

Sıçan mezenterik damar
yatağında vazokonstriksiyon ile
indüklenen nitrik oksit
oluşumunun NOS inhibisyonuna
duyarlı ve duyarsız bileşenleri

Dr. M. Ata SEÇİLMİŞ
Ç. Ü. Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab. D.

- Giriş (tarihçe ve çalışmanın amacı)
- Gereç ve yöntem
- Bulgular ve tartışma
- Sonuç

GİRİŞ

Kan basıncının düzenlenmesinde damar endoteliumu çok önemli bir role sahiptir.

- vazodilatör prostanoitler
- nitrik oksit (NO) ve
- endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör, (EDHF)

Endotelyal NO

kolinomimetikler,

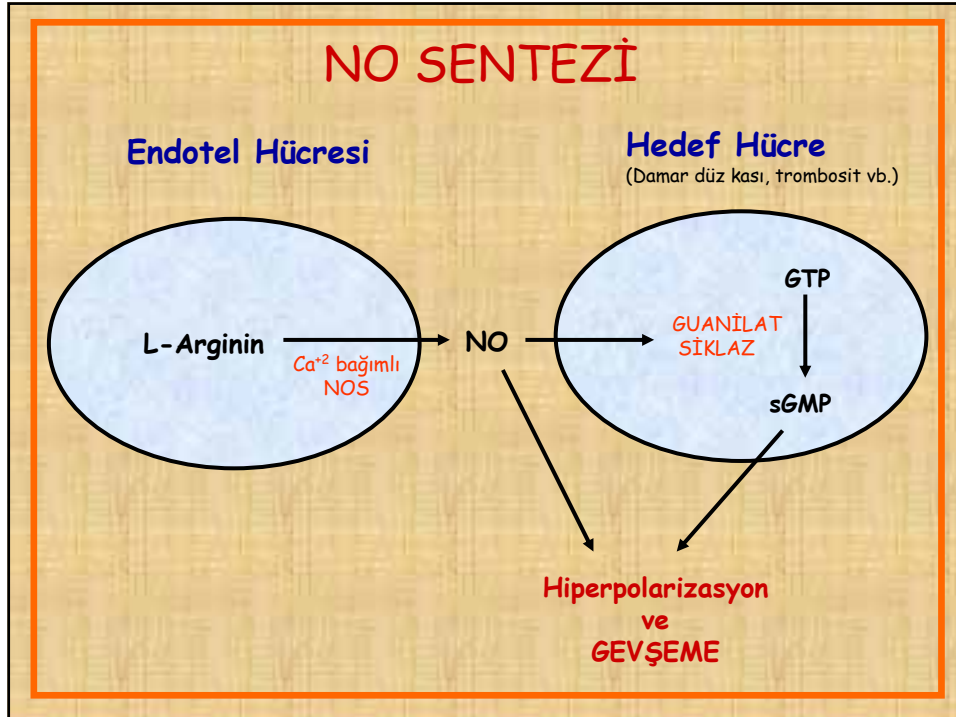
histamin,

P maddesi

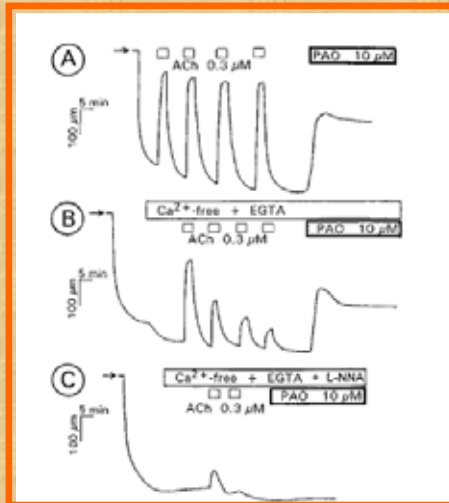
veya bradikinin

(gibi kimyasal uyarılar ile hücre içi kalsiyum artışına bağımlı)

Ayrıca,
basınç (*pressure, transmural force*),
akım (*shear stress*)
(gibi damar duvarında oluşturulan mekanik etkiler ile sentezlenip saliverilme).

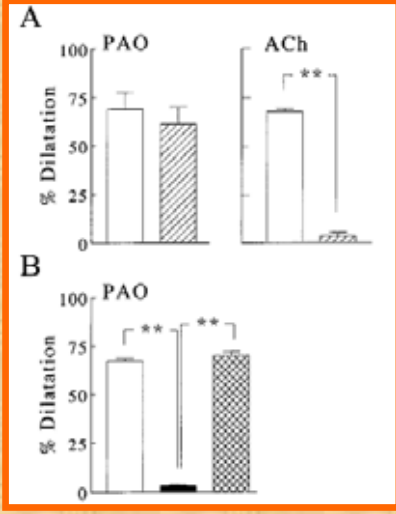


Ca²⁺-Independent Activation of the Endothelial Nitric Oxide Synthase in Response to Tyrosine Phosphatase Inhibitors and Fluid Shear Stress
Ingrid Fleming, Johann Bauersachs, Beate Fisslthaler and Rudi Busse
Circ. Res. 1998;82:686-695



İzole perfüze Tavşan karotis arterinde asetilkolin ve fenilarsin oksid (PAO) gevşemesi üzerine kalsiyumsuz ortam ve L-NNA etkisi

Fleming et al April 6, 1998



A-Kalmidazolyum (yokluğunda (beyaz sütun) ve varlığında (10 μ M, çiz. Sütun) fenilarsin oksid (10 μ M, PAO) ve asetilkolin (ACh) yanıtları (Preparat: tavşan karotis arteri)

B-Tirozin kinaz inhibitörleri erbstatin A (30 μ M, siyah sütun) veya Genistein 100 μ M (çiz. Sütun) varlığında PAO (10 μ M yanıtları)

Fleming et al April 6, 1998

NOS İNHİBİSYONU

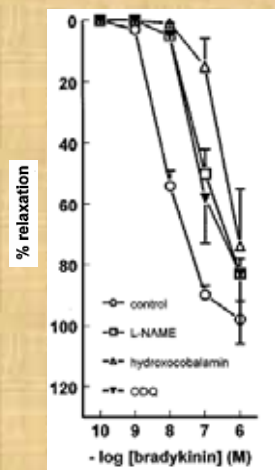
NO sentezi, L-arjinin analogları olan;
N^ω-nitro-L-arjinin (L-NA),
N^ω-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME),
N^ω-monometil-L-arjinin (L-NMMA)
N^ω-iminoetil-L-ornitin (L-NIO)
gibi NOS inhibitörleri tarafından önlenir.

NOS inhibitörleri varlığında NO yanıtları

L-NAME-resistant bradykinin-induced relaxation in porcine coronary arteries is NO-dependent: effect of ACE inhibition

¹A.H. Jan Danser, ¹Beril Tom, ¹René de Vries & ¹Pramod R. Saxena

¹Department of Pharmacology, Erasmus University Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands



Domuz koroner arterlerinde bradikinin gevşemeleri üzerine L-NAME (100 μM), Hidroksokobalamin (200 μM) ve ODQ (10 μM) etkisi



Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation resistance to N^G -nitro-L-arginine and indomethacin in coronary circulation

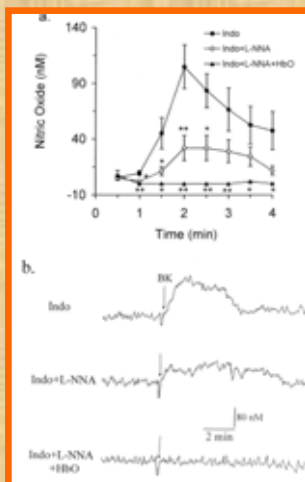
Zhi-Dong Ge^a, Xiao-Hui Zhang^b, Peter Chin-Wan Fung^b, Guo-Wei He^{a,c,*}

^aCardiovascular Research Laboratory, Grantham Hospital, Department of Surgery, The University of Hong Kong, Hong Kong S.A.R, China

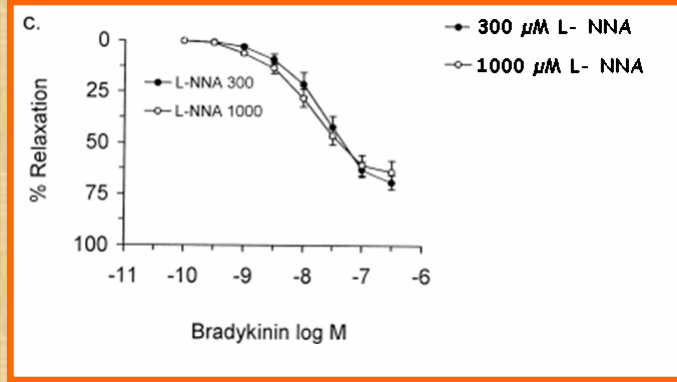
^bDivision of Medical Physics, Department of Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong S.A.R, China

^cCardiovascular Research, Albert Starr Academic Center for Cardiac Surgery, St. Vincent Hospital, Portland, Oregon, USA

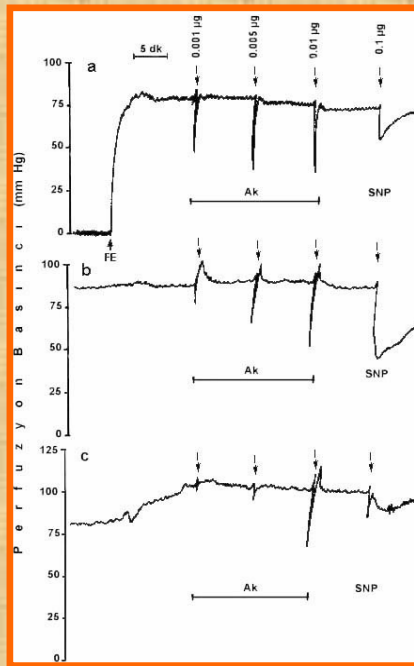
Received 13 July 1999; accepted 10 January 2000



Domuz koroner arterinde 0.1 μ M
bradikinin ile oluşturulan NO salınımı
İndo: 7 μ M
L-NNA: 300 μ M
HbO: 20 μ M



Z-D. Ge et al. / Cardiovascular Research 46 (2000) 547-556



İzole perfüze mezenterik damar yatağında
(a) Asetilkolin ve sodyum nitroprussid (SNP) ile oluşturulan gevşemeler üzerine
(b) L-NA (100 μ M) ve
(c) hidroskobalamin (100 μ M, HC) etkisi

Seçilmiş MA, 2001, doktora tez çalışması



ELSEVIER

Cardiovascular Research 57 (2003) 207–216

Cardiovascular
Research

www.elsevier.com/locate/cardiores

NO contributes to EDHF-like responses in rat small arteries: a role for NO stores

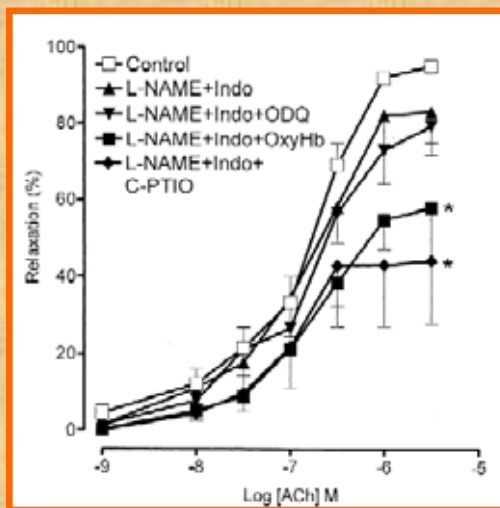
Shamila Chauhan^{a,*}, Awahan Rahman^b, Holger Nilsson^b, Lucie Clapp^a,
Raymond MacAllister^a, Amrita Ahluwalia^c

^aCentre for Clinical Pharmacology, University College London, The Rayne Institute, 5 University Street, London WC1E 6JJ, UK

^bDepartment of Physiology, Aarhus University, Universitetsparken 180, DK 8000 Aarhus C, Denmark

^cDepartment of Clinical Pharmacology, Barts and The London, Charterhouse Square, London EC1M 4BQ, UK

Received 21 March 2002; accepted 10 July 2002



Indo: 5 μ M
L-NAME: 300 μ M
ODQ: 1 μ M
OxyHb: 20 μ M
C-PTIO: 300 μ M
Preparat: mezenterik damar

S. Chauhan et al. / Cardiovascular Research
57 (2003) 207–216

- NOS inhibitörlerine duyarsız NO etkisi

- mekanik etkenlerle uyarılan NO sentezi farklı hücresel işlemleri içerir (*Fleming I ve arkadaşları, 1998*).

Mekanik etkenlerle uyarılan NO sentezinin NOS inhibitörlerine yanıtı?

Bu nedenle,
izole perfüze sıçan mezenterik damar yatağında yapılan bu çalışmada, L-NA ve L-NAME gibi NO sentez inhibitörlerinin varlığında, fenilefrin (FE) ile oluşturulan kasılmalara bağlı basınç artışları oluşturulduktan sonra,

bu artışlar üzerine bir NO yakalayıcısı olan hidrokobalamin (HK)'in etkileri kaydedilerek bu gevşetici faktörün NOS inhibisyonuna duyarlı ve duyarsız bileşenleri araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deneylerde ağırlıkları 200-300 g arasında değişen erkek Wistar sıçanlar halotan anestezisi altında kanatılarak öldürüldükten sonra, abdominal bölge bir kesi ile açılmış ve süperiyor mezenterik arter hızla kanüle edilerek damar yatağı Krebs çözeltisi ile yıkanarak içindeki kan uzaklaştırılmıştır

Daha sonra, mezenterik damar yatağı, barsaklardan özenle izole edilmiş ve bütün olarak, sıcaklığı 37° C 'de sabit tutulan bir organ banyosuna alınarak, %95O₂ ve %5 CO₂ karışımı ile sürekli olarak gazlandırılan Krebs çözeltisi ile damar yatağı perfüze edilmiştir

Perfüzyon hızı 6 ml/dakika,
Perfüzyon sıvısının sıcaklığı, 37° C' de
sabit tutulmuştur.

Perfüzyon basıncı, dokuya yakın bir
noktasından bağlanmış bir transdüsör
(Keller PRC 21K-10) aracılığı ile poligrafa
(Gemini 7070) sürekli kaydedilmiştir

Doku 60 dakika süre ile dengelenme periyoduna bırakılarak perfüzyon basıncının kararlı duruma gelmesi beklenmiştir.

Bu koşullar (sabit akım ve sabit basınç) altında dokuya verilen herhangi bir ilaca bağlı perfüzyon basıncındaki oluşan değişiklikler, damar direncindeki değişmelerin bir ölçüsü olarak kabul edilmiştir.

60 dakika inkübasyondan sonra, damar yatağı 100 mM KCl içeren Krebs çözeltisi ile perfüze edilerek basınç artışları oluşturuldu

Her preparatta, deneylere başlamadan önce, asetilkolin (0.01 μ g/0.1 ml) dokuya yakın bir yerden bolus biçiminde verilerek endotel işlevi test edilmiştir.

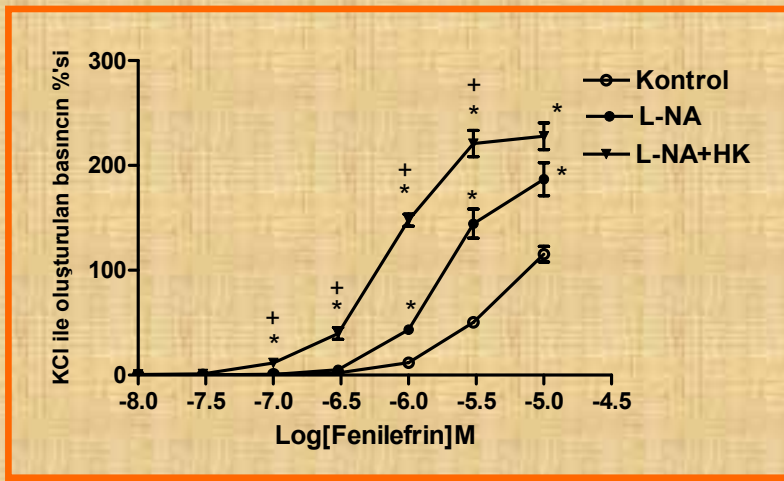
Prostanoidleri uzaklaştırmak amacıyla, siklooksijenaz inhibitörü olan indometasin (1 μ M) tüm çözeltilerde önceden bulundurulmuştur.

- Endotelium hasarı oluşturmak amacı ile, doku bir deterjan olan saponin ile (50 mg/l) 5 dk perfüze edilmiştir

- **Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz**
- Kullanılan vazoaktif maddelerin perfüzyon basıncında yaptığı değişiklikler mmHg olarak ölçülmüştür. Elde edilen değerler KCl' nin neden olduğu perfüzyon basıncındaki artışın yüzdesi olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (*analysis of variance*, [ANOVA]) ve Bonferroni *post-hoc* testi kullanılmıştır.

BULGULAR

**L-NA Varlığında FE ile Oluşturulan
Basınç Artışları Üzerine HK'nin
Etkisi**

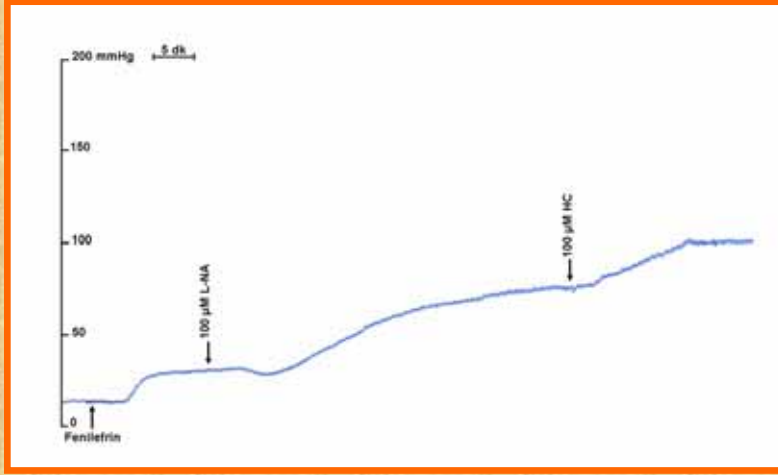


Şekil 1. İzole perfüze mezenterik damar yatağında, kontrol, N^o-nitro-L-arjinin (N^o-nitro-L-arginine, [L-NA, 100 μ M]) ve L-NA+hidroksokobalamin (HK, 100 μ M) varlığında fenilefrin (10⁻⁸-10⁻⁵ M) ile oluşturulan basınc artışları. Değerler KCl (100 mM) içeren Krebs çözeltisi ile perfüzyon sonucu oluşan basıncın %'si olarak ifade edilmiştir. n= 5. * Kontrol ve + L-NA gruplarından istatistiksel olarak anlamlı farklı ($p < 0.05$).

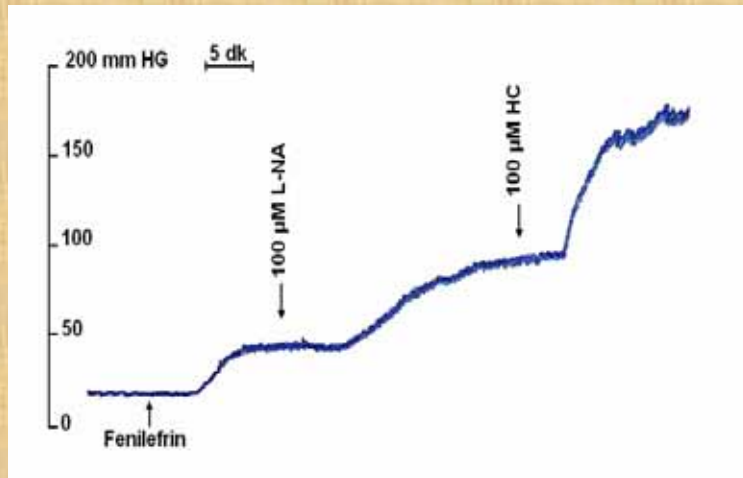
Tablo 1. Fenilefrin (FE) kontrol, N^o-nitro-L-arjinin (N^o-nitro-L-arginine, [L-NA]) ve L-NA+ hidroksokobalamin (HK) varlığında elde edilen yanıtla ilişkin pEC₅₀ değerleri.

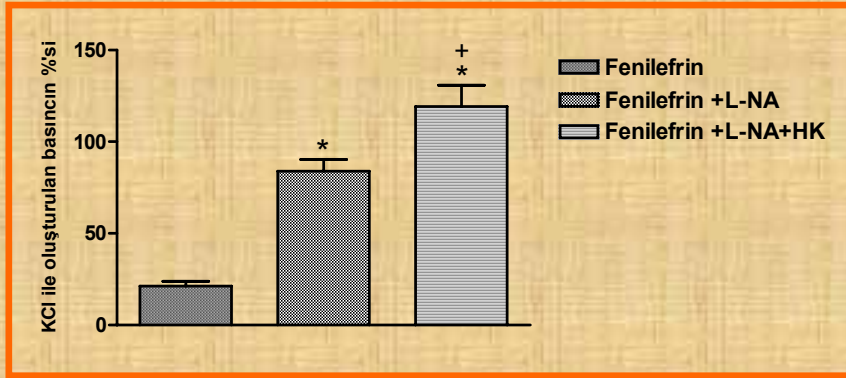
	pEC ₅₀ deđerleri		
	Kontrol	L-NA	L-NA+HK
FE	4.834± 0.045 (n=5)	5.540± 0.060* (n= 5)	6.074±0.046** (n= 5)

pEC₅₀: -Log(EC₅₀). * Kontrol ve + L-NA gruplarından istatistiksel olarak anlamlı farklı ($p < 0.001$).



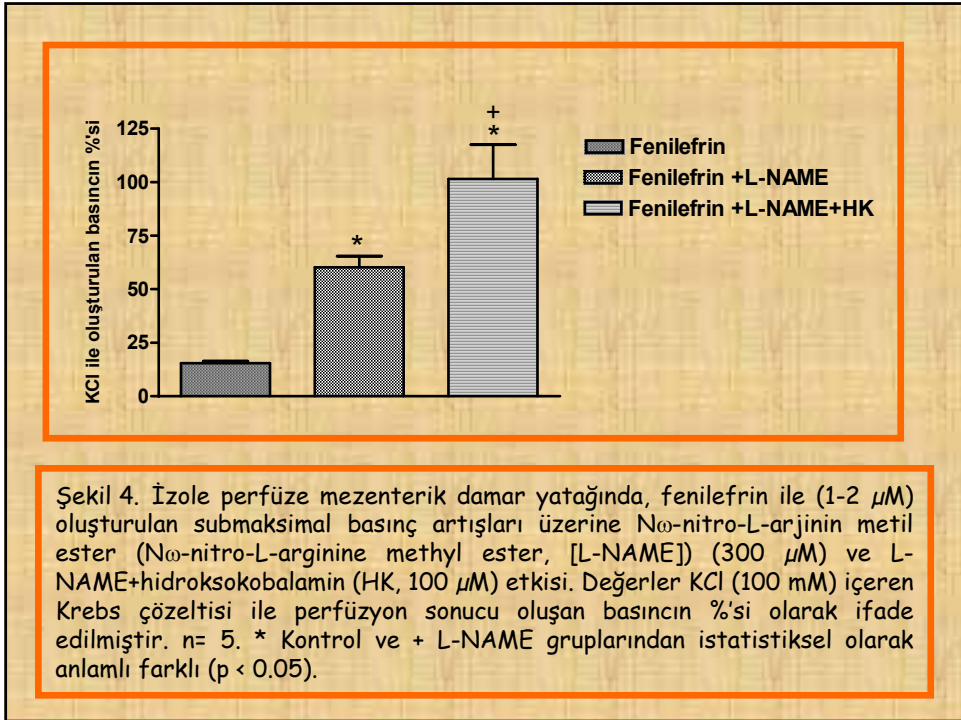
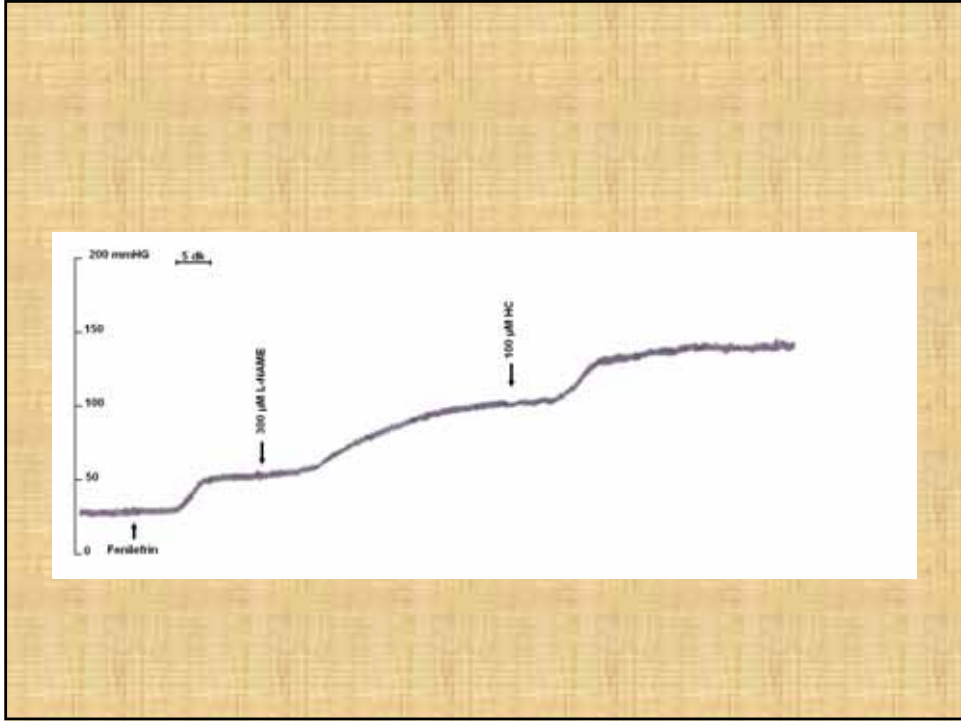
Şekil 2. İzole perfüze mezenterik damar yatağında, fenilefrin ile ($2 \mu\text{M}$) oluşturulan submaksimal basınç artışları üzerine $\text{N}\omega$ -nitro-L-arginin ($\text{N}\omega$ -nitro-L-arginine, [L-NA]) ($100 \mu\text{M}$) ve L-NA+hidroksokobalamin (HK, $100 \mu\text{M}$) ile oluşturulan basınç artışlarını gösteren temsili bir trase.





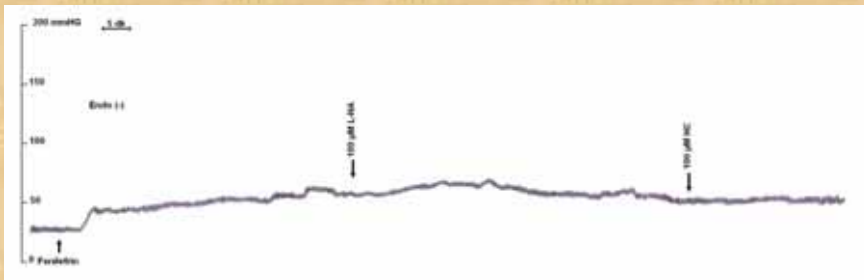
Şekil 3. İzole perfüze mezenterik damar yatağında, fenilefrin ile (1-2 μM) oluşturulan submaksimal basınç artışları üzerine N ω -nitro-L-arginin (N ω -nitro-L-arginine, [L-NA]) (100 μM) ve L-NA+hidroksokobalamin (HK, 100 μM) etkisi. Değerler KCl (100 mM) içeren Krebs çözeltisi ile perfüzyon sonucu oluşan basıncın %'si olarak ifade edilmiştir. n= 8. * Kontrol ve + L-NA gruplarından istatistiksel olarak anlamlı farklı ($p < 0.05$).

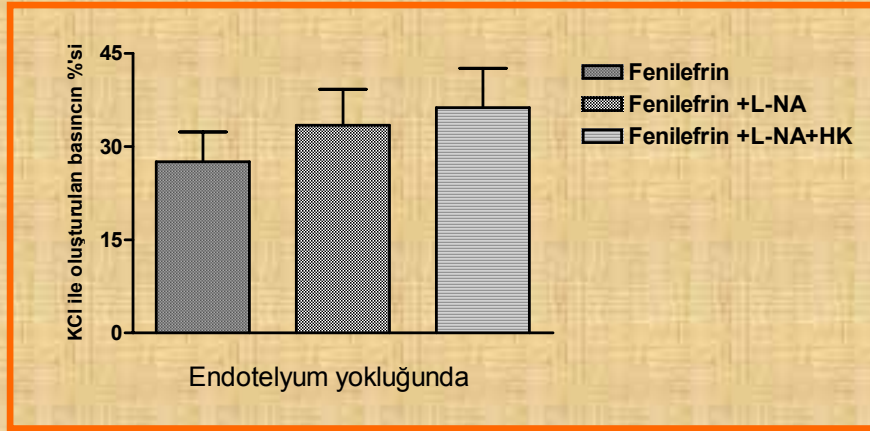
FE ile Oluşturulan Submaksimal Basınç Artışları Üzerine L-NAME ve L-NAME+ HK'nin Etkisi



Şekil 4. İzole perfüze mezenterik damar yatağında, fenilefrin ile (1-2 μM) oluşturulan submaksimal basınç artışları üzerine N ω -nitro-L-arginin metil ester (N ω -nitro-L-arginine methyl ester, [L-NAME]) (300 μM) ve L-NAME+hidroksokobalamin (HK, 100 μM) etkisi. Değerler KCl (100 mM) içeren Krebs çözeltisi ile perfüzyon sonucu oluşan basıncın %'si olarak ifade edilmiştir. n= 5. * Kontrol ve + L-NAME gruplarından istatistiksel olarak anlamlı farklı ($p < 0.05$).

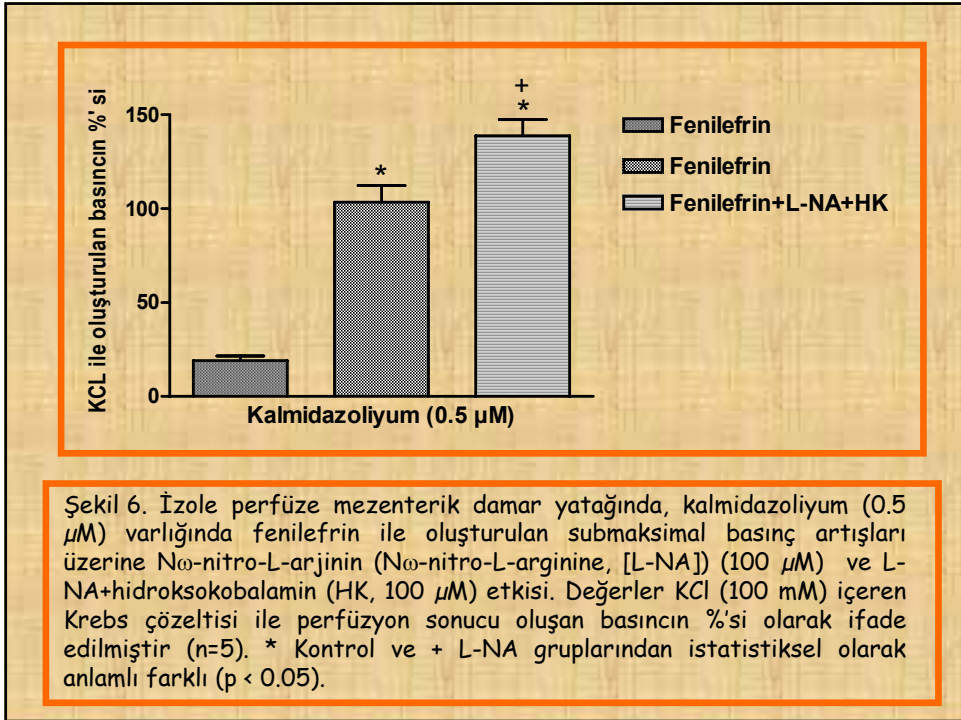
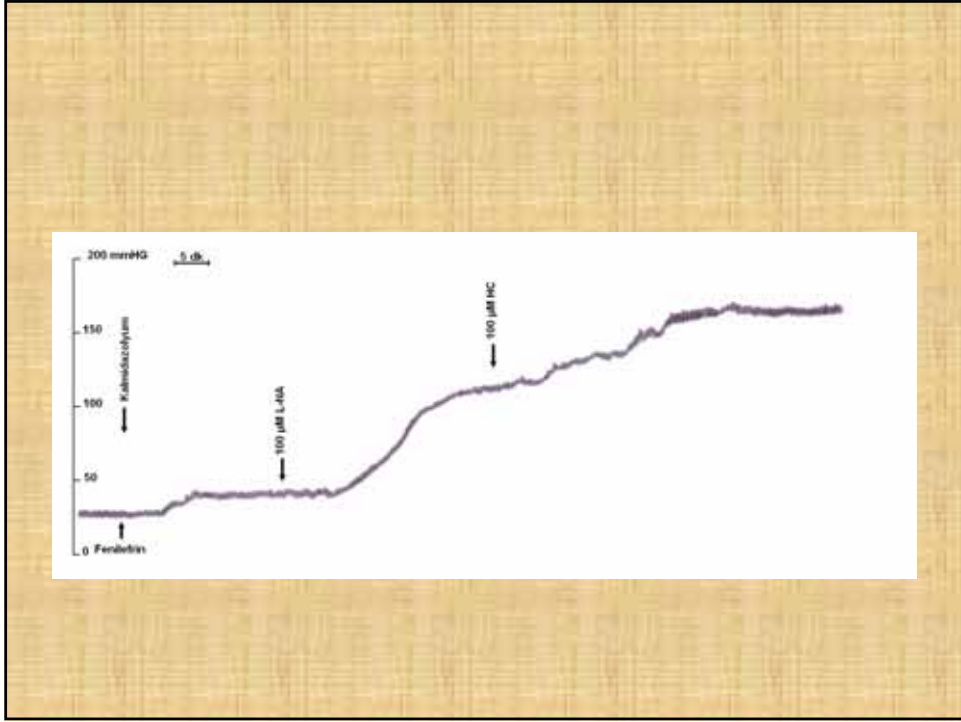
**Endoteliyum Yokluğunda FE ile
Oluşturulan Submaksimal Basınç
Artışları Üzerine L-NA ve L-
NA+HK'nin Etkisi**





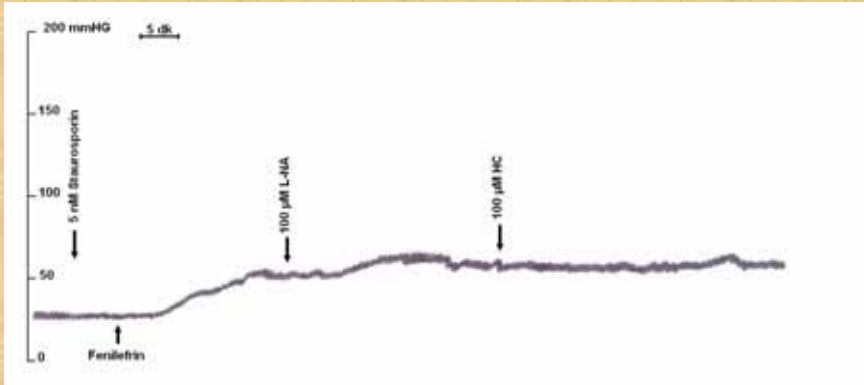
Şekil 5. İzole perfüze mezenterik damar yatağında, endotelyum yokluğunda fenilefrin ile (1-2 μM) oluşturulan submaksimal basınç artışları üzerine N ω -nitro-L-arjinin (N ω -nitro-L-arginine, [L-NA]) (100 μM) ve L-NA+hidroksokobalamin (HK, 100 μM) etkisi. Değerler KCl (100 mM) içeren Krebs çözeltisi ile perfüzyon sonucu oluşan basıncın %'si olarak ifade edilmiştir (n=5).

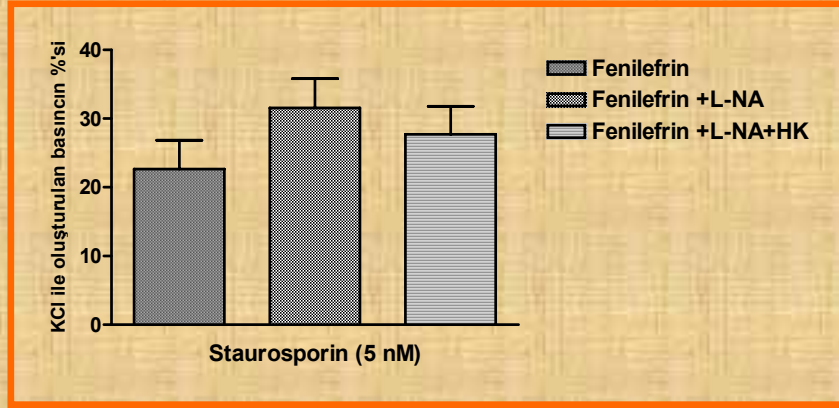
Kalsiyum-Kalmodulin İnhibisyonu Varlığında FE ile Oluşturulan Basınç Artışları Üzerine L-NA ve L-NA+HK'nin Etkisi



Şekil 6. İzole perfüze mezenterik damar yatağında, kalmidazoliyum (0.5 µM) varlığında fenilefrin ile oluşturulan submaksimal basınç artışları üzerine N^o-nitro-L-arginin (N^o-nitro-L-arginine, [L-NA]) (100 µM) ve L-NA+hidroksokobalamin (HK, 100 µM) etkisi. Değerler KCl (100 mM) içeren Krebs çözeltisi ile perfüzyon sonucu oluşan basıncın %'si olarak ifade edilmiştir (n=5). * Kontrol ve + L-NA gruplarından istatistiksel olarak anlamlı farklı (p < 0.05).

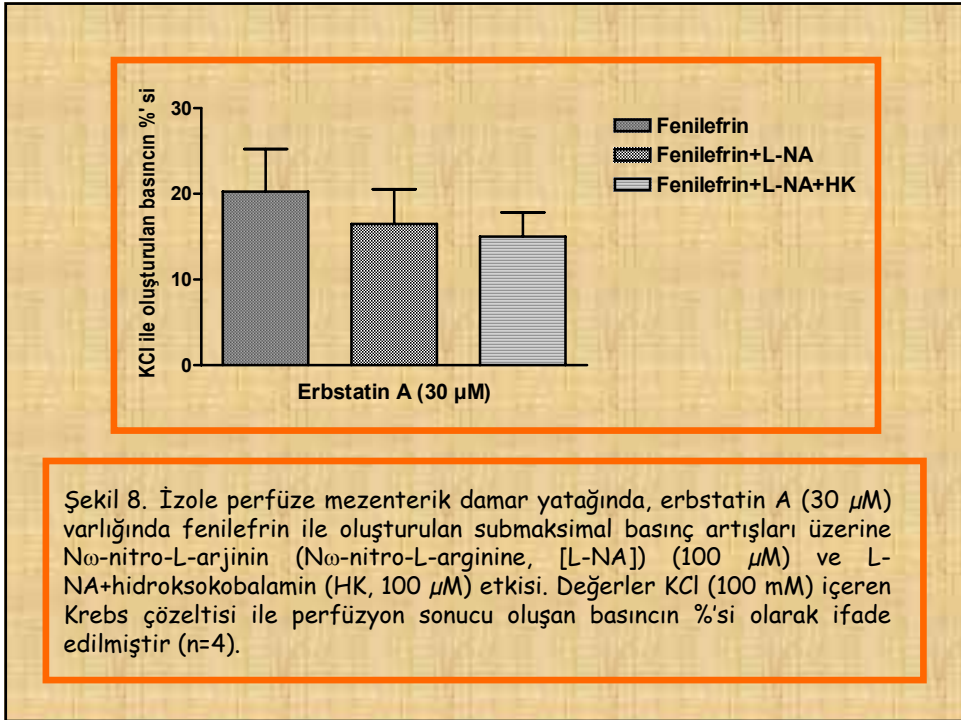
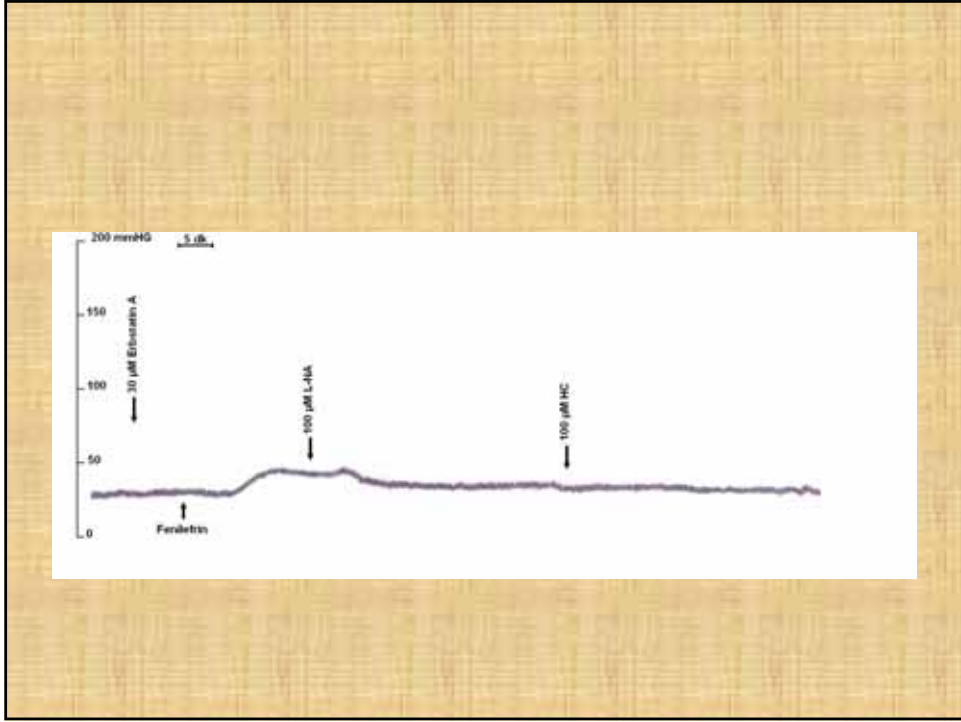
**Seçici Olmayan Kinaz İnhibitörü
Staurosporin Varlığında FE ile
Oluşturulan Basıncı Artışları
Üzerine HK'nin Etkisi**





Şekil 7. İzole perfüze mezenterik damar yatağında, staurosporin (5 nM) varlığında fenilefrin ile oluşturulan submaksimal basınç artışları üzerine N ω -nitro-L-arjinin (N ω -nitro-L-arginine, [L-NA]) (100 μ M) ve L-NA+hidroksokobalamin (HK, 100 μ M) etkisi. Değerler KCl (100 mM) içeren Krebs çözeltisi ile perfüzyon sonucu oluşan basıncın %'si olarak ifade edilmiştir (n=4).

Tirozin Kinaz İnhibitörü Erbstatin A Varlığında FE ile Oluşturulan Basınç Artışları Üzerine L-NA ve L-NA+HK'nin Etkisi



SONUÇ

Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar,
1) izole perfüze mezenterik damar yatağında vazokonstriksiyona bağlı olarak artan basınç ile indüklenen NO'nun NOS inhibisyonuna duyarlı ve duyarsız bileşenlerinin varlığını,

2) duyarsız bileşenin hücre içi kalsiyum kalmodulin kenetlenmesinden bağımsız, ancak; protein kinaz etkinliğine bağımlı olduğunu ve

3) bu bileşenin, damar yatağının kasılma ve buna bağlı basınç artışlarının modülasyonunda önemli bir role sahip olabileceğini göstermektedir.

• ÇALIŞMANIN DEVAMINDA

Circulation Research

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

American Heart
Association® 
Learn and Live...

Pulsatile Stretch in Coronary Arteries Elicits Release of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor : A Modulator of Arterial Compliance

Rüdiger Popp, Ingrid Fleming and Rudi Busse

Circ. Res. 1998;82:696-703

Circulation Research is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas,
TX 75254
Copyright © 1998 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7330. Online
ISSN: 1524-4571



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

European Journal of Pharmacology 485 (2004) 263–268



www.elsevier.com/locate/ejphar

Rho-kinase expression and its contribution to the control of perfusion pressure in the isolated rat mesenteric vascular bed

Kansu Büyükkafşar^{a,*}, Onur Ankan^a, Mustafa Ark^a, Ata Seçilmiş^b, İsmail Ün^a, Ergin Şingirik^b

^aDepartment of Pharmacology, Medical Faculty Mersin University, Campus Yataşlıpın 33169, Mersin, Turkey

^bDepartment of Pharmacology, Medical Faculty Çukurova University, 01330 Balıçık, Turkey

Received 24 July 2003; received in revised form 19 November 2003; accepted 28 November 2003

- **Kaynaklar**
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263:663-665.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacologic Reviews* 1991; 43: 109-141.
- Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 1988; 95: 1165-1174.
- Vanheel B, Van de Voorde J. EDHF and residual NO: different factors. *Cardiovasc Res* 2000; 370-375.
- Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacol Res* 2004; 49: 503-8.
- [Fleming I](#), [Bauersachs J](#), [Fisslthaler B](#), [Busse R](#). Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res*. 1998; 82: 686-95.
- [Simonsen U](#), [Wadsworth RM](#), [Buus NH](#), [Mulyany MJ](#). In vitro simultaneous measurements of relaxation and nitric oxide concentration in rat superior mesenteric artery. *J Physiol*. 1999 ;516: 271-82.

- [Ge ZD](#), [Zhang XH](#), [Fung PC](#), [He GW](#). Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation resistance to N(G)-nitro-L-arginine and indomethacin in coronary circulation. *Cardiovasc Res*. 2000; 46: 547-56.
- [Chauhan S](#), [Rahman A](#), [Nilsson H](#), [Clapp L](#), [MacAllister R](#), [Ahluwalia A](#). NO contributes to EDHF-like responses in rat small arteries: a role for NO stores. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 207-16.
- [Rajanyagam MA](#), [Li CG](#), [Rand MJ](#). Differential effects of hydroxocobalamin on NO-mediated relaxations in rat aorta and anococcygeus muscle. *Br J Pharmacol* 1993;108:3-5.
- [Favaloro JL](#), [Kemp-Harper BK](#). The nitroxyl anion (HNO) is a potent dilator of rat coronary vasculature. *Cardiovasc Res* 2007; 73:587-96.
- Büyükafşar K, O Ankan, M Ark, A Seçilmiş, I Un and E Singirik, "Rho-kinase Expression and its Contribution to the Control of Perfusion Pressure in the Isolated Rat Mesenteric Vascular Bed," *Eur J Pharmacol* 2004; 485: 263-268.
- [Seçilmiş M A](#), [O Y Ozü](#), [M Emre](#), [K Büyükafşar](#), [O E Kiroglu](#), [P Ertuğ](#), [Y Karatas](#), [S Onder](#) and [E Singirik](#). "Urococtin induces endothelium-dependent vasodilatation and hyperpolarization of rat mesenteric arteries by activating Ca²⁺-activated K⁺ channels," *Tohoku J Exp Med* 2007; 213: 89-98
- [Kuo L](#), [Chilian WM](#), [Davis MJ](#). Interaction of pressure- and flow-induced responses in porcine coronary resistance vessels. *Am J Physiol* 1991; 261: H1706-15.
- [Buvinc S](#), [Huidobro-Toro JP](#). Basal tonic release of nitric oxide coupled to cGMP production regulates the vascular reactivity of the mesenteric bed. *Eur J Pharmacol* 2001; 424: 221-7.
- [Fujjoka H](#), [Ayajiki K](#), [Shinozaki K](#), [Okamura T](#). Mechanisms underlying endothelium-dependent flow increase in perfused rat mesenteric vascular bed. *Eur J Pharmacol* 2004; 485: 219-25.
- [Kemp BK](#), [Cocks TM](#). Evidence that mechanisms dependent and independent of nitric oxide mediate endothelium-dependent relaxation to bradykinin in human small resistance-like coronary arteries. *Br J Pharmacol* 1997;120: 757-62.

TEŐEKKÜR

Ç. Ü. Tıp Fakóltesi Farmakoloji Anabilim Dalı BaŐkanı
Prof. Dr. Ergin Şingirik ve çalıŐma arkadaşlarma,

M. Ü. Tıp Fakóltesi Farmakoloji Anabilim Dalı BaŐkanı
Prof. Dr. Kansu BüyükaŐar,

H. Ü. Tıp Fakóltesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim
Üyesi sayın Prof. Dr. Meral Tuncer'e desteklerinden
dolayı teŐekkürlerimi sunarım.