton W K, Cooper C E, Knowles R G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001;357,593-615.
6. Sies H, Jones D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21, 363-383.
7. Araujo M, Welch W J. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2006;15:72–77.
8. Nezu M, Suzuki N. Roles of NRF2 in protecting the kidney from oxidative damage. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(8) 2951.
9. Irazabal M V, Torres V E. Reactive Oxygen Species and Redox Signaling in Chronic Kidney Disease. *Cells*. 2020;9(6):1342.
10. Ishimoto Y, Tanaka T, Yoshida Y, Inagi R. Physiological and pathophysiological role of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in the kidney. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2018;45(11):1097-1105.
11. Cavdar Z, Ozbal S, Celik A, Ergur B U, Guneli E, Ural C, et al. The effects of alpha-lipoic acid on MMP-2 and MMP-9 activities in a rat renal ischemia and re-perfusion model. *Biotech Histochem.*, 2014;89(4):304-14.
12. Cavdar Z, Oktan M A, Ural C, Calisir M, Kocak A, Heybeli C, et al. Renoprotective Effects of Alpha Lipoic Acid on Iron Overload-Induced Kidney Injury in Rats by Suppressing NADPH Oxidase 4 and p38 MAPK Signaling. *Biol Trace Elem Res*. 2020;193(2):483-493.
13. Cavdar Z, Oktan M A, Ural C, Kocak A, Calisir M, Heybeli C, et al. Alpha lipoic acid attenuates iron induced oxidative acute kidney injury in rats. *Biotechnic & Histochemistry*. 2021;96(6):409-417.
14. Oktan M A, Heybeli C, Ural C, Kocak A, Bilici G, Cavdar Z, et al. Alpha-lipoic acid alleviates colistin nephrotoxicity in rats. *Human and Experimental Toxicology*. 2021;40(5):761-771.
15. Carlström M. Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health. *Nature Reviews Nephrology*. 2021;0123456789.
16. Majid D S, Navar L G. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *American Journal of Hypertension*. 2001;14(6 Pt 2):745–825.
17. Granger J P, Alexander B T. Abnormal pressure-natriuresis in hypertension: role of nitric oxide. *Acta Physiologica Scandinavica*, 2000;168(1):161-8.
18. Jin C, Hu C, Polichnowski A, Mori T, Skeleton M, Ito S, et al. Effects of renal perfusion pressure on renal medullary hydrogen peroxide and nitric oxide production. *Hypertension*. 2019;53(6):1048-53.
19. Vallon V, Thomson S C. The tubular hypothesis of nephron filtration and diabetic kidney disease. *Nature Reviews. Nephrology*. 2020;16(6):317-336.
20. Ortiz P A, Garvin J L. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 2002;282(5):F777–F784.
21. Eppel G A, Denton K M, Malpas S C, Evans R G. Nitric oxide in responses of regional kidney perfusion to renal nerve stimulation and renal

- ischaemia. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. 2003;447, 205–213.
22. Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 2007;294(1):F1-9.
 23. Zatz R, Baylis C. Chronic Nitric Oxide Inhibition Model Six Years On. *Hypertension*. 1998;32(6):958-64.
 24. Zhou L, Zhu D Y. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 2009;20(4):223–230.
 25. Kone B C, Kuncewicz T, Zhang W, Yu Z, Bruce C, Kuncewicz T, et al. Protein interactions with nitric oxide synthases : controlling the right time , the right place , and the right amount of nitric oxide. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 2003;285(2):F178–190.
 26. Jaffrey SR, Snowman AM, Eliasson MJ, Cohen NA, Snyder SH. CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron*. 1998; 20(1):115-24.
 27. Kone B C. Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2000;168(1):27-31.
 28. Sun H. New kid on the block: NOS1AP is a newly recognized genetic cause of steroid-resistant nephrotic syndrome in infants. *Kidney International*. 2021;100(3):496-498.
 29. Majmundar A J, Buerger F, Forbes T A, Klämbt V, Schneider R, Deutsch K, et al. (2021) Recessive NOS1AP variants impair actin remodeling and cause glomerulopathy in humans and mice. *Science Advances*. 2021;7(1):eabe1386.
 30. Ren Y, Garvin J L, Ito S, Carretero O A. Role of neuronal nitric oxide synthase in the macula densa. *Kidney International*, 2001;60(5), 1676–1683.
 31. Fan J S, Zhang Q, Li M, Tochio H, Yamazaki T, Shimizu M, et al. Protein inhibitor of neuronal nitric-oxide synthase, PIN, binds to a 17-amino acid residue fragment of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273: 33472–33481.
 32. Roczniak A, Levine D Z, Burns K D. Localization of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat kidney. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 2000;278(5):F702-F707.
 33. Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Nakazawa A, Fukunaga K, Miyamoto E, et al. Phosphorylation of Neuronal Nitric Oxide Synthase at Ser847 by CaM-KII in the Hippocampus of Rat Brain After Transient Forebrain Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2002;22(9):1098-106.
 34. Sharma N M, Patel P K. Post-translational regulation of neuronal nitric oxide synthase: implications for sympathoexcitatory states. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2017;21(1):11-22.
 35. Mount P F, Fraser S A, Watanabe Y, Lane N, Katsis F, Chen Z P, et al. Phosphorylation of Neuronal and Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Kidney with High and Low Salt Diets. *Nephron. Physiology*. 2006;102(2):p36-50.
 36. Choi J-Y, Nam S-A, Jin D-C, Kim J, Cha J-H. Expression and Cellular Localization of Inducible Nitric Oxide Synthase in Lipopolysaccharide-treated Rat Kidneys. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2012;60(4) 301-315. DOI: 10.1369/002215541143613.
 37. Fan H, Le J-W, Sun M, Zhu J-H. Pretreatment with S-nitrosoglutathione attenuates septic acute kidney injury in rats by inhibiting inflammation, oxidation, and apoptosis. *Biomed Research International*. 2021;6678165.
 38. Heemskerk S, Pickkers P, Bouw M P W J M, Draisma A, van der Hoeven J G, Peters W H M, et al. Upregulation of Renal Inducible Nitric Oxide Synthase during Human Endotoxemia and Sepsis Is Associated with Proximal Tubule Injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;1(4) 853-862.
 39. Chirino Y I, Trujillo J, Sanchez-Gonzalez D J, Martinez-Martinez C M, Cruz C, Bobadilla N A. et al. Selective iNOS inhibition reduces renal damage induced by cisplatin. *Toxicology Letters*. 2008;176(1):48-57.
 40. Albrecht E W, Stegeman C A, Heeringa P, Henning R H, Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of Pathology*. 2002;199(1):8-17.
 41. Bucci M, Gratton J P, Rudic R D, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide

- synthesis and reduces inflammation. *Nature Medicine*. 2000;6(12):1362–1367.
42. Qian J, Fulton D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Frontiers in Physiology*. 2013;4:347.
 43. Lange C, Mowat F, Sayed H, Mehad M, Duluc L, Piper S, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 deficiency promotes vascular regeneration and attenuates pathological angiogenesis. *Experimental Eye Research*. 2016;147:148-155.
 44. Wever R, Boer P, Hijmering M, Stroes E, Verhaar M, Kastelein J, et al. Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1999;19(5):1168–1172.
 45. Amador-Martínez I, Pérez-Villalva R, Uribe N, Cortés-González C, Bobadilla N A, Barrera-Chimal J. Reduced endothelial nitric oxide synthase activation contributes to cardiovascular injury during chronic kidney disease progression. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2019;317(2):F275-F285.
 46. Akyurek F, Celik G, Ozturk B. Predictive role of methylarginines in renal failure. *Annals of Medical Research*. 2020;27(8):2129-33.
 47. Mount P F, Kemp B E, Power D A. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2007;42(2):271-9.
 48. Dedio J, König P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, Müller-Esterl W. NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *The FASEB Journal*, 2001;15(1):79-89.
 49. Schilling K, Opitz N, Wiesenthal A, Oess S, Tikkanen R, Müller-Esterl W, et al. Icking A. Translocation of Endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. *Molecular Biology of the Cell*. 2006;17(9):3870-80.
 50. Xiang W, Chen H, Xu X, Zhang R, Jiang R. Expression of endothelial nitric oxide synthase traffic inducer in the placentas of women with pre-eclampsia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2005;89, 103-107.
 51. Fernando V, Zheng X, Walia Y, Sharma V, Letson J, Furuta S. S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling. *Antioxidants*, 2019;8(9),404.
 52. Murphy E, Kohr M, Menazza S, Nguyen T, Evangelista A, Sun J, et al. Signaling by S-nitrosylation in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014;273:18-25.
 53. Zhou H L, Zhang R, Anand P, Stomberski C T, Qian Z, Hausladen A, et al. Metabolic reprogramming by the S-nitroso-CoA reductase system protects against kidney injury. *Nature*.2019;65(7737):96-100.
 54. Heiss E H, Dirsch V M. Regulation of eNOS Enzyme Activity by Posttranslational Modification. *Current Pharmaceutical Design*. 2014;20(22):3503-3513. Jaffrey S R, Snowman A M, Eliasson M J L, Cohen N A, Snyder S. H. (1998). CAPON: A Protein Associated with Neuronal Nitric Oxide Synthase that Regulates Its Interactions with PSD95. *Neuron*. 1998;20(1):115–124.
 55. Chen L, Wanhg Y, Li S, Zuo B, Zhang X, Wang F, et al. Exosomes derived from GDNF-modified human adipose mesenchymal stem cells ameliorate peritubular capillary loss in tubulointerstitial fibrosis by activating the SIRT1/eNOS signaling pathway. *Theranostics*. 2020;10(20):9425-9442.