

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

İZOLE TAVŞAN AORTUNDA PENTOKSİFİLİN'İN
VAZODİLATÖR ETKİSİNDE ENDOTEL KAYNAKLI GEVŞETİCİ
FAKTÖR'ÜN VE FOSFODİESTERAZ İNHİBİTÖRÜ
ETKİNLİĞİNİN OLASI ROLÜ

UZMANLIK TEZİ

Dr. İrfan KAPUTLU

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Gülay ŞADAN

ANTALYA , 1993

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

İZOLE TAVŞAN AORTUNDA PENTOKSİFİLİN'İN
VAZODİLATÖR ETKİSİNDE ENDOTEL KAYNAKLI GEVŞETİCİ
FAKTÖR'ÜN VE FOSFODİESTERAZ İNHİBİTÖRÜ
ETKİNLİĞİNİN OLASI ROLÜ

T855/1-1

UZMANLIK TEZİ
Dr. İrfan KAPUTLU

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Gülay ŞADAN

Bu çalışma Akdeniz üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından desteklenmiştir

(Proje No: 92.01.0103.03)

* Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir *

ANTALYA , 1993

355

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. Gülay ŞADAN'a daha önceki çalışmalarında olduğu gibi tezimin hazırlanmasında da gösterdiği titizlik ve bilimsel katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri ile diğer çalışma arkadaşlarıma da teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

1- GİRİŞ ve AMAÇ	1-4
2- GENEL BİLGİLER.....	5-29
3- GEREÇ VE YÖNTEM.....	30-32
4- BULGULAR.....	33-45
5- TARTIŞMA.....	46-50
6- SONUÇLAR.....	51
7- ÖZET.....	52
8- KAYNAKLAR.....	53-65

GİRİŞ

Pentoksifilin , periferik damar hastalıklarında ve serebrovasküler dolaşım bozukluklarında mikrovasküler kan akımını ve doku oksijen dağılımını düzenleyen metilksantin derivesi bir ilaçtır (66,72) . Kan akımını artırıcı etki mekanizmasında eritrositlerin deformabilite yeteneğini artırması , kan viskozitesini azaltması, trombosit agregasyonunu inhibe etmesi ve plazma fibrinojen düzeylerini düşürmesi gibi hemoreolojik etkileri rol oynamaktadır (81). Bir fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin'in polimorfonükleer lökositlerde , endotel hücrelerinde ve trombositlerde siklik 3': 5'-adenozin monofosfat (sAMP) , kırmızı kan hücrelerinde siklik 3': 5'-guanozin monofosfat (sGMP) düzeylerini yükselttiği gösterilmiştir (6,21,73) . Antiagregatuar etkilerinde , tromboksan sentezini inhibe etmesinin , damar endotelinde prostasiklin sentezini artırmasının ve membrana bağlı fosfodiesterazı inhibe ederek sAMP düzeylerini yükseltmesinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (53,73,81,84).

Pentoksifilin'in başlıca yararlı etkileri kan hücreleri üzerinden olmasına karşın vazodilatör etkisinin olduğu da bilinmektedir (6,15,34,54,60). Pentoksifilin'in köpek ve domuzlarda normal koşullarda zayıf pulmoner ve sistemik vazodilatasyona neden olduğu, ancak hipoksi sonucu ya da anjiotensin infüzyonuna bağlı sistemik vasküler rezistans ve pulmoner vasküler rezistansda ortaya çıkan artışı güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (31). Uzun süreli ağızdan pentoksifilin uygulaması da akut alveoler hipoksi oluşturulmuş anestezi altındaki köpeklerde , pulmoner vazodilatasyona neden olarak pulmoner hipertansif yanıtı azaltmıştır (12). Sağlıklı gönüllülerde ve aterosklerozlu hastalarda intravenöz (i.v.) pentoksifilin uygulaması damar tonusunda azalmaya , konjonktival kapillerlerde dilatasyona neden olmuştur (9,81). Sağlıklı gönüllüler ve kronik karaciğer hastalığı olanlarda sintigrafik teknikler kullanılarak yapılan çalışmalarda pentoksifilin'in karaciğer perfüzyonunu artırdığı ve çeşitli göz hastalıklarında retinal dolaşımında düzelmeye neden olduğu saptanmıştır (81).

Tavşan aortunda asetilkolin'le indüklenen vazodilatasyona endotel hücrelerinden salıverilen endotel kaynaklı gevşetici faktör'ün (EDRF) aracılık ettiği bilinmektedir (23). Çeşitli memellilerin vasküler preparatlarında adenin nükleotidleri, trombin, substans P, kalsiyum iyonoforu A23187, kalsitonin geniyle ilişkili peptid (CGRP), histamin, noradrenalin, serotonin,

vazoaktif intestinal peptid (VIP), vazopressin, oksitosin, platelet aktive edici faktör (PAF) ve bradikinin gibi birçok maddenin vazodilatör etkilerinin endotelden EDRF salınımı ile ilgili olduğu gösterilmiştir (40,55,56,57,78,79,83). Hipoksi, kan akımı artışı ve elektriksel stimülasyon da EDRF salınımına neden olabilmektedir. Sözü edilen fiziksel ve kimyasal stimuluslar sonucu endotelden EDRF salınımının yanısıra, sıçan ve tavşan aort halkalarında spontan EDRF salınımının varlığı da saptanmıştır (49). EDRF, vasküler düz kasda guanilat siklaz aktivasyonu sonucu guanozin trifosfat'tan (GTP) sGMP oluşumuna yol açarak vazodilatasyon oluşturmaktadır. Fosfodiesteraz inhibitörü bileşiklerin de kısmen endotel hücrelerinden spontan olarak salınımına neden olduğu bildirilmiştir (41,45,50). Damar endotelinde EDRF'nin yanısıra prostasiklin gibi güçlü vazodilatör ve tromboksan A₂ gibi güçlü vazokonstriktör etkili prostanoidler de sentezlenmektedir(30).

Bugüne dek çeşitli damar preparatlarında pentoksifilin'in vazodilatör etki mekanizması hakkında değişik görüşler ileri sürülmüştür. Pentoksifilin'in insan umbilikal arterleri ve sığır koroner arterinde prostasiklin salınımına neden olduğu gösterilmiştir (43,72). Pentoksifilin'in köpek koroner, baziler ve femoral arteri ve safen venindeki vazodilatör etkisinde endotelin rolünün

olmadığı , etkisinin direkt düz kas gevşetici etkiye bağlı olduğu bildirilmiştir. Ancak baziler arter ve safen veninde pentoksifilin'in tromboksan A₂ oluşumunu inhibe ettiğini gösteren kanıtlar elde edilmiştir (34). Tavşan pulmoner arterinde de pentoksifilin'in vazodilatör etkisinde endojen prostanooidlerin ve endotel kaynaklı gevşetici faktör'ün katkısının olmadığı, olasılıkla direkt düz kas gevşetici etkinin vazodilatör etkide rol oynadığı ileri sürülmüştür (15). İzole sıçan aortunda ise pentoksifilin'in vazodilatör etkisinin siklooksijenaz inhibitörü bir ajan olan indometazin inkübasyonundan etkilenmediği, ancak endotelin zedelenmesi ile büyük ölçüde ortadan kalktığı saptanmıştır (6).

Bu çalışmada, damar tonusunun düzenlenmesine spontan EDRF salınımının katkısının olduğu bilinen izole tavşan aortu kullanılarak , pentoksifilin'in vazodilatör etkisinde endotel kaynaklı gevşetici faktör'ün ve fosfodiesteraz inhibitörü etkinliğinin olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır

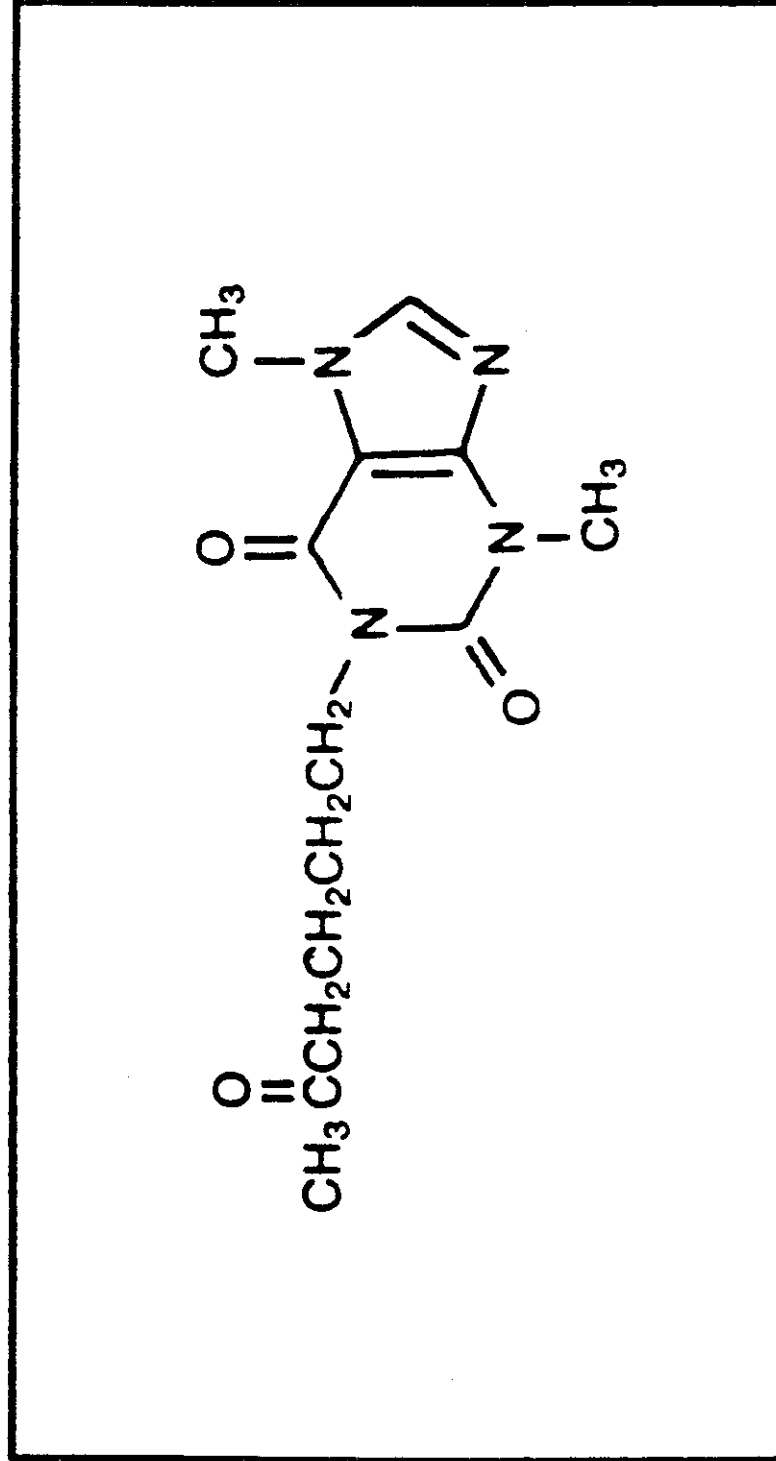
GENEL BİLGİLER

PENTOKSİFİLİN

Pentoksifilin 1964 yılında Mohler ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş 1-hekzil-3,7-dimetilksantin'in suda iyi çözünen bir metabolitidir (54). Deneme kod numarası BL 191 ,kimyasal adı 3,7-dimetil-1-(5-oksohekzil)-ksantin'dir. Kapalı formülü $C_{13}H_{18}N_4O_3$, molekül ağırlığı 278.3 olan pentoksifilin'in erime derecesi $102-105^{\circ}C$ 'dir (şekil 1). Su, metanol, etanol, izopropanol, n-oktanol, metilen klorür ve kloroformda eriyen acı lezzette hemen hemen kokusuz, beyaz billuri bir tozdur (20,54,65,85) Teobromin'in alkilasyonu sonucu iki değişik şekilde sentezlenebilmektedir (54).

Farmakokinetik özellikleri :

Pentoksifilin hızlı absorbe edilir ve büyük oranda metabolize olur. Ağızdan ve intravenöz uygulama sonrası metabolit düzeylerine bakılarak ağızdan uygulama sonrası tamamının absorbe olduğu saptanmıştır.



Şekil I : Pentoksifilin'in kimyasal yapısı .

(81). % 90'dan fazlası böbrek yoluyla, % 6'sı feçesle atılır. Safra ile atılımı % 1-8 arasındadır. Enterohepatik dolaşımının olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda 200 mg intravenöz injeksiyonu takiben 7 dakika sonra kan düzeyinin ortalama 1-2 ng/ml olduğu saptanmıştır (20). Tek doz uygulandıktan sonra pentoksifilin'in böbreklerden 4-6 saat içinde % 80'inin itrah edildiği, pratik olarak 12 saat içinde tamamının atıldığı kabul edilmektedir. İnsanda terapötik dozlar kullanıldığında birikim ortaya çıkmamaktadır (19).

Farmakodinamik etkileri :

Pentoksifilin periferik ve serebral vasküler yataklarda bozulmuş mikrosirkülasyonu düzeltebilen bir metilksantin türevidir. Vazodilatör etkisi tedavi edici dozlarda verildiğinde belirgin değildir. Periferik vazodilatör ilaçların çoğundan farklı olarak kanda reolojik etkiler gösterir. Eritrosit deformabilitesi, kan viskozitesi, trombosit agregasyonu ve plazma fibrinojen konsantrasyonları üzerine yararlı etkileri ile kan akımını artırdığı düşünülmektedir (6,18,59,61,72,81).

Kırmızı kan hücrelerinin intrinsek deformabilitesini membranın viskoelastik özellikleri, intraselüler sıvının viskozitesi ve hücrenin biçimi belirlemektedir. Hücre membranının elastik özellikleri hücre içi adenozin trifosfat (ATP) ve kalsiyum iyonu konsantrasyonlarına bağımlıdır. ATP düzeylerinin azalması ya da kalsiyum birikimi deformabilitede anlamlı

azalmalara yol açmaktadır. Başlıca yapısal membran proteini olan spektrin'in aktin ile etkileşimi için ATP ile fosforilasyonu gereklidir ve sAMP'den bağımsız bir kinaz'a gereksinimi vardır. 2-3,difosfogliserat da spektrin defosforilasyonunu inhibe eder ve indirgenmiş hemoglobine afinitesi ATP'den daha fazladır (59,81).

Normal plazma ozmolaritesindeki değişiklikler ve asidik pH gibi faktörler de eriroisit rijiditesinde artışa neden olurlar.Sağlıklı deneklerden elde edilen kan örneklerinde yapılan in vitro çalışmalarda pentoksifilin'in kırmızı kan hücrelerinin filtrasyon yeteneğini anlamlı oranda artırdığı görülmüştür . Kronik okluzif arter hastalığında, diyabetik arteriyopatide, serebrovasküler ve retinal vasküler hastalıklarda, açık kalp cerrahisi veya vasküler cerrahi sırasında ve sağlıklı deneklerde de kırmızı kan hücresi deformabilitesini artırdığı saptanmıştır (59,60,81).

Pentoksifilin'in etkilerinde eritrositlerde adenin nükleotidi düzeylerini belirgin derecede etkilemesinin rolü olduğu kabul edilmektedir. Aterosklerotik hastalarda ve daha az olmak üzere sağlıklı deneklerde pentoksifilin'in kırmızı kan hücrelerinde in vitro ATP düzeylerinde doza bağımlı artışa neden olduğu gösterilmiştir. Sıçanlara ağızdan pentoksifilin uygulanması eritrositlerde toplam adenin nükleotidi, ATP düzeyi ve ATP/ADP oranında artışa neden olmuştur . İnsanlarda da pentoksifilin uygulamasından sonra benzer bulgular elde edilmiştir (20,59,81). Pentoksifilin'in kırmızı kan

hücrelerinde sGMP düzeylerini artırdığı da bildirilmiştir (21). İnsan ve sıgır trombositlerinde yapılan in vitro çalışmalarda pentoksifilin'in membrana bağı fosfodiesterazı inhibe ettiği ve sAMP düzeylerini yükseltebildiği gösterilmiştir (73,81). Bu değişiklikler sonucu bir proteinkinaz'ın aktive olması ATP ile membran proteinlerinin fosforilasyonunu katalize eder ve sonuçta trombositlerin agregasyon eğilimleri inhibe edilir. İnsan ve maymunlarda kollajen, ADP, serotonin ve adrenalin'le indüklenen ve spontan trombosit agregasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (20,59,72,81). Pentoksifilin'in kırmızı kan hücrelerinde sAMP'ye bağımlı olmayan proteinkinaz'ı inhibe etmesine karşın, sAMP'ye bağımlı fosforilasyon, Ca^{++} - Mg^{++} -ATPaz, kalsiyum'un yer değiştirmesi, sodyum içe akımı, kalsiyum duyarlı potasyum permeabilitesi, klorür değıstokuşu veya glukoz permeabilitesi üzerine etkisiz bulunmuştur (81).

Ağızdan ve parenteral yoldan pentoksifilin uygulanan periferik damar hastalığı bulunan hastalarda fibrinojen yapımının azalması ya da fibrinolitik aktivitenin artması sonucu fibrinojen düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir. Serebrovasküler hastalıklarda da plazma fibrinojen düzeylerini düşürmektedir (18,20,60,72,81).

Ayrıca yüksek kolesterol diyeti ile beslenmiş deney hayvanlarında, periferik damar hastalığı, serebrovasküler hastalık ve yapay kalp kapakçığı takılmış hastalarda trombosit agregasyonunu ve damar duvarına

adhezyonunu belirgin düzeyde azaltmıştır (59,72,81). Pentoksifilin'in prostasiklin sentezini ve salınımını stimüle ettiği ve tromboksan sentezini azalttığı da bildirilmiştir (15,34,39,53,59,72).

Lökositlerin sayısı eritrositlere oranla daha az olmakla birlikte (yaklaşık 1/700 oranında) boyutlarının daha büyük ve yapılarının daha kompleks olması nedeniyle kapiler akım rezistansına anlamlı katkıları vardır. Vasküler staz bozukluklarında lökositlerin rolü kesin olarak gösterilememişse de lösemi ve orak hücreli anemide vasküler stazda rol oynadıkları bilinmektedir. Sağlıklı gönüllülerin kan örneklerinden elde edilen lökosit süspansiyonlarında yapılan çalışmalarda 1 veya 10 mmol/l pentoksifilin'in monosit ve polimorfonükleer lökositlerin filtrasyon yeteneğini artırdığı saptanmıştır (81). Endotoksin şoku oluşturulmuş farelerde pentoksifilin tedavisiyle yaşam süresinin anlamlı oranda arttığı görülmüştür (71). Escherichia Coli injeksiyonu sonucu sepsis oluşturulmuş koyalarda bronkoalveoler lavajda ve çeşitli organlarda albümin birikimini azaltmıştır (32). Tümör nekrozis faktör injekte edilen koyalarda hipotansiyon, akciğer ödemi, akciğerde albümin birikimi, ve lökopeni ile seyreden bir sendrom oluşmaktadır. Birlikte pentoksifilin uygulanması ile akciğer zedelenmesinin büyük ölçüde önlendiği bildirilmiştir (46).

Ağızdan ve intravenöz pentoksifilin uygulamasının iskemik alt ekstremitelerde doku parsiyel oksijen basıncını doza bağımlı şekilde artırdığı

gösterilmiştir. Egzersiz öncesi intravenöz pentoksifilin uygulanan intermitent klodikasyon'lu hastalarda egzersiz sonrası bacak kaslarında parsiyel oksijen basıncının ve yürüme mesafesinin anlamlı oranda arttığı saptanmıştır (76). Serebral vasküler hastalıklı bireylerde korteks ve serebrospinal sıvıda doku parsiyel oksijen basıncını, aterosklerozlu hastalarda arteriyel oksijen basıncını artırdığı bildirilmiştir (81).

Kemiricilerde ve kedilerde yapılan çalışmalarda pentoksifilin'in diğer metilksantinlerden farklı olarak santral sinir sistemi ve otonom sinir sistemi üzerine anlamlı bir etkisi gösterilememiştir. Ancak hayvanlarda deneysel bronkospazmı inhibe ettiği gösterilmiş ve kronik obstrüktif bronşitli hastalarda bronkospazmolitik etkisi saptanmıştır (16,81).

Genel hemodinamik etkileri :

Anestezi altındaki köpeklere intravenöz pentoksifilin uygulaması kan basıncında doza bağımlı bir azalmaya ve hafif taşikardiye neden olmuştur. Normal koşullar altında hafif pulmoner ve sistemik vazodilatasyona neden olduğu ancak vasküler rezistansın ve damar düz kası tonusunun arttığı durumlarda güçlü vazodilatör etki gösterdiği saptanmıştır (12,31). İntraarteriyel uygulaması pozitif kronotropik ve inotropik etkilere neden olmasına karşın bilinci açık köpeklerde intravenöz uygulanması hemodinamik bir etkiye neden olmamıştır. Sol anterior desenden koroner arter oklüzyonu

sonucu akut myokard iskemisi oluşturulmuş kedilerde intravenöz pentoksifilin uygulaması, EKG'de ST segmenti yükselmesini önlemiş ve trombosit sayısını kontrol düzeylerine döndürmüştür (81). Anestezi altındaki köpeklerde iskemi-reperfüzyon sonucu ortaya çıkan koroner arterlerdeki zedelenmeyi azaltmıştır (17).

İskemik kalp hastalığında santral veya periferik hemodinamik üzerine anlamlı yan etkiler göstermeksizin myokardial fonksiyonu düzeltebildiği saptanmıştır. Sağlıklı gönüllülerde ve aterosklerozlu hastalarda 100 mg intravenöz pentoksifilin uygulaması damar tonusunda azalmaya, konjonktival kapillerlerde dilatasyona neden olmuştur. Sintigrafik teknikler kullanılarak yapılan çalışmalarda 200 mg intravenöz pentoksifilin'in sağlıklı gönüllüler ve kronik karaciğer hastalarında karaciğer perfüzyonunu artırdığı ve çeşitli göz hastalıklarında retinal dolaşımında düzelmeye neden olduğu saptanmıştır (81). İzole sıçan böbreğinde kısa süreli sıcak iskemi sonucu ortaya çıkan böbrek zedelenmesinin pentoksifilin infüzyonu ile büyük ölçüde ortadan kalktığı gösterilmiştir (5). Sıçanlarda gliserol ve civa klorür ile oluşan akut böbrek yetmezliğinde de pentoksifilin uygulamasının yararlı etkileri bildirilmiştir (77).

Yan etkileri :

Ağız yolundan pentoksifilin uygun dozda verildiğinde yan etkileri oldukça ender görülür. Bulantı, yüzde kızarma, kan basıncında hafif düşme, baş dönmesi, gastrointestinal bozukluklar, çok ender olarak kollaps

görülebilmektedir. Yeni geçirilmiş myokard infarktüsünde kullanılması sakıncalıdır. Hipertansiyonla seyreden ağır koroner sklerozu ve serebral sklerozu olan olgularda arter ya da ven içine injeksiyonu doğru değildir (20,43,81).

Pentoksifilin'in bütün uygulama şekillerinde uzun süreli tedavilerden sonra bile laboratuvar bulgularında zararlı herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, kanama ve pıhtılaşma zamanları, trombosit fonksiyonları, plazma protein düzeyleri, enzim aktiviteleri ve idrar bulgularında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Karbonhidrat ve yağ metabolizması üzerine zararlı bir etkisi saptanmamıştır. Antikoagulanlarla bir etkileşim göstermediğinden birlikte kullanılabilir (4,19,20,29,80,81).

Endikasyonları ve diğer kullanım alanları :

Aterosklerotik, diyabetik ve iltihabi kaynaklı periferik arteriyel ve arteriyovenöz bozukluklar, distrofik bozukluklar, anjiyoneuropatiler, gözün dolaşım bozuklukları ve serebral dolaşım bozuklukları pentoksifilin'in başlıca kullanım alanlarını oluşturur (81) Pentoksifilin orak hücreli anemide mikrovasküler oklüzyon krizleri kısmen trombosit agregasyonunu inhibe ederek kısmen de orak hücrelerin deformabilitesini artırarak önleyebilmektedir. Polisitemia vera'da kanın viskozitesini önemli derecede azalttığı, eritrositlerin filtrasyon yeteneğini artırdığı gösterilmiştir. Hemoglobin ve hematokritte önemli değişim olmadığı halde ortalama eritrosit hacminin pentoksifilin ile

arttığı ve bu artışın, eritrosit deformabilitesi üzerine yararlı etkiyi sağladığı düşünülmüştür. Polisitemia vera'da trombotik komplikasyonların önlenmesi için pentoksifilin önerilmektedir. Pentoksifilin gibi fosfodiesteraz inhibitörü ajanların trombosit agregasyonunu inhibe ederek, kanser hücrelerinin lokalizasyonunu sağlayarak , metastazların ortaya çıkmasını önleyebileceği ileri sürülmüştür. Kortikosteroid veya heparin tedavisi sonucu ortaya çıkan osteoporozu , olasılıkla osteoblastlarda 3',5'-adenozin monofosfat düzeylerini artırarak önleyebileceği düşünülmektedir (19,20,59,72,81).

Sıçanlarda ve insanlarda yapılan çalışmalarda , pentoksifilin'in cilt fleplerinin kanlanması ve yaşam süresini artırdığı gösterilmiştir (74,81) . Flep ömrünün uzaması olasılıkla ATP içeriğinin artması sonucu eritrosit deformabilitesinin düzelmesine bağlıdır. İstenmeyen nötrofil aktivasyonunu inhibe edebilmesi sonucu pentoksifilin'in septik şok ve erişkinin zorlu solunum sendromu (Adult respiratory distress syndrome) yararlı etkilerinin olabileceği ileri sürülmüştür (1,32,71). Plasmodium falsiparum sıtmasında kırmızı kan hücrelerinin agregasyonu ile oluşan mikrovasküler oklüzyon semptomlarını hafifletebilir. Arteriyografi ve venografi yapılırken kullanılan kontrast maddeler özellikle lipid düzeyleri yüksek diyabetik hastalarda trombosit agregasyonunu artırarak tromboembolizme neden olabildiğinden pentoksifilin gibi trombosit agregasyonunu önleyen ajanların bu hastalarda yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (81).

Pentoksifilin'in son zamanlarda amfoterisin-B adlı antifungal ilacın nefrotoksitesini azalttığı ve immün reaksiyon sırasında interlökin ekspresyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (43,67).

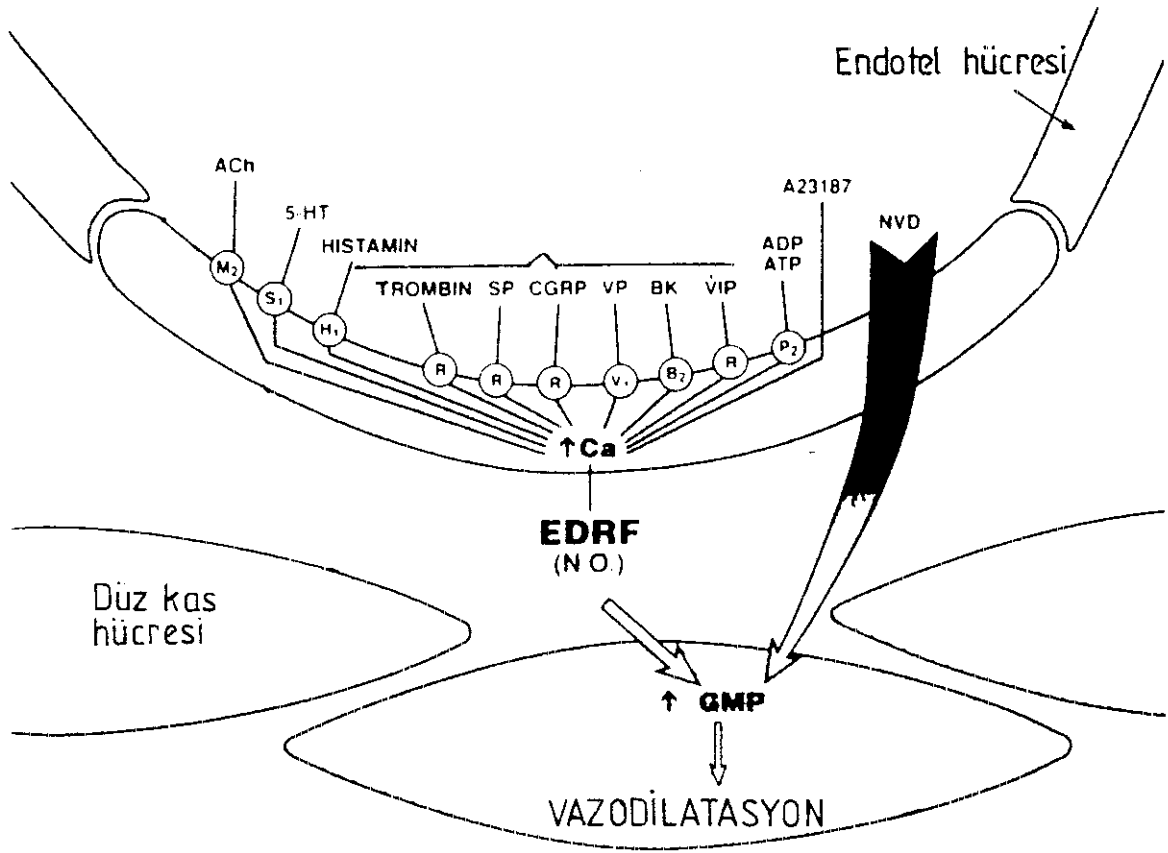
ENDOTEL KAYNAKLI GEVŞETİCİ FAKTÖR

Damar endoteli kan damarlarının tonusu ve permeabilitesi , kanın koagülasyonu , lökositlerin aktivitesi ve trombositlerin reaktivitesinin düzenlenmesinde önemli fonksiyonları olan bir organdır. Damar endoteli , endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ve prostasiklin gibi güçlü vazodilatörlerin salınımında ve katekolaminler , anjiotensin, bradikinin ve prostaglandinler gibi vazoaaktif maddelerin metabolizmasında rol oynayarak damar tonusunun regülasyonuna katkıda bulunur (55).

İlk kez 1980 yılında Furchgott ve Zawadzki tarafından asetilkolin'in tavşan aortundaki vazodilatör etkisinde endotel'in varlığının gerekliliği ve endotel hücrelerinden salınan gevşetici bir maddenin bu etkide rol oynadığı gösterilmiştir (23). Bu durum endotele bağımlı gevşemeye yol açan birçok stimülusun tanımlanmasına , bu mekanizmayı inhibe eden inhibitörlerin bulunmasına ve endotel kaynaklı gevşetici faktör denilen bu ileri derecede labil vazoaaktif maddenin doğası hakkında çeşitli görüşlerin ileri sürülmesine neden olmuştur (55).

Bugüne dek birçok damar preparatında adenin nukleotidleri (adenozin, ADP, ATP), trombin, substans P, kalsiyum iyonoforu A 23187, kalsitonin geniyle ilişkili peptid (CGRP), histamin, noradrenalin, serotonin, vazoaaktif intestinal peptid (VIP), vazopressin, oksitosin, platelet aktive edici faktör (PAF), bradikinin, α -adrenerjik agonistler, klonidin gibi çeşitli endojen maddeler ve ilaçların endotele bağımlı gevşemeye neden oldukları gösterilmiştir (şekil II). Hipoksi, kan akımı artışı ve elektriksel stimülasyon da damarlarda endotele bağımlı gevşemeye neden olmaktadır (13,40,55,56,57,78,79,83).

EDRF damar endotel'inden spontan ya da çeşitli stimuluslara yanıt olarak salıverilen, prostanoid olmayan, labil humoral bir ajandır. Damar düz kasında gevşemeye neden olur, trombosit agregasyonunu ve adhezyonunu inhibe eder. Oksijen ve süperoksit (O_2^-) anyonları ile parçalanmış EDRF'nin etkileri hemoglobin, metilen mavisi ve bazı redoks bileşiklerince inhibe edilmektedir (48,51,55,62). Fenidon, BW755C, ditiyoreitol ve hidrosikinin'un endotel hücrelerinden salınan EDRF'nin etkilerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bileşiklerin inhibitör etkilerinin süperoksit dizmutaz infüzyonu ile ortadan kalkabilmesi EDRF'yi inaktive edici etkilerinde süperoksit oluşumunun rolünü düşündürmüştür. Süperoksit oluşturan bir bileşik olan pirogallol de EDRF etkilerini inhibe etmektedir (55).



Şekil II : Damar endotel'inden EDRF/NO salınımına neden olan çeşitli maddelerin şematik gösterilimi. ACh. asetilkolin , 5HT. serotonin , SP. substans P , CGRP. kalsitonin geniyle ilişkili peptid , VP. vazopressin, BK. bradikinin, VIP. vazoaktif intestinal peptid, ADP. adenzin difosfat, ATP. adenzin trifosfat, NVD. nitrovazodilatörler.

Hemoglobin ve metilen mavisinin EDRF ve bazı nitrovazodilatörlerin oluşturduğu solubl guanilat siklaz stimülasyonunu inhibe ettikleri gösterilmiştir. Hemoglobin'in EDRF'ye henüz düz kas hücrelerine diffüze olmadan önce ekstraselüler boşlukta iken bağlanarak endotele bağımlı gevşemeyi inhibe ettiği düşünülmektedir. Bu düşünce hemoglobin'in bloke edici etkisinin hızlı olmasıyla da uyumludur. İndirgeyici bir bileşik olan metilen mavisinin hücre içine girdiği ve solubl guanilat siklazın oksidasyonuna neden olarak EDRF ve nitrovazodilatörlerle oluşan vazodilatasyonu inhibe ettiği kabul edilmektedir (48).

EDRF'nin doğası hakkında yapılan ilk çalışmalarda bir araşidonik asid lipoksijenaz veya sitokrom p-450 enzim sistemi ürünü olabileceği ileri sürülmüştür (10,14,55,57,64,68). Farmakolojik özelliklerinin benzerliğinden ötürü ilk kez 1986 yılında EDRF'nin nitrik oksid (NO) olabileceği Furchgott tarafından bildirilmiştir. Damar stripleri ve trombositler üzerinde yapılan kapsamlı çalışmalar sonucunda EDRF ve NO'nin biyolojik etkilerinin birbirine çok benzer olduğu görülmüştür (Tablo 1).

EDRF ve NO'nin damar striplerinde etkilerinin benzer bir hızda kaybolduğu ve polipropilen tüplerde de saptanan yarılanma ömürlerinin (sırasıyla 30.9+1.9 sn ve 30.4+2.2 sn) birbirine oldukça yakın olduğu belirlenmiştir. Hem EDRF hem de NO trombosit agregasyonunu ve adhezyonunu inhibe ederler , agrege olmuş trombositlerin disagregasyonunu ise indüklerler.

Tablo 1: EDRF ve Nitrik Oksid'in kimyasal ve farmakolojik özellikleri

	EDRF	NO
Endotel hücrelerinden salınma	+	+
Damar duz kasını gevşetme	+	+
Trombosit agregasyonu inhibisyonu	+	+
Trombosit adhezyonu inhibisyonu	+	+
Yarılanma ömrü :		
Kaskad deneylerinde	3.6 ± 0.1 sn	4.1 ± 0.2 sn
Polipropilen tüplerde	30.9 ± 1.9 sn	30.4 ± 2.2 sn
Reseptör	Sol. guanilat siklaz	Sol.guanilat siklaz
İkinci ulak	sGMP	sGMP
Hemoglobin'le direkt inhibisyon	+	+
Redoks bileşikleriyle indirekt inhibisyon	+	+
Süperoksit dizmutaz, sitokrom c ,		
MB 22948 ile etkinin güçlenmesi	+	+

Trombosit agregasyonu inhibe edici etkilerinde de yarılanma ömürleri benzer bulunmuştur. EDRF ve NO'nun vasküler stripler ve trombositler üzerindeki etkileri süperoksit dizmutaz ve sitokrom c tarafından potansiyalize olur, Fe^{++} ve bazı redoks bileşikleri tarafından ise inhibe olmaktadır. Redoks bileşiklerinin EDRF ve NO ile indüklenen damar gevşemesi üzerine inhibitör etkilerini süperoksit dizmutaz benzer derecede azaltmaktadır. NO'ye güçlü bir şekilde bağlandığı bilinen hemoglobinin EDRF üzerindeki inhibitör etkisi de NO'nun EDRF olduğu hipotezini desteklemektedir. Damar düz kasında ve trombositlerde hem EDRF hem de NO solubl guanilat siklaz stimülasyonu sonucu sGMP düzeylerinde artışa yol açarak etkili olurlar. Bugün endotel kaynaklı gevşetici faktör'ün NO yada NO içeren bir bileşik olduğu kabul edildiğinden çeşitli yayınlarda EDRF, NO veya EDRF/NO şeklinde ifade edilmektedir (36,55,56,57,82).

EDRF/NO sentezi

Prostasiklin arterlerin hem endotel hem de düz kas hücrelerinde yapılabilmesine karşın EDRF/NO yalnızca endotel hücrelerinde sentezlenebilmektedir. 1988 yılında EDRF/NO'nun domuz damar endoteli hücre kültürlerinde L-arginin'in terminal guanidin azot atomlarından sentezlendiği gösterilmiştir. Bu reaksiyon oldukça spesifiktir ve yan ürün olarak L-sitrülin oluşur. Gerek D-arginin gerekse çeşitli L-arginin analoglarının EDRF/NO sentezinde substrat rollerinin olmadığı saptanmıştır (57). Yakın zamanda

L-arginin'den EDRF/NO sentezinde EDRF/NO sentaz enziminin rol oynadığı ve bu enzimin en az iki değişik tipi olduğu gösterilmiştir. Yapısal tip (constitutive type NO synthase) olarak adlandırılan enzim , sitozolik , Ca^{++} /kalmodulin'e bağımlı bir enzimdir ve kısa periyodlarla EDRF/NO salınımına neden olmaktadır. Reseptör stimülasyonu veya fiziksel stimülasyon sonucu bu enzim tarafından sentezlenen EDRF/NO'nin çeşitli fizyolojik yanıtların oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. İndüklenebilir tip (Inducible type NO synthase) olarak adlandırılan diğer enzim sitokinler tarafından makrofajlar, endotel hücreleri ve diğer bazı hücrelerin aktivasyonu sonucu daha uzun süreli EDRF/NO sentezleyebilmektedir. Bu sitozolik, kalsiyuma bağımlı olmayan, tetrahidrobiopterin gibi çeşitli kofaktörlere gereksinim duyan ve indüksiyonu glukokortikoidler tarafından inhibe edilebilen bir enzimdir (10,44,57,58). Bu şekilde sentezlenen EDRF/NO'nin çeşitli mikroorganizmalar ve tümör hücreleri üzerine sitotoksik etkili olduğu, patolojik olaylardaki vazodilatasyon ve doku hasarında rolünün olabileceği düşünülmektedir (35,57).

NG - monometil-L-arginin (L-NMMA), NG -nitro-L-arginin , N-iminometil-L-ornitin , NG -nitro-L-arginine metil ester, NG -amino-L-arginin gibi çeşitli L-arginin analoglarının EDRF/NO sentezini enantiomer spesifik ve doza bağımlı şekilde inhibe ettikleri gösterilmiştir. (37,69,70,75). L-NMMA'nın damar endotel hücrelerinde bu sentezin bir yan ürünü olan L-sitrülin'in sentezini de inhibe ettiği gösterilmiştir (59). L-NMMA gerek EDRF/NO

Tablo 2 : EDRF/NO sentaz enzimleri arasındaki benzerlik ve farklılıklar

Yapısal Tip	İndüklenebilir Tip
Sitozolik	Sitozolik
NADPH'a bağımlı	NADPH'a bağımlı
Dioksijenaz	Dioksijenaz
L-arginin analoglarıyla inhibe olur	L-arginin analoglarıyla inhibe olur
Ca ⁺⁺ /kalmodulin'e bağımlı	Ca ⁺⁺ /kalmodulin'e bağımlı değil
EDRF/NO salınımı pikomol düzeyinde	nanomol düzeyinde
Etki süresi kısa	Etki süresi uzun
Glikokortikoidlerden etkilenmez	İndüksiyonu glikokortikoidlerle inhibe edilir

sentaz'ı gerekse endotel hücrelerinden EDRF/NO salınımını kompetitif olarak inhibe etmektedir. Tavşan ve sıçan aortu ile tavşan koroner damarlarında EDRF/NO etkisini bloke eden ajanların endotele bağımlı konstriksiyona neden olması spontan EDRF/NO salınımının bu dokularda dilatör tonusun sürdürülmesinde rolünün olduğunu göstermiştir (2,49,50). Histamin , asetilkolin, A 23187 ve substans P gibi ajanlarla indüklenen endotele bağımlı gevşemeyi de L-NMMA inhibe etmektedir ve bu etki ortama L- arginin eklenmesi ile geri dönmektedir (57).

Vasküler düz kasda EDRF/NO'ın etki mekanizması :

Intraseelüler kalsiyum düzeylerini artıran çeşitli maddeler ve endojen hormonlar (histamin, A23187 gibi) damar endoteli hücrelerinde EDRF/NO sentaz enzimi aracılığıyla L-arginin'den EDRF/NO sentezlenmesine yol açarlar. Oluşan EDRF/NO damar düz kasına diffüze olarak solubl guanilat siklaz enziminin hem kısmındaki selektif bir bağlanma noktası olan EDRF/NO reseptörünü aktive ederek guanozin trifosfattan sGMP yapımı stimüle eder (38,42). sGMP düzeylerindeki artış sonucu vazodilatasyon oluşmasında aşağıdaki mekanizmaların rol oynayabileceği düşünülmektedir :

1. Hücre içi kalsiyum sekestrasyonunun artması.
2. Kalsiyumun hücre içine girişinin azaltılması.
3. Kalsiyum ekstrüzyon pompasının stimüle olması.
4. Myozin hafif zincir kinaz'ın fosforilasyonunun inhibe olması. (50)

sGMP'nin etkileri fosfodiesterazlar tarafından sonlandırıldığından selektif sGMP fosfodiesteraz inhibitörü ajanlar EDRF/NO'nin etkilerini güçlendirebilirler.

Damar endotelinde EDRF/NO sentez ve salınımı ATP'ye gereksinim duyar ve kalsiyuma bağımlıdır. Ortamdan kalsiyumun çıkarılması asetilkolin yanıtında inhibisyona neden olur, ancak vazodilatör etkileri endotele bağımlı olmayan ajanlar bu durumdan etkilenmemektedir. Endotel hücre membranında depolarizasyon sırasında olasılıkla kalsiyumun hücre içine girişinin azalmasına bağlı olarak kalsiyuma bağımlı eksitasyon-sekresyon kenetlenmesi inhibe olur. Bu durum, yüksek konsantrasyonda K⁺ uygulanmasıyla oluşan depolarizasyona bağlı kontraksiyonlara oranla agonistin neden olduğu kontraksiyonlarda EDRF/NO etkilerinin daha iyi görülebilmesini de açıklamaktadır (83).

Bir α_2 -adrenerjik agonist olan UK14304 ve serotonin'le domuz koroner arterlerinde oluşan endotele bağımlı gevşemenin pertusis toksini ile bloke edildiğinin gösterilmesi, EDRF/NO salınımında G-proteinine bağımlı bir mekanizmanın da rolünün olabileceğini düşündürmektedir (79,83)

Trombositler üzerindeki etkileri :

Damar endotelinde sentezlenen EDRF/NO trombosit agregasyonunu sGMP'ye bağımlı bir mekanizmayla inhibe etmektedir. Prostaglandin'e benzer şekilde sitoprotektif etkisi de vardır. Prostaglandin ve EDRF/NO'nin vasküler

endotelde sinerjistik antitrombotik etkileşimlerinin olduğu düşünülmektedir. EDRF/NO, sGMP aracılı bir mekanizmayla kollajen fibrillerine, endotel hücre matriksine ve endotel hücre tabakalarına trombositlerin adhezyonunu da inhibe etmektedir (55,78,79).

Yakın zamanda trombositlerde de L-arginin'den EDRF/NO sentezlendiği gösterilmiştir. Trombositlerde sentezlenen EDRF/NO'nin trombosit agregasyonunun düzenlenmesinde negatif feedback etkisinin olduğu düşünülmektedir. Trombosit sitozolünde L-arginin'den EDRF/NO oluşumunun kalsiyuma bağımlı olması, NADPH'dan başka kofaktöre gereksinim duymaması ve enzimin L-kanavanin ile inhibe olmaması trombositlerdeki EDRF/NO sentaz'ın endotel hücrelerindeki EDRF/NO sentazla aynı enzim olabileceğini düşündürmektedir (57,69). Agregan ajanlarla trombositlerin stimülasyonu intraselüler kalsiyum konsantrasyonunda yaklaşık 100 katlık bir artışa neden olmaktadır. Olasılıkla kalsiyum düzeyindeki bu artış EDRF/NO sentazı aktive eder ve sGMP düzeyleri yükselir. sGMP düzeyi artışının trombosit agregasyonunu nasıl azalttığı kesin olarak bilinmemesine karşın kalsiyum sekestrasyonunu artırarak agregasyon için gerekli olan kalsiyumu azalttığı ileri sürülmüştür (57).

Makrofajlar ve nötrofiller üzerindeki etkileri :

Sıçanlara Escherichia Coli lipopolisakaridi uygulaması sonucu

idrarda NO_3^- düzeylerinin arttığı saptanmıştır. Bu sonuçlar immünoestimülasyonla artmış NO_3^- sentezi arasında bir ilişkinin varlığını düşündürmektedir. Lipopolisakkaridle indüklenen NO_2^- ve NO_3^- sentezinin en uygun kaynağının makrofajlar olabileceği bildirilmiştir. L-arginin'den NO_2^- ve L-sitrülin sentezleyebilen aktive olmuş makrofajların tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin L-arginin'e bağımlı olduğu gösterilmiştir. L-NMMA ise bu sentezi ve ortaya çıkan sitotoksik etkiyi inhibe edebilmektedir (35,57)

Sıçan peritoneal nötrofillerinde ve insan nötrofillerinde sGMP düzeylerini artırarak damar gevşemesine ve trombosit agregasyonunun inhibisyonuna neden olan EDRF/NO benzeri bir maddenin sentezlendiği ve daha sonra bu maddenin EDRF/NO olduğu doğrulanmıştır. Nötrofillerdeki EDRF/NO oluşumu makrofajlarda olduğu gibi L-kanavanin tarafından inhibe edilmektedir. Yakın zamanda makrofajlarda ve nötrofillerde EDRF/NO sentazın varlığı ve indüklenebilir tipte olduğu gösterilmiştir. L-kanavanin makrofajlarda ve nötrofillerde EDRF/NO sentezini inhibe edebilmesine karşın beyin ve endotel hücrelerde inhibisyon oluşturmamaktadır. Ayrıca makrofajlardaki EDRF/NO sentaz maksimal aktivasyon için Mg^{++} 'a gereksinim duymaktadır(44,57,58).

Nötrofillerde sentezlenen EDRF/NO'nin biyolojik önemi halen aydınlatılamamıştır ve makrofajlardakinden farklı olarak nötrofil kaynaklı

EDRF/NO'in bu hücrelerin sitotoksik aktivitesinde rol oynadığına ilişkin bir kanıt bulunmamaktadır.

Periferik ve Santral Sinir Sisteminde EDRF/NO :

Periferde çeşitli dokulardaki non-adrenerjik non-kolinerjik (NANK) sinirlerde EDRF/NO'in nörotransmitter rolü gösterilmiştir. EDRF/NO'in sıçan ve fare anokoksigeus kaslarında , sıçan mide fundusunda, sığır retraktör penis kasında, tavşan korpus kavernozum'unda, köpek ileokolonik kavşağında , köpek mezenter ve serebral arterinde , kobay trakeası, kobay ileumu longitudinal kasında, sıçan özefagusunda ve insan ileumu ve bronşunda NANK gevşemede rol oynadığını gösteren kanıtlar elde edilmiştir. Bu gevşetici etkide sGMP'nin olası ikinci ulak rolü ve hemoglobinin güçlü antagonistik etkisi gösterilmiştir. Gelecekte daha başka dokuların otonomik NANK sinirlerinde de EDRF/NO'in olası transmitter rolünün ortaya çıkarılabileceği beklenmektedir (3,7,8,11,24,27,28,33,42,47,52,63)

Sıçan serebellum ve önbeyin preparatları ile sığır beyinde EDRF/NO sentazın varlığı gösterilmiştir. Özellikle bulbus olfaktorius ve serebellumda yüksek miktarda bulunan bu enzim hipokampus, striatum, korteks, hipotalamus ve medulla'da da saptanmıştır. Endotel hücrelerindeki benzer şekilde beyin EDRF/NO sentaz'ı da solubldur, aktivasyonu için kalsiyuma ve kofaktör olarak NADPH'a gereksinim duyar, yan ürün olarak sitrüllin oluşumuna neden olur (24,57).

Sıçan serebellum granül hücrelerinde N-metil-D-aspartik-asid (NMDA) reseptör aktivasyonu sonucu EDRF/NO'in sGMP düzeylerini artırması dahil diğer tüm özelliklerini gösteren bir faktörün salındığı saptanmıştır. EDRF/NO sentaz inhibitörlerinin varlığında ise NMDA reseptör aktivasyonu sonucu ortaya çıkan sGMP düzeyi artışının inhibe olduğu gösterilmiştir (25,26,56).

Oldukça reaktif bir madde olan EDRF/NO'in santral sinir sistemi'nde guanilat siklaz stimülasyonu ile ilişkisi olmayan etkileri de vardır. ADP-riboziltransferaz'ı aktive etmesi ya da süperoksit anyonları ile reaksiyona girip peroksinitrit (ONOO-) anyonlarının oluşumuna yol açması bu duruma örnek verilebilir. Bu bileşik serbest hidroksil radikalleri ve azot dioksit gibi oldukça zararlı bileşiklere dönüşebilmektedir. EDRF/NO mitokondrial elektron transport zincirinde , sitrik asit siklüsünde ve DNA sentezinde rol oynayan enzimlerin Fe⁺⁺-sülfür gruplarına bağlanabilmektedir. EDRF/NO'in bu şekilde enzim aktivitesini inhibe ederek makrofajların tümör hücrelerindeki sitotoksik etkilerine aracılık ettiği düşünülmektedir. EDRF/NO'in çeşitli anahtar enzimleri inhibe edebilmesi ve serbest radikal oluşumuna neden olması , aşırı miktarda EDRF/NO'in sinir sistemi için zararlı olabileceğini düşündürmektedir(24). Aşırı NMDA reseptör aktivasyonu sonucu fazla miktarlarda EDRF/NO ve süperoksit iyonu yapımının ve ardısıra Ca⁺⁺ birikiminin serebral iskemi, travma ve kronik epilepsi sonucu ortaya çıkabilen nörodejeneratif durumlara katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (24,57).

Ancak EDRF/NO'in serbest oksijen radikallerinin serebellum hücrelerinde oluşturduğu zedelenmeye karşı koruyucu etkisi de gösterilmiştir (24).

Diğer hücreler ve dokularda EDRF/NO :

Adrenal korteks ve medulla'da da NADPH ve Ca^{++} 'a bağımlı bir EDRF/NO sentaz'ın varlığı gösterilmiştir. Adrenal korteks ve medulla'da oluşan EDRF/NO'in fonksiyonel önemi açıklık kazanamamışsa da , sGMP düzeylerindeki artışın katekolamin salgılanması ve steroidojeneze katkıda bulunması olasıdır. Yakın zamanda sıçan mast hücrelerinde histamin salınımına yol açan EDRF/NO benzeri bir maddenin yapıldığı bildirilmiştir (57).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada her iki cinsten 2000-3000 g. ağırlığında Yeni Zelanda albino tavşanları kullanıldı. Hayvanlarda kulak veninden 30 mg/kg sodyum pentobarbital injeksiyonu ile anestezi oluşturuldu. Göğüs boşluğu açılarak torasik aort dikkatlice çıkarılıp aşağıda bileşimi belirtilen Krebs solüsyonu içine alındı (mM) : NaCl , 118 ; KCl , 4.8 ; CaCl₂ , 2.5 ; MgSO₄ , 1.2 ; KH₂PO₄ , 1.2 ; NaHCO₃ , 24 ; Glukoz , 11 ; disodyum EDTA , 0.03 . Endotel zedelenmesini önlemek için doku gerilmeden aort etrafındaki aşırı yağ ve bağ dokusu nazikçe temizlendi. Bir bistüri ucu yardımıyla önce aort halkaları elde edildi. Daha sonra ortalarından kesilerek açık halka şekline getirildi. Yaklaşık 3-4 mm genişliğinde ve 10-13 mm uzunluğundaki preparatlar her iki ucundan iple bağlanarak bir ucu metal tutucuya , diğer ucu izometrik transduser'e bağlanacak şekilde Krebs solusyonu içeren 20 ml'lik organ banyosuna yerleştirildi. Banyo sıcaklığı 37°C'ye ayarlandı ve preparat % 95 O₂-% 5 CO₂ ile gazlandırıldı. Herbir preparat deneylere başlanmadan

önce 120 dakika boyunca 2 g istirahat gerilimi altında dengelenmeye bırakıldı. Bu süre içinde her 15 dakikada bir banyo sıvısı yenilendi. Preparatların aktivitesi bir izometrik transduser aracılığıyla Harvard Universal Ossilograf'a yazdırıldı. Deneylerde endoteli sağlam ve zedeli aort preparatları kullanıldı. Preparatların bir bölümünde endotel bir pamuk tampon aracılığıyla dokuyu germeden nazikçe zedelendi. Bu preparatlarda asetilkolin (10^{-6} M) ile gevşeme ortaya çıkmaması durumunda endotel'in başarılı bir şekilde zedelendiği kabul edildi. Submaksimal yanıt oluşturan fenilefrin konsantrasyonları ile (genellikle 5×10^{-7} M) kasılan preparatlara kumulatif şekilde eklenen vazodilatör ajanların oluşturduğu gevşeme fenilefrin kasılmasının yüzde inhibisyonu olarak ifade edildi. Antagonist veya pentoksifilin inkübasyonu yapılan deneylerde kontrol konsantrasyon-yanıt eğrileri ve inkübasyon sonrası elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri aynı preparattan elde edildi. Bu deneylerde kontrol yanıtı elde edildikten en az 60 dakika sonra inkübasyon uygulandı. Endoteli sağlam ve zedeli aort preparatlarında pentoksifilin konsantrasyon-yanıt eğrilerinin karşılaştırılması aynı aorttan elde edilen 2 ayrı preparat kullanılarak yapıldı. Pentoksifilin, L-NAME ve metilen mavisi inkübasyonu yapılan deneylerde, bu ilaçlar agonistin konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edilmesinden 30 dakika önce banyo sıvısına uygulandılar. İlaçların vazodilatör etkilerini doğru bir şekilde değerlendirebilmek amacıyla, her bir preparatta kontrole eşdeğer kasılmalar oluşturacak fenilefrin konsantrasyonları kullanıldı.

DeneYlerde kullanılan ilaçlar

DeneYlerde kullanılan asetilkolin klorür , fenilefrin hidroklorür , pentoksifilin , forskolin, L-NAME, metilen mavisi ve sodyum nitroprussid Sigma'dan temin edildi. Fenilefrin ve forskolin dışındaki tüm maddeler distile suda çözüldü ve dilüe edildi. Fenilefrin 1 mM askorbik asid içeren distile suda, forskolin dimetilsulfoksid'de çözüldü. Askorbik asid ve dimetilsulfoksid'in ilaç solusyonlarını hazırlamada kullanılan konsantrasyonlarda düz kas tonusunu etkilemedikleri saptandı. İlaç konsantrasyonları banyo solusyonundaki molar konsantrasyonları olarak ifade edildi.

İstatistiksel analiz

Tüm sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak belirtildi. İki ayrı preparat arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi (unpaired t - test) , aynı preparatta yapılan istatistiksel değerlendirmede iki eř arasındaki farkın anlamlılık testi (paired t - test) kullanıldı .

BULGULAR

Endoteli sağlam ve zedeli aort preparatlarında pentoksifilin yanıtı.

Submaksimal yanıt oluşturan fenilefrin konsantrasyonlarıyla (genellikle $5 \times 10^{-7} M$) kasılan preparatlarda pentoksifilin konsantrasyona bağımlı ($10^{-6} - 10^{-3} M$) gevşemeye neden oldu (şekil III). Maksimum pentoksifilin gevşemeleri fenilefrin kasılmasının endoteli sağlam preparatlarda $\% 67,09 \pm 2,75$ 'i, endoteli zedeli preparatlarda $\% 68,04 \pm 2,01$ 'i idi. Endoteli sağlam ve zedeli preparatlardan elde edilen pentoksifilin konsantrasyon-yanıt eğrileri arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$) (şekil IV).

Endoteli sağlam preparatlarda pentoksifilin yanıtına L-NAME ve metilen mavisi'nin etkileri.

Bir EDRF/NO sentaz inhibitörü L-NAME ($10^{-4} M$) ve guanilat siklaz inhibitörü metilen mavisi ($10^{-5} M$) ile 30 dakika inkübe edilen endoteli sağlam

preparatlarda pentoksifilin konsantrasyon-yanıt eğrilerinin kontrole oranla anlamlı farklılık göstermediği saptandı ($p>0,05$) (şekil V ve VI).

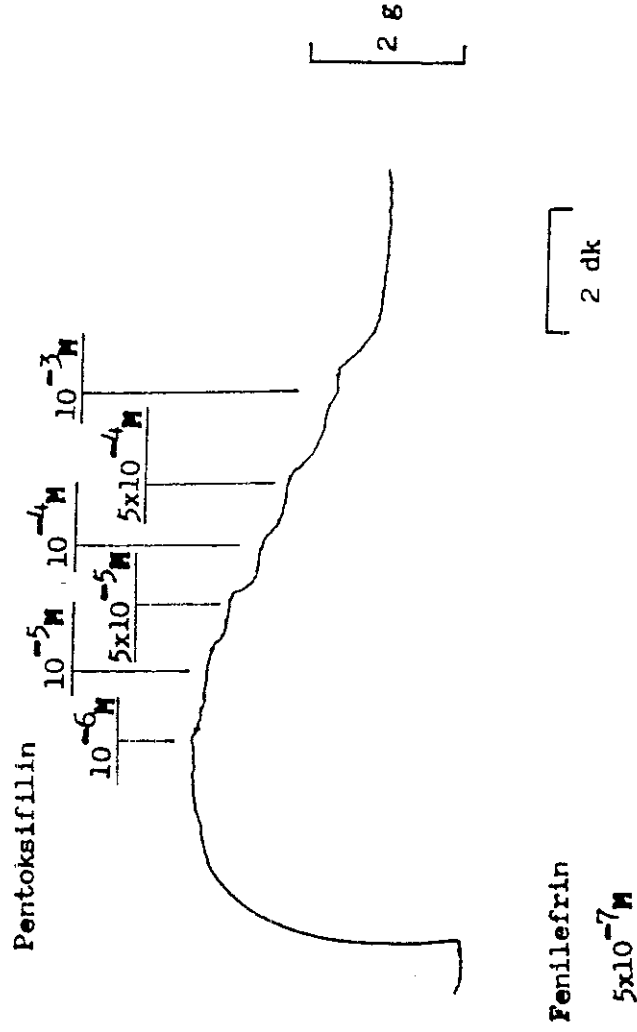
Endoteli sağlam preparatlarda asetilkolin yanıtına pentoksifilin'in etkisi.

Submaksimal kasılma oluşturan fenilefrin konsantrasyonlarıyla kasılan preparatlarda asetilkolin konsantrasyona bağımlı (10^{-8} - 10^{-5} M) gevşemeye neden oldu (şekil VII). Maksimum asetilkolin gevşemeleri fenilefrin kasılmasının $\% 60,30 \pm 2,64$ 'ü idi. 30 dakikalık pentoksifilin (10^{-4} M) inkübasyonunun asetilkolin yanıtına etkisi, kontrol yanıtına eşdeğer kasılma oluşturan fenilefrin konsantrasyonları (7×10^{-7} M - 10^{-6} M) kullanılarak değerlendirildi. 10^{-4} M pentoksifilin inkübasyonunun asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisini kontrole göre istatistiksel yönden anlamlı olarak değiştirmedeği saptandı ($p>0,05$) (şekil VIII).

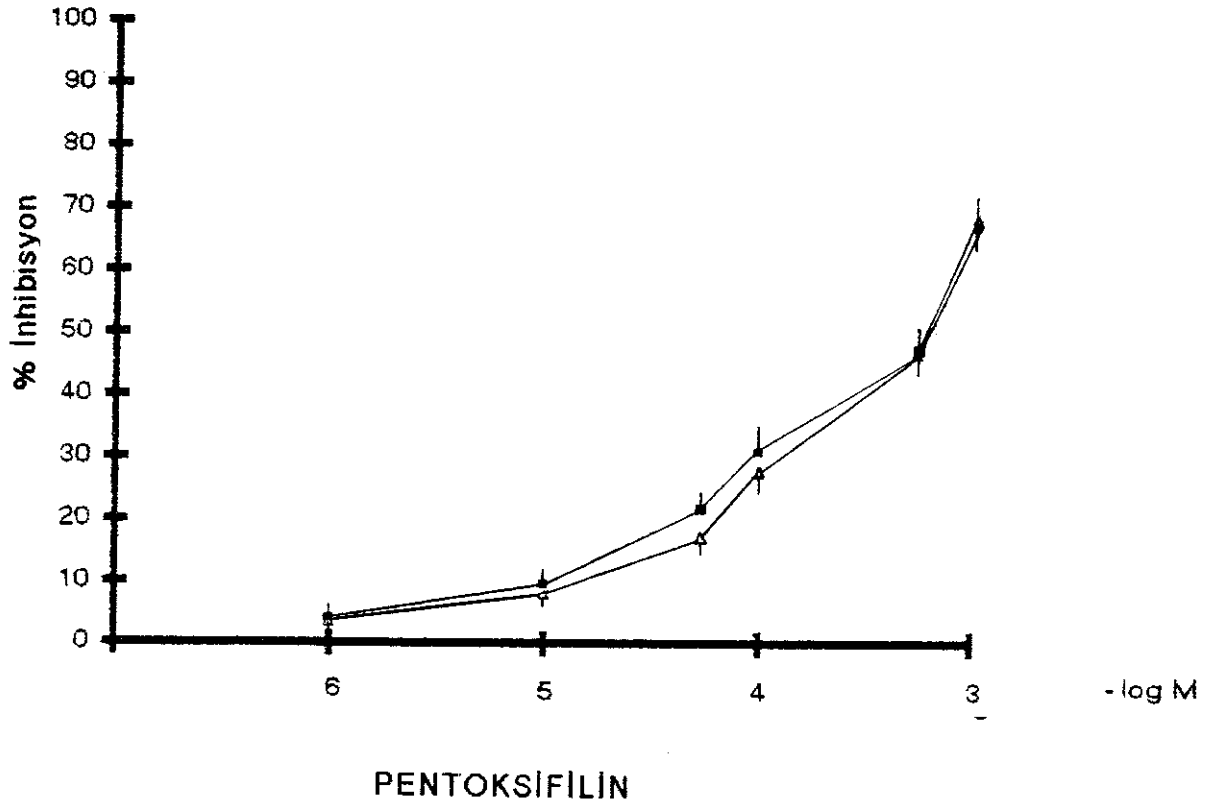
Endoteli sağlam ve zedeli preparatlarda sodyum nitroprussid ve forskolin yanıtlarına pentoksifilin'in etkisi.

Damar düz kasında adenilat siklaz aktivasyonu sonucu sAMP oluşumuna neden olan forskolin (10^{-9} - 10^{-4} M) ve guanilat siklaz aktivasyonu sonucu sGMP oluşumuna neden olan sodyum nitroprussid (10^{-8} - 10^{-4} M), submaksimal yanıt oluşturan fenilefrin konsantrasyonları ile

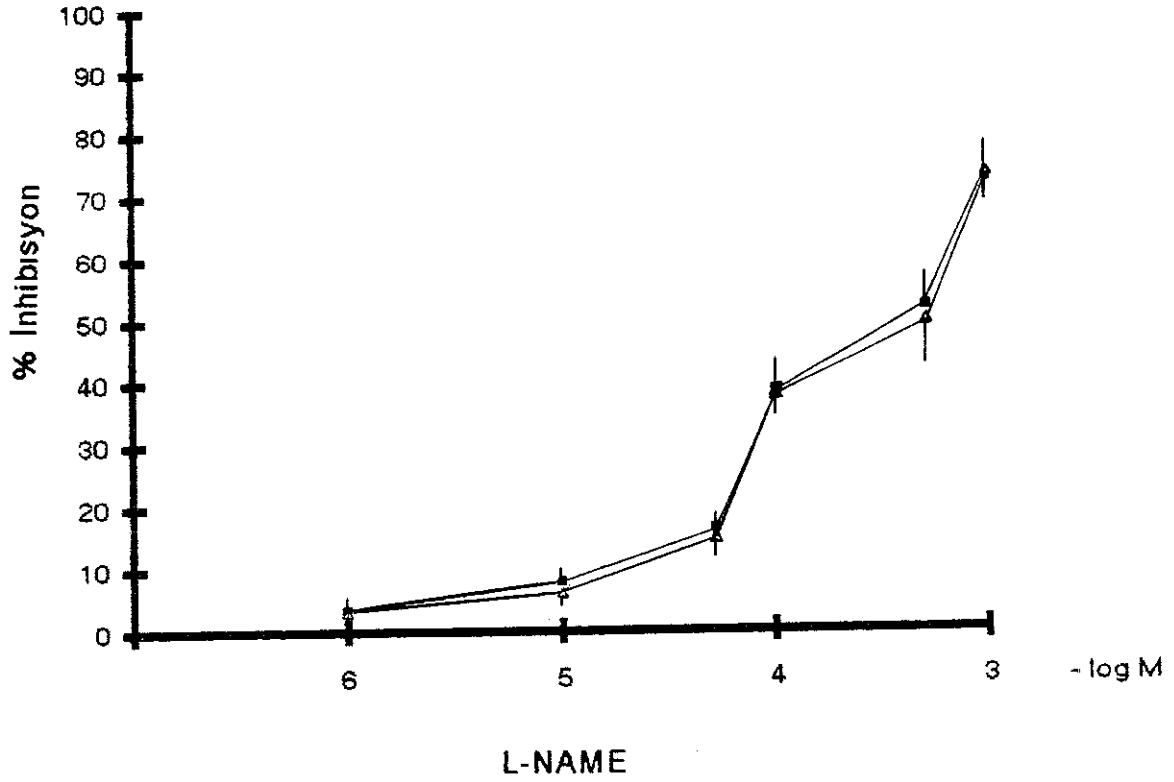
kasılan preparatlarda konsantrasyona bağımlı gevşemeye neden oldular (şekil IX ve X). Maksimum sodyum nitroprussid gevşemeleri endoteli sağlam ve zedeli preparatlarda sırasıyla fenilefrin kasılmasının % $78,09 \pm 3,06$ ve $81,63 \pm 2,37$ 'si idi. Maksimum forskolin gevşemeleri endoteli sağlam ve zedeli preparatlarda sırasıyla fenilefrin kasılmasının % $69,19 \pm 2,29$ ve $70,83 \pm 2,01$ 'i idi. 30 dakikalık pentoksifilin (10^{-4} M) inkübasyonunun sodyum nitroprussid ve forskolin yanıtına etkisi kontrol yanıtına eşdeğer fenilefrin konsantrasyonları (7×10^{-7} M - 10^{-6} M) kullanılarak değerlendirildi. 10^{-4} M pentoksifilin inkübasyonunun endoteli sağlam veya zedeli preparatlarda sodyum nitroprussid ve forskolin konsantrasyon-yanıt eğrilerini kontrole göre istatistiksel yönden anlamlı olarak değiştirmedeği saptandı ($p > 0,05$) (şekil XI ve XII).



Şekil III : Fenilefrin ile kasılmış endotelî sağlam izole tavşan aortu preparatında pentoksifilin'in oluşturduğu konsantrasyona bağımlı gevşemeler

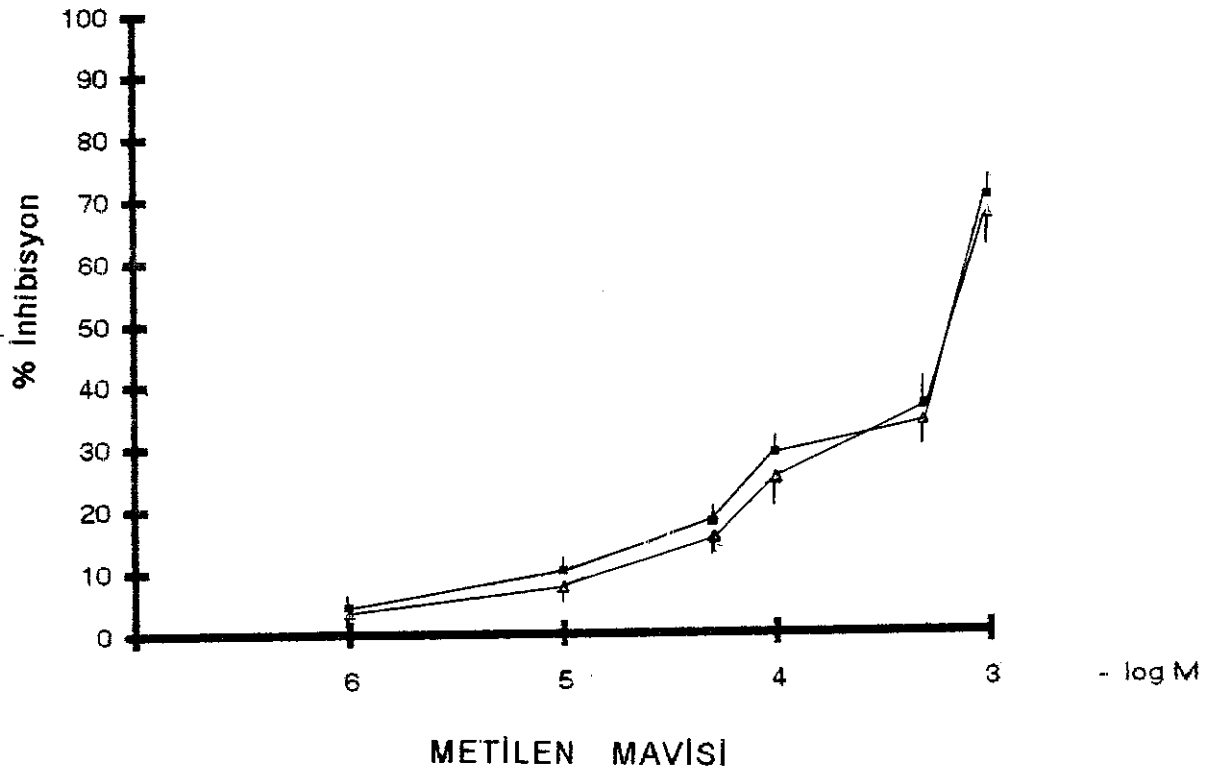


Şekil IV : Submaksimal yanıt oluşturan fenilefrin konsantrasyonları ($5 \cdot 10^{-7}M$) ile kasılan izole tavşan aortu preparatlarında pentoksifilin konsantrasyon-yanıt eğrisi. (n=8) (■ endoteli sağlam , Δ endoteli zedeli)



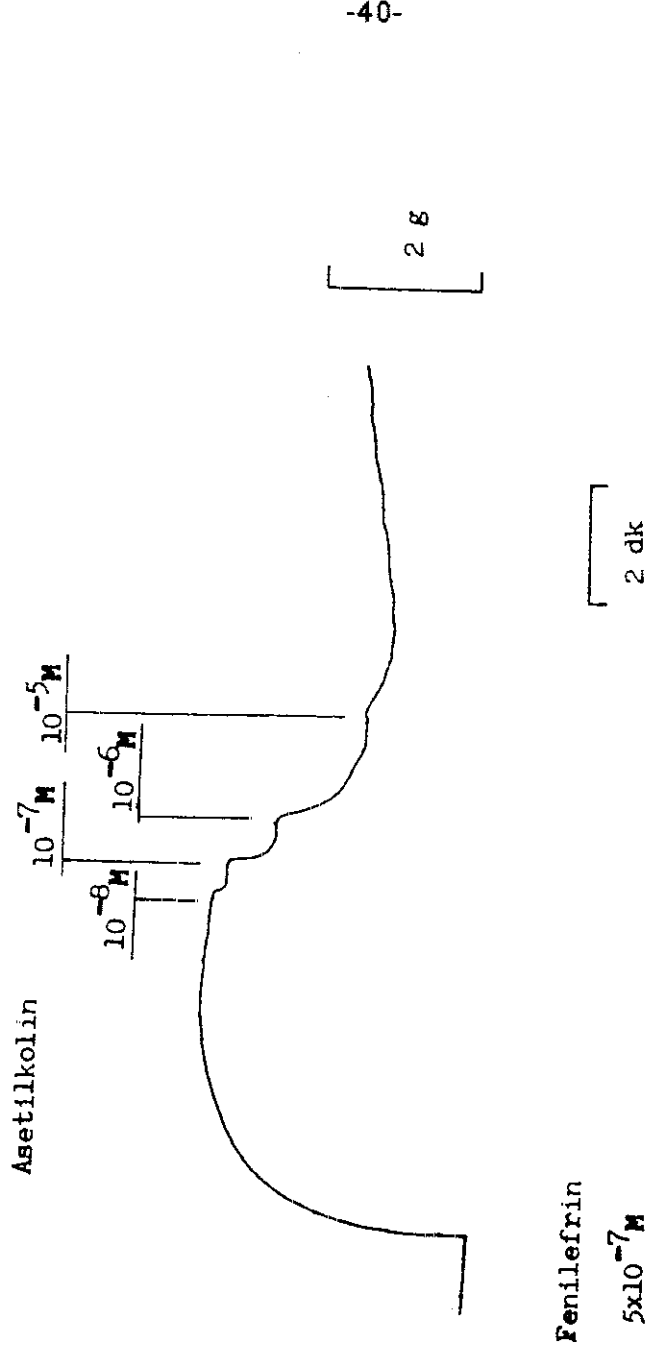
Şekil V : Submaksimal yanıt oluşturan fenilefrin konsantrasyonları ile kasılan endoteli sağlam izole tavşan aortu preparatlarında pentoksifilin konsantrasyon-yanıt eğrisine L-NAME'nin (10^{-4} M) etkisi. (n=8)

(■ kontrol , Δ L-NAME)

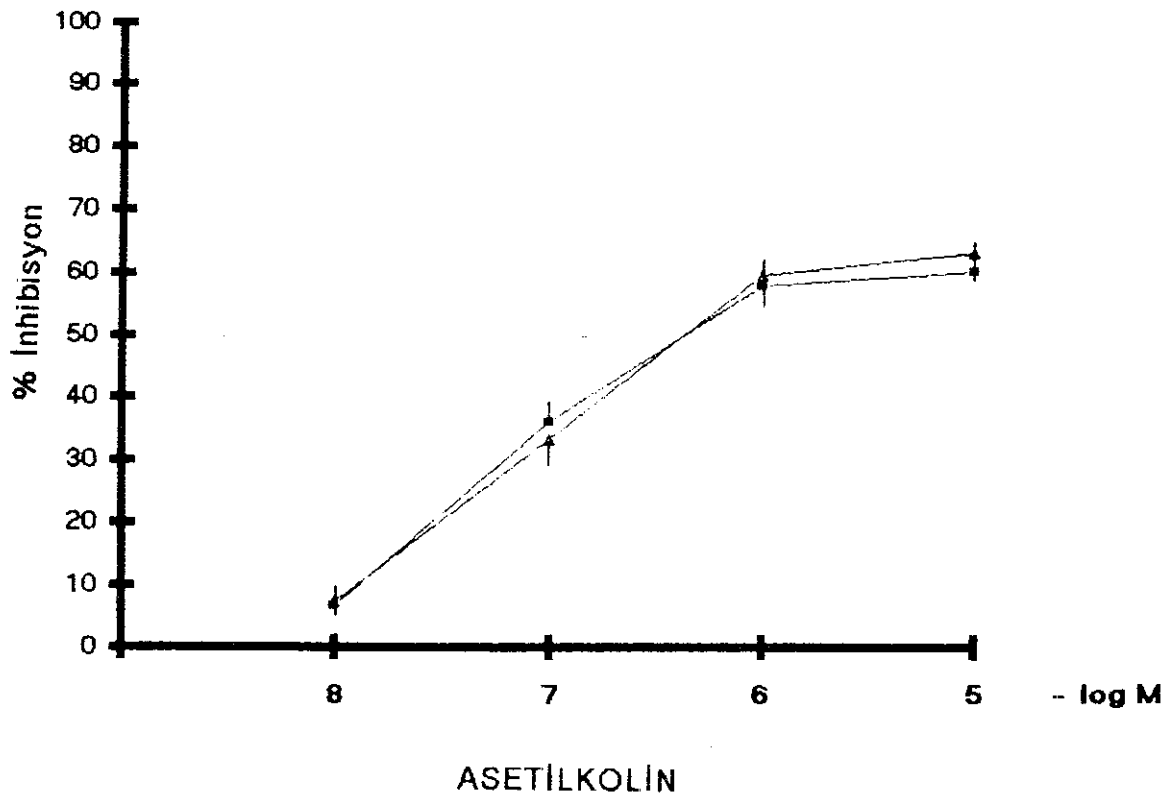


Şekil VI : Submaksimal yanıt oluşturan fenilefrin konsantrasyonları ile kasılan endoteli sağlam izole tavşan aortu preparatlarında pentoksifilin konsantrasyon-yanıt eğrisine metilen mavisi'nin (10^{-5} M) etkisi. (n=8)

(■ kontrol , Δ metilen mavisi)



Şekil VII : Fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam izole tavşan aortu preparatında asetilkolin'in oluşturduğu konsantrasyona bağımlı gevşemeler.



Şekil VIII : Submaksimal yanıt oluşturan fenilefrin konsantrasyonları ile kasılan endoteli sağlam izole tavşan aortu preparatlarında asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisine pentoksifilin'in ($10^{-4}M$) etkisi. (n=8)

(■ kontrol , Δ pentoksifilin)

Forskolin

$10^{-9}M$ $10^{-8}M$ $10^{-7}M$ $10^{-6}M$ $10^{-5}M$ $10^{-4}M$

-42-

2.8

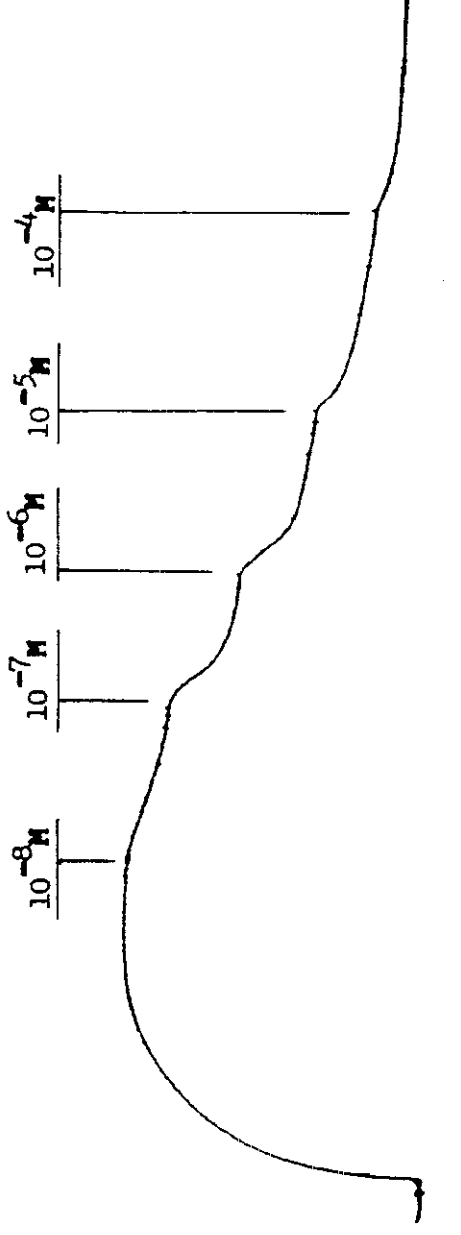
Fenilefrin

$5 \times 10^{-7}M$

2 dk

Şekil IX Fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam izole tavşan aortu preparatında forskolin'in oluşturduğu konsantrasyona bağımlı gevşemeler.

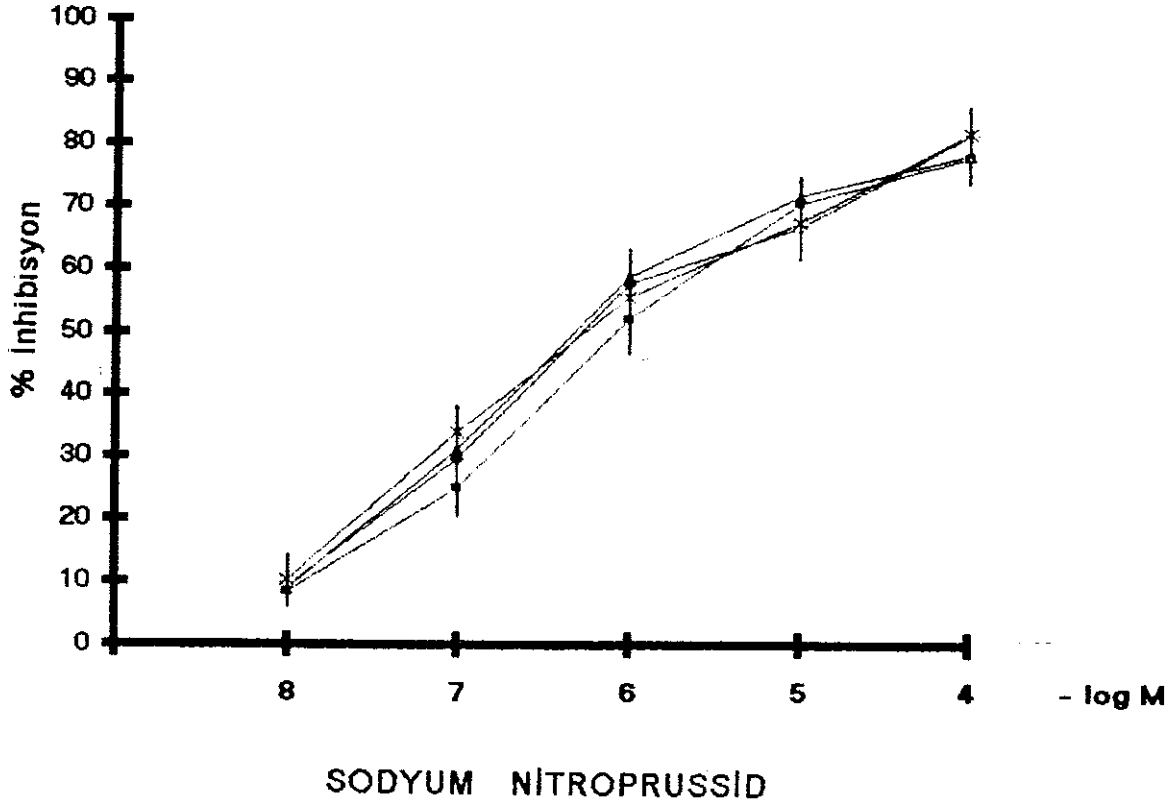
Sodyum nitroprussid



Fenilefrin
 $5 \times 10^{-7} M$

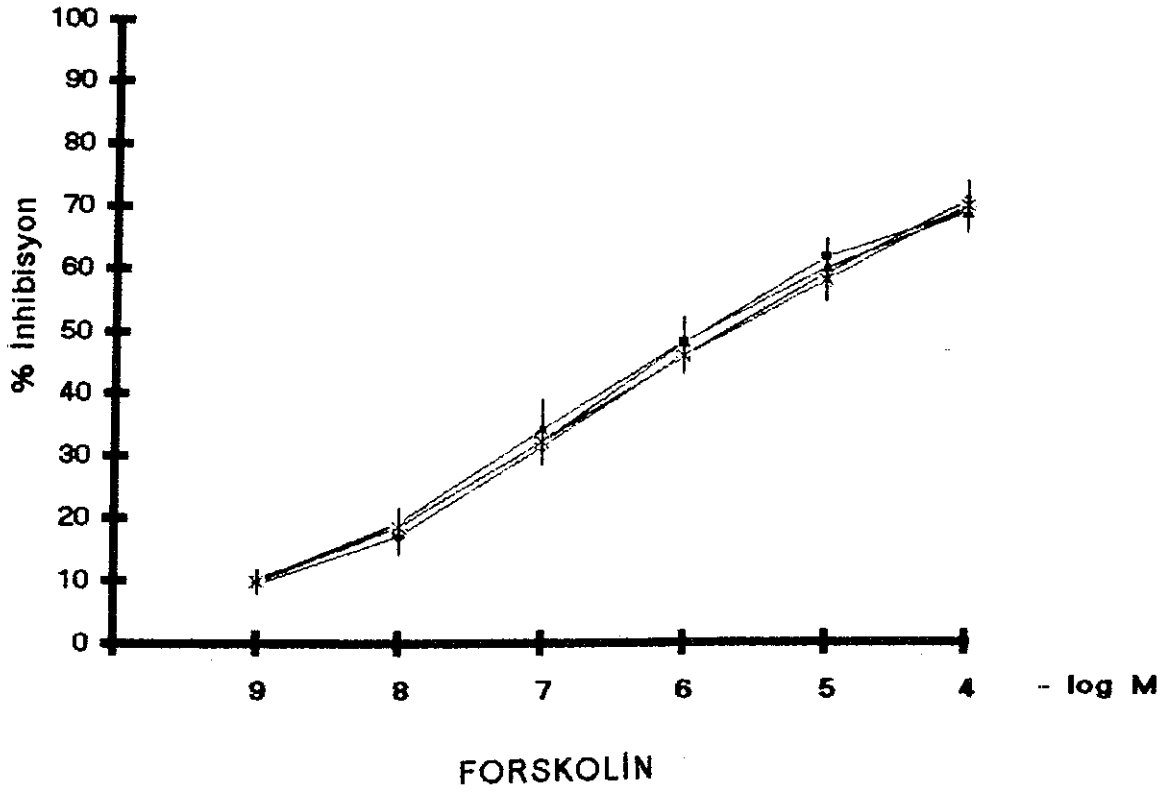
2 dk

Şekil X : Fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam izole tavşan aortu preparatında sodyum nitroprussid'in oluşturduğu konsantrasyona bağlı gevşemeler.



SODYUM NITROPRUSSID

Şekil XI : Submaksimal yanıt oluşturan fenilefrin konsantrasyonları ile kasılmış endotelili sağlam ve zedeli izole tavşan aortu preparatlarında sodyum nitroprussid konsantrasyon-yanıt eğrisine pentoksifilin'in ($10^{-4}M$) etkisi. (n=8) (■ kontrol, endotelili sağlam ; △ pentoksifilin , endotelili sağlam ; ◆ kontrol, endotelili zedeli ; X pentoksifilin ,endotelili zedeli)



Şekil XII : Submaksimal yanıt oluşturan fenilefrin konsantrasyonları ile kasılmış endoteli sağlam ve zedeli izole tavşan aortu preparatlarında forskolin konsantrasyon-yanıt eğrisine pentoksifilin'in ($10^{-4}M$) etkisi. (n=8)
(■ kontrol, endoteli sağlam ; △ pentoksifilin , endoteli sağlam ;
◆ kontrol, endoteli zedeli ; X pentoksifilin , endoteli zedeli)

TARTIŞMA

Pentoksifilin , periferik damar hastalıkları , serebrovasküler hastalıklar ve mikrovasküler dolaşım bozukluğu ile seyreden çeşitli hastalıklarda kullanılan metilksantin derivesi bir ilaçtır (18,81). Klinik etkinliğinde önemli rol oynayan eritrosit deformabilitesini artırması, trombositlerin agregasyon ve adhezyonu ile nötrofil aktivasyonunu ve adhezyonunu inhibe etmesi , plazma fibrinojen düzeylerini düşürmesi, kan viskozitesini azaltması , nötrofillerde süperoksid anyonu yapımını azaltması gibi etkilerinin yanısıra vazodilatör etkisi de gösterilmiştir (1,60,65,71).

Bugüne dek farklı türlerde yapılan çalışmalarda pentoksifilin'in vazodilatör etki mekanizması ile ilgili çeşitli görüşler ileri sürülmüştür. Teorik olarak pentoksifilin'in vazodilatör etki mekanizmasında damar endotelinden prostasiklin ve EDRF/NO gibi vazodilatör ajanların salınımının , tromboksan

A₂ gibi vazokonstriktör ajanların salınımının inhibisyonunun , fosfodiesteraz inhibitörü etkinliğinin ya da direkt düz kas gevşetici etkisinin rol oynaması olası görülmektedir.

Pentoksifilin'in insan umbilikal arterleri ve sığır koroner arterinde damar endotelinden prostasiklin salınımına neden olduğu ve prostasiklin'in vazodilatör etkiye aracılık ettiği bildirilmiştir (43,72) . Ancak köpek koroner ve femoral arterleri, tavşan pulmoner arteri ve venleri ile sıçan aortunda bir siklooksijenaz inhibitörü indometazin'in pentoksifilin'in vazodilatör etkisinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (6,15,34,39). Tüm bunlardan pentoksifilin'in prostanooidler üzerinden olan vazodilatör etkisinin türe ve damar yatağına göre değişebileceği anlaşılmaktadır. Förstermann ve arkadaşları izole tavşan aortunun tonusunun düzenlenmesinde endojen prostanooidlerin rolünün olmadığını ve dışarıdan verilen prostasiklin'in bu damar yatağında vazodilatasyon yerine vazokonstriksiyona neden olduğunu göstermişlerdir (22). Bu nedenle , izole tavşan aortunda pentoksifilin'in vazodilatör etkisine endojen prostanooidlerin katkıda bulunması olası görülmemektedir.

Damar endotelinden salıverilen EDRF/NO'nin çeşitli ajanların vazodilatör etkisine aracılık ettiği bilinmektedir (42,55,57). İzole sıçan aortunda endotel zedelenmesi veya metilen mavisi inkübasyonu sonrası pentoksifilin'in vazodilatör etkisinin büyük ölçüde ortadan kalktığı bildirilmiştir

(6). Ancak köpek koroner , baziler, femoral arterleri ve safen veni ile tavşan pulmoner arterlerinde pentoksifilin'in vazodilatör etkisinin modülasyonunda endotel'in rolünün olmadığı gösterilmiştir (15,34). Biz de çalışmamızda izole tavşan aortunda endoteli sağlam ve zedeli preparatlar arasında pentoksifilin'in vazodilatör etkisinde anlamlı bir değişiklik saptayamadık . EDRF/NO etkilerini bloke eden konsantrasyonlarda guanilat siklaz inhibitörü metilen mavisi (10^{-5} M) ve EDRF/NO sentaz inhibitörü L-NAME (10^{-4} M) ile inkübasyon sonrası da pentoksifilin konsantrasyon yanıt eğrisinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Endotele bağımlı vazodilatasyona yol açan asetilkolin'in (10^{-8} - 10^{-5} M) konsantrasyon yanıt eğrisinde de pentoksifilin (10^{-4} M) inkübasyonu sonucu anlamlı bir değişiklik ortaya çıkmadı. Bu sonuçlar izole tavşan aortunda pentoksifilin'in vazodilatör etkisine köpek koroner, baziler, femoral arterleri, safen veni ve tavşan pulmoner arterinde olduğu gibi EDRF/NO'in aracılık etmediğini ve etki mekanizmasının türe ve damar yatağına bağlı farklılıklar gösterebileceğini düşündürmektedir.

Metilksantinlerin düz kas gevşetici etkilerinde rol oynadığı düşünülen mekanizmalardan birisi de , siklik nükleotid fosfodiesterazların inhibisyonu sonucu sAMP veya sGMP düzeylerinin artmasıdır (66). Pentoksifilin'in trombosit agregasyonunu inhibe edici ve eritrosit deformabilite yeteneğini artırıcı etkilerinde membrana bağlı fosfodiesteraz'ın inhibisyonu sonucu sAMP düzeylerinin artışının rol oynadığı gösterilmiştir (81). In vitro

deneyleerde pentoksifilin'in insan kırmızı kan hücrelerinde sGMP düzeylerini artırdığı da bildirilmiştir (21). İnsan umblikel damarlarında fosfodiesteraz inhibisyonu sonucu sAMP düzeylerini artırmasının vazodilatör etkisine aracılık ettiği ileri sürülmüştür (73). Adenilat siklazın direkt aktivasyonu ile sAMP düzeylerini artırarak vazodilatasyona neden olduğu bilinen forskolin , çalışmamızda kullandığımız izole tavşan aortu preparatlarında konsantrasyona bağımlı (10^{-9} - 10^{-4} M) gevşeme oluşturdu. Gerek endoteli sağlam gerekse endoteli zedeli preparatlarda pentoksifilin (10^{-4} M) inkübasyonunun forskolin konsantrasyon yanıt eğrisinde anlamlı bir değişiklik oluşturmaması izole tavşan aortunda pentoksifilin'in vazodilatör etkisine sAMP'nin aracılık etmediğini düşündürdü.

Damar endotel hücrelerinden kimyasal veya fiziksel stimuluslar sonucu EDRF/NO salınımının yanısıra spontan EDRF/NO salınımının varlığı da gösterilmiştir (2,49). Sıçan aortuna oranla etkisi daha zayıf olmasına karşın , tavşan aortunda damar tonusunun sürdürülmesinde spontan EDRF/NO salınımının katkısının olduğu bilinmektedir (50). Çeşitli çalışmalarda izole sıçan ve tavşan aortunda fosfodiesteraz inhibitörü ajanların vazodilatör etkilerinde kısmen EDRF/NO'in aracılık ettiği gösterilmiştir(41,45,50) . Özellikle M&B 22948 gibi selektif sGMP fosfodiesteraz inhibitörleri olmak üzere papaverin, izobütilmetilksantin gibi fosfodiesteraz inhibitörü ajanların EDRF/NO yapımını etkilemedikleri , ancak spontan salıverilen EDRF/NO'in

etkilerini güçlendirerek vazodilatör etki oluşturdıkları kabul edilmektedir(50). Fosfodiesteraz inhibitörlerinin bu etkiyi EDRF/NO'in solubl guanilat siklaz enzimini stimüle etmesi sonucu oluşan sGMP'nin yıkımını inhibe ederek gösterdikleri ileri sürülmektedir(50). Çalışmamızda endotel hücrelerinden EDRF/NO salınımına yol açarak sGMP düzeylerini artıran asetilkolin (10^{-8} - 10^{-5} M) ve endotelden bağımsız olarak solubl guanilat siklaz aktivasyonu sonucu sGMP düzeylerini artıran sodyum nitroprussid, izole tavşan aortunda konsantrasyona-bağımlı gevşeme oluşturdu. Ancak pentoksifilin inkübasyonu sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisinde anlamlı bir değişiklik ortaya çıkmadı. Damar düz kasında endotelden bağımsız şekilde solubl guanilat siklaz aktivasyonu sonucu sGMP düzeylerini artırarak gevşemeye neden olan sodyum nitroprussid konsantrasyon-yanıt eğrisinin de endoteli sağlam ve zedeli preparatlarda pentoksifilin (10^{-4} M) inkübasyonundan etkilenmediği saptandı. Pentoksifilin inkübasyonunun gerek asetilkolin gerekse sodyum nitroprussid'in vazodilatör etkilerinde değişiklik oluşturmaması , izole tavşan aortunda pentoksifilin'in vazodilatör etkisinde sGMP fosfodiesteraz inhibitörü etkinliğinin rol oynamadığını düşündürdü.

Sonuç olarak bu çalışmada izole tavşan aortunda pentoksifilin'in vazodilatör etkisinin endotel'den ve fosfodiesteraz inhibitörü etkinliğinden bağımsız, direkt düz kas gevşetici etkiye bağlı olabileceği kanısına varıldı.

SONUÇLAR

İzole tavşan aortunda pentoksifilin'in vazodilatör etkisinde endotel kaynaklı gevşetici faktör'ün ve fosfodiesteraz inhibitörü etkinliğinin olası rolünü araştırmak amacıyla yaptığımız bu çalışmada ;

- 1- Pentoksifilin'in fenilefrin ile kasılmış izole tavşan aortu preparatlarında konsantrasyona bağımlı gevşeme oluşturdu.
- 2- Endotel zedelenmesi veya EDRF/NO etkilerini bloke eden *L-NAME* ve metilen mavisi gibi ajanların uygulanması pentoksifilin'in damar gevşetici etkisinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı.
- 3- Önceden pentoksifilin uygulanması, damar düz kasında sAMP düzeylerini artırarak gevşetici etki oluşturan forskolin ve sGMP düzeylerini artırarak gevşetici etki oluşturan asetilkolin ve sodyum nitroprussid gibi ajanların konsantrasyon yanıt eğrisinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı.

Böylece pentoksifilin'in , fenilefrin ile kasılmış izole tavşan aortu preparatlarında konsantrasyona bağımlı gevşemeye neden olduğu , bu etkide endotel kaynaklı gevşetici faktör'ün ve fosfodiesteraz inhibitörü etkinliğinin rolünün olmadığı , olasılıkla direkt düz kas gevşetici etkisine bağlı olabileceği sonucuna varıldı.

ÖZET

İzole tavşan aortunda pentoksifilin'in vazodilatör etkisinde endotel kaynaklı gevşetici faktör ve fosfodiesteraz inhibitörü etkinliğinin olası rolü araştırıldı. Pentoksifilin fenilefrin ile kasılmış preparatlarda konsantrasyona bağımlı (10^{-6} - 10^{-3} M) gevşemeye neden oldu. Pentoksifilin'in konsantrasyon-yanıt eğrisinde endotel zedelenmesi, metilen mavisi (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) inkübasyonu ile anlamlı bir değişiklik ortaya çıkmaması bu ajanın vazodilatör etkisine endotel kaynaklı gevşetici faktör'ün aracılık etmediğini düşündürdü. Direkt adenilat siklaz aktivasyonu sonucu sAMP oluşumuna neden olan forskolin (10^{-9} - 10^{-4} M) ve guanilat siklaz stimülasyonu ile sGMP oluşumuna neden olan sodyum nitroprussid (10^{-8} - 10^{-4} M), fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam ve zedeli preparatlarda konsantrasyona bağımlı gevşemeye neden oldular. Asetilkolin (10^{-8} - 10^{-5} M), endoteli sağlam preparatlarda konsantrasyona bağımlı gevşeme oluşturdu. Pentoksifilin (10^{-4} M) inkübasyonu ile asetilkolin, sodyum nitroprussid ve forskolin konsantrasyon-yanıt eğrilerinde anlamlı bir değişiklik ortaya çıkmaması pentoksifilin'in vazodilatör etkisine fosfodiesteraz inhibitörü etkinliğinin katkıda bulunmadığını düşündürdü.

Bu bulgulardan izole tavşan aortunda pentoksifilin'in vazodilatör etkisinde endotel kaynaklı gevşetici faktör ve fosfodiesteraz inhibitörü etkinliğinin rolünün olmadığı ve vazodilatör etkinin direkt düz kas gevşetici etkisine bağılı olabileceği sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Ambrus J L , Halpern J, Mahafzah M, Sayyid S : Platelet aggregation in septic shock . Effect of pentoxifylline , J Med , 21:121-128, 1990
2. Amezcua J L, Palmer R M J, de Souza B M, Moncada S : Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit . Br J Pharmacol , 97:1119-1124, 1989.
3. Bai T R, Bramley A M : Effect of an inhibitor of nitric oxide synthase on neural relaxation of human bronchi , Am J Physiol , 264: L425-L-430,1993.
4. Baumann J C : New prospects for the conservative management of peripheral arterial disease: clinical investigations with pentoxifylline . Pharmatherapeutica, 3 (suppl 1):30-41, 1983.
5. Berens K L, Luke D R : Pentoxifylline in the isolated perfused rat kidney . Transplantation, 49: 876-879, 1990.

6. Berkenboom G, Fang Z Y, Unger P, Goldman M, Fontaine J : Endothelium-dependent effects of pentoxifylline in rat aorta. *Eur J Pharmacol* , 193: 81-86, 1991.
7. Boeckstaens G E, Pelckmans P A, Bult H, De Man J G, Herman A G, Van Maercke Y M : Evidence for nitric oxide as mediator of non-adrenergic, non-cholinergic relaxations induced by ATP and GABA in the canine gut, *Br J Pharmacol* , 102:434-438,1991.
8. Boeckstaens G E, Pelckmans P A, Bogers J J, Bult H, De Man J G, Oosterbosch L, Herman A G, Van Maercke Y M : Release of nitric oxide upon stimulation of nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *J Pharmacol Exp Therap* , 256:441-447, 1991.
9. Brancato R, Menchini U, Michelone C : Evaluation of the action of pentoxifylline on the conjunctival microcirculation in diabetics . *Pharmatherapeutica*, 3(suppl1): 42-45, 1983
10. Bredt D S , Hwang P M, Glatt C E, Lowenstein C, Reed R R, Snyder S H : Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome p-450 reductase. *Nature*,351:714-718, 1991.
11. Bult H, Boeckstaens G E, Pelckmans P A, Jordaens F H, Van Maercke Y M, Herman A G : Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*, 345: 346-347,1990.

12. Chick T W, Scotto P, Icenogle M W , Sikes C W, Doyle M P, Riedel C E, Wood S C, Loeppky J A : Effects of pentoxifylline on pulmonary hemodynamics during acute hypoxia in anesthetized dogs. *Am Rev Respir Dis* , 137 : 1099-1103 , 1988 .

13. Collier J , Vallance P : Endothelium derived relaxing factor is an endogenous vasodilator in man . *Br J Pharmacol* , 97 : 639-641 , 1989 .

14. Crack P, Cocks T : Thimerosal blocks stimulated but not basal release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) in dog isolated coronary artery. *Br J Pharmacol*, 107 : 566-572 , 1992 .

15. Crowell R E, Chick T W, Reed W P : Pentoxifylline relaxes isolated pulmonary arteries after precontraction with norepinephrine. *Respiration* ,57 : 45-50 , 1990 .

16. Czuczwar S J, Kleinrok Z : Modulation of the protective efficacy of common antiepileptic drugs by xanthine derivatives : Implications for the clinical use of xanthines in epileptic patients . *Pharmacol Res* , 22 : 661-665 ,1990 .

17. Dauber I M, Lesnefsky E J, Ashmore R C, Douglas M M, Sheridan F M, Weil J V, Horwitz L D : Coronary vascular injury due to ischemia-reperfusion is reduced by pentoxifylline. *J Pharmacol Exp Therap* , 260 :1250-1256, 1992.

18. Di Perri T , Carandente O, Vittoria A, Guerrini M , Messa G L :
Studies of the clinical pharmacology and therapeutic efficacy of pentoxifylline
in peripheral obstructive arterial disease . *Angiology* ,35 : 427-435 ,1984 .

19. Duffy M A (ed.): *Trental^R (pentoxifylline)*, Physicians' Desk
Reference, 46th edition, Medical Economics Data, pp. 1099-1100, 1992.

20. Dündar S : Bir ilaç değerlendirmesi : Pentoksifilin (Trental ^R) ve
klinik kullanımı. *İlaç ve Tedavi Dergisi*, 5:245-254, 1992.

21. Fjodorov N A , Jermiltschenko G V , Vinnizkij L I, Malychina L S,
Krasjukova L I, Sedova G T, Jegorov L V : Clinical and experimental
investigations into the role of 3'-5' cyclic guanosine monophosphate (cGMP)
in the mechanism of action of pentoxifylline. *Pharmatherapeutica* , 2 (suppl
1): 17-20 , 1978.

22. Förstermann U, Burgwitz K, Frölich J C : Effects of nonsteroidal
phospholipase inhibitors and glucocorticoids on endothelium-dependent
relaxations of rabbit aorta induced by different agents . *J Cardiovasc
Pharmacol* , 10 : 356-364 , 1987

23. Furchgott R F, Zawadzki J V : The obligatory role of endothelial
cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*,
288:373-376.1980.

24. Garthwaite J : Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the
nervous system. *TINS*, 14 : 60-67 , 1991.

25. Garthwaite J, Southam E, Anderton M : A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. *J Neurochem* , 53 : 1952-1954, 1989.
26. Garthwaite J, Charles S L, Chess-Williams R : Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* , 336 : 385-388, 1988 .
27. Gillespie J S, Liu X, Martin W : The effects of L-arginine and N^G-monomethyl L-arginine on the response of the rat anococcygeus muscle to NANC nerve stimulation. *Br J Pharmacol*, 98: 1080-1082, 1989.
28. Gillespie J S, Sheng H : The effects of pyrogallol and hydroquinone on the response to NANC nerve stimulation in the rat anococcygeus and the bovine retractor penis muscles. *Br J Pharmacol* , 99:194-196,1990.
29. Gisela F H : Assesment of the therapeutic efficacy of pentoxifylline : a double blind trial in geriatric patients with vascular disorders. *Pharmatherapeutica* , 3 : 46-51 , 1983.
30. Gryglewski R J , Botting R M, Vane J R : Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* , 12 : 530 - 548 , 1988 .
31. Hakim T S , Petrella J : Attenuation of pulmonary and systemic vasoconstriction with pentoxifylline and aminophylline. *Can J Physiol Pharmacol* 66: 396-401 , 1988 .

32. Harada H , Ishizaka A , Yonemaru M , Mallick A A , Hatherill J R , Zheng H , Lilly C M , O'hanley P T , Raffin T A : The effects of aminophylline and pentoxifylline on multiple organ damage after Escherichia Coli sepsis . Am Rev Respir Dis , 140 : 974-980 , 1989 .

33. Hobbs A J, Gibson A : L-NG-nitro-arginine and its methyl ester are potent inhibitors of non-adrenergic, non-cholinergic transmission in the rat anococcygeus. Br J Pharmacol, 100:749-752,1990.

34. Hoeffner U, Aarhus L L , Katusic Z S , Vanhoutte P M : Pharmacology of pentoxifylline in isolated canine arteries and veins . J Cardiovasc Pharmacol , 14 : 899-907 , 1989 .

35. Hutcheson I R , Whittle B J R, Boughton-Smith N K : Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in rat . Br J Pharmacol , 101 : 815-820 , 1990 .

36. Ignarro L J , Buga G M, Byrns R E, Wood K S, Chaudhuri G : Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle . J Pharmacol Exp Therap , 246 : 218-225 , 1988 .

37. Ishii K, Chang B, Kerwin J F, Huang Z J, Murad F : N^ω-Nitro-L-arginine : a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation . Eur J Pharmacol , 176 : 219-223 , 1990 .

38. Johns R A : EDRF/ Nitric oxide . Anesthesiology , 75 : 927-931 , 1991 .

39. Kaapa P, Raj J U, Ibe B O, Anderson J : Effect of pentoxifylline in rabbit pulmonary circulation : influence of age and vasomotor tone . Am J Physiol., 261 : H975-H981 , 1991.

40. Kamata K, Mori T, Shigenobu K, Kasuya Y : Endothelium-dependent vasodilator effects of platelet activating factor on rat resistance vessels . Br J Pharmacol , 98 : 1360-1364, 1989.

41. Kauffman R F, Schenck K W, Utterback B G, Crowe V G, Cohen M L : In vitro vascular relaxation by new inotropic agents : relationship to phosphodiesterase inhibition and cyclic nucleotides . J Pharmacol Exp Therap. , 242 : 864-871 , 1987.

42. Kayaalp S O : Endotel-kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) . Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji . Dördüncü baskı , Feryal Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti. , Cilt 3 : 2818-2820, 1989 .

43. Kayaalp S O : Periferik vazodilatörler . Rasyonel Tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji . Altıncı baskı , Feryal Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti. , Cilt 2 : 1176 , 1992 .

44. Knowles R G, Palacios M, Palmer R M J, Moncada S : Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system : A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proc Natl Acad Sci , 86: 5159-5162 , 1989.

45. Komasa N, Lugnier C, Stoclet J C : Endothelium-dependent and independent relaxation of rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors . *Br J Pharmacol* , 104 : 495-503 , 1991.

46. Lilly C M, Sandhu J S, Ishizaka A, Harada H, Yonemaru M, Larrick J W, Shi T X, O'hanley P T, Raffin T A : Pentoxifylline prevents tumor necrosis factor-induced lung injury . *Am Rev Respir Dis* 139 : 1361-1368 , 1989 .

47. Maggi C A , Barbanti G , Turini D , Giuliani S : Effect of N^G-monomethyl L-arginine (L-NMMA) and N^G-nitro L-arginine (L-NOARG) on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the circular muscle of the human ileum. *Br J Pharmacol* , 103: 1970-1972, 1991.

48. Martin W , Villani G M, Jothianandan D, Furchgott R F : Selective blockade of endothelium dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta . *J Pharmacol Exp Therap* , 232 : 708-716, 1985 .

49. Martin W , Furchgott R F, Villani G M, Jothianandan D : Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor . *J Pharmacol Exp Therap* , 237 : 529-538 , 1986 .

50. Martin W , Furchgott R F, Villani G M, Jothianandan D : Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat

and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Therap* , 237 :539-547 , 1986 .

51. Martin W , Drazan K M, Newby A C : Methylen blue but not changes in cyclic GMP inhibits resting and bradykinin-stimulated production of prostacyclin by pig aortic endothelial cells . *Br J Pharmacol* , 97 : 51-56 , 1989 .

52. Martin W , Gillespie J S : The involvement of nitric oxide in NANC transmission . *Novel Peripheral Neurotransmitters* , Pergamon Press , Ed. Bell C , p.74 1991 .

53. Matzky R, Darius H, Schrör K : The release of prostacyclin by pentoxifylline from human vascular tissue . *Arzneim Forsch / Drug Res* , 32 : 1315-1318 ,1982.

54. Mohler W , Söder A : Zur chemie und synthese von 3,7-dimethyl-1-(5-oxo-hexyl)-xanthin . *Arzneim Forsch (Drug Res)* 21 : 1159-1160 , 1971.

55. Moncada S , Radomski M W, Palmer R M J : Endothelium-derived relaxing factor : Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function . *Biochem Pharmacol* , 37 : 2495-2501 , 1988 .

56. Moncada S , Palmer R M J , Higgs E A : Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine : A pathway for the regulation of cell function and communication . *Biochem Pharmacol* , 38 : 1709-1715 , 1989 .

57. Moncada S , Palmer R M J , Higgs E A : Nitric oxide : Physiology , Pathophysiology , and Pharmacology . *Pharmacol Rev* , 43 : 109-142 , 1991

58. Moritoki H , Takeuchi S , Hisayama T, Kondoh W : Nitric oxide synthase responsible for L-arginine-induced relaxation of rat aortic rings in vitro may be an inducible type . *Br J Pharmacol* , 107 : 361-366 , 1992.

59. Muller R : Modification of disturbed flow properties of blood : a promising avenue in the treatment of peripheral vascular diseases. *Pharmatherapeutica*, 3(suppl 1) :5-17, 1983

60 Muller R : On the therapy of disturbances of blood fluidity . *Angiology* , 36 : 226-234 , 1985 .

61. Nicholson C D : Pharmacology of nootropics and metabolically active compounds in relation to their use in demantia . *Psychopharmacology* , 101 : 147-159 , 1990.

62. Nishiye E , Nakao K , Itoh T, Kuriyama H : Factors inducing endothelium-dependent relaxation in the guinea-pig basilar artery as estimated from the actions of haemoglobin . *Br J Pharmacol* , 96 : 645-655 , 1989 .

63. Osthaus L E, Galligan J J : Antagonists of nitric oxide synthesis inhibit nerve-mediated relaxations of longitudinal muscle in guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Therap* , 260:140-145, 1992.

64. Pinto A , Abraham N G , Mullane K M : Cytochrome P-450-

dependent monooxygenase activity and endothelial-dependent relaxations induced by arachidonic acid . *J Pharmacol Exp Therap* , 236 : 445-451 , 1986

65. Pependiker K , Boksay I , Bollmann V : Zur pharmakologie des neuen peripheren gefassdilatators 3,7-dimethyl-1-(5-oxo-hexyl)-xanthin . *Arzneim Fosch (Drug Res)* 21 : 1160-1171 , 1971.

66. Rall T W : Drugs used in the treatment of asthma , The methylxanthines , cromolyn sodium and other agents . *The Pharmacological Basis of Therapeutics* . Eighth edition . Pergamon Press , Ed Gilman A G , Rall T W , Nies A S , Taylor P , p : 618-637 , 1990 .

67. Rao K M K , Currie M S , McCachren S S , Cohen H J : Pentoxifylline and other methyl xanthines inhibit interleukin-2 receptor expression in human lymphocytes. *Cell Immunol* , 135 : 314-325 , 1991 .

68. Rees D D , Palmer R M J , Moncada S : Effect of SKF 525A on the release of nitric oxide and prostacyclin from endothelial cells . *Eur J Pharmacol* , 150 : 149-154, 1988 .

69. Rees D D , Palmer R M J , Hodson H F , Moncada S : A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation . *Br J Pharmacol* , 96 : 418-424 , 1989 .

70. Rees D D , Palmer R S , Hodson H F , Moncada S : Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo . *Br J Pharmacol* , 101 : 746-752 , 1990 .

71. Schönharting M M , Schade U F : The effect of pentoxifylline in septic shock - New pharmacologic aspects of an established drug . J Med , 20 :97-105 , 1989 .

72. Schröer R H : Antithrombotic potential of pentoxifylline : A hemorheologically active drug . Angiology , 36 : 387-398 , 1985 .

73. Stefanovich V : Concerning specificity of the influence of pentoxifylline on various cyclic AMP phosphodiesterases . Res Comm Chem Path Pharmacol , 8 : 673-680 , 1974 .

74. Takayanagi S , Ogawa Y : Effects of pentoxifylline on flap survival . Plast Reconstr Surg , 65 : 763-767 , 1980 .

75. Toda N , Minami Y , Okamura T : Inhibitory effects of L-NG-Nitro-arginine on the synthesis of EDRF and the cerebroarterial response to vasodilator nerve stimulation . Life Sciences , 47 : 345-351 , 1990 .

76. Tonak J , Knecht H , Groitl H : Treatment of circulatory disturbances with pentoxifylline : a double blind study with 'Trental' . Pharmatherapeutica , 3 (suppl 1): 126-135 , 1983 .

77. Vadiel K , Brunner L J , Luke D R : Effects of pentoxifylline in experimental acute renal failure . Kidney Int , 36 : 466-470 , 1989 .

78. Vanhoutte P M : Endothelium and control of vascular function . Hypertension , 13 : 658 - 667 , 1989 .

79. Vanhoutte P M , Shimokawa H : Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm . Circulation , 80 : 1-9 , 1989 .

80. Völker D : Treatment of arteriopathies with pentoxifylline. Results of a double-blind study . Pharmatherapeutica , 8 (suppl 1):136-142 , 1983 .

81. Ward A , Clissold S P : Pentoxifylline : A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties , and its therapeutic efficacy . Drugs , 34 : 50-97 , 1987 .

82. Warner T D , de Nucci G , Vane J R : Comparison of the survival of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide within the isolated perfused mesenteric arterial bed of the rat . Br J Pharmacol , 97 : 777-782 , 1989 .

83. Weiss G B , Winqvist R J- , Silver P J : Vascular smooth muscle and vasodilators . Cardiovascular Pharmacology . Third edition , Raven Press , Ed. Antonaccio M , p: 75-105 , 1990 .

84. Weithmann K U : The influence of pentoxifylline on interaction between blood vessel wall and platelets . IRCS Med Sci , 8 : 293-294 , 1980 .

85. Windholz M , Budavari S, Blumetti R F, Otterbein E S : Pentoxifylline . The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Tenth edition, Merck & Co. Inc., pp:1025, 1983.