

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**FARKLI DAMAR YATAKLARINDA VE SEGMENTLERİNDE
KARBONMONOKSİDİN VASKÜLER TONUSUNA KATKISI:
TANIMLAYICI BİR ÇALIŞMA**

Günnur KOÇER

Doktora Tezi

Antalya, 2012

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**FARKLI DAMAR YATAKLARINDA VE SEGMENTLERİNDE
KARBONMONOKSİDİN VASKÜLER TONUSUNA KATKISI:
TANIMLAYICI BİR ÇALIŞMA**

Günnur KOÇER

Doktora Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2009.03.0122.011)

‘Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir’

Antalya, 2012

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Fizyoloji programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir 16/07/2012.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ümit Kemal řENT¼RK
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

¼ye: Prof. Dr. Aysel AçAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

¼ye: Prof. Dr. Sadi ÖZDEM
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

¼ye: Prof. Dr. Z. Melek Bor K¼Ç¼KATAY
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

¼ye: Prof. Dr. Filiz G¼ND¼Z
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri üyeleri tarafından uygun gör¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../2012 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜST¼NEL

Enstit¼ M¼d¼r¼

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıda sunulmuştur. (EK 1)

1. Kocer G, Kuru O, Gündüz F, Bayram Z, Ozdem S, Aksoy D and Şentürk UK. The Effect of Exercise Training on the Responsiveness of Renal Resistance Arteries in Rats. Renal Failure, 33(6): 587–592, 2011.

ÖZET

CO, endotelden ve düz kasta salınarak, vasküler tonusun düzenlenmesinden sorumlu önemli bir mediyatör olarak kabul edilmektedir. CO'in, HO-1 ve HO-2 enzimleriyle endojen olarak pek çok damar dokusunda üretildiği bilinse de hangi damar yatağında ne oranda katkısı olduğu ortaya konmamıştır. Tanımlayıcı bir araştırma olarak planlanan bu çalışmanın amacı, CO'in farklı büyüklükteki damar segmentlerinde ve farklı organların damar yataklarında vasküler tonusa katkısını ve CO'in bu damarlarda hangi mekanizma aracılığıyla vazodilatasyona neden olduğunu ortaya koymaktır. Bu amaçlar doğrultusunda çalışmamızda 300-350g ağırlığında 6-8 aylık Wistar Albino sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanlarının izole edilen damarları klasik organ banyosu veya telli miyograf düzeneğinde çalışıldı. Çalışılan damar segmentleri olan mezenter (ana mezenter arteri,1-2-3.dalları), renal (renal arter,1-2-3.dalları), gastrokinemius kası (gastrokinemius iletim arteri,1-2. dalları), grasilis kası (femoral arter, musküler dal, grasilis arteri), kalp (koroner, LAD), akciğer (ana pulmoner arter, pulmoner arter, 1. dalı) beyin (pial arter) damar yatakları ve torasik aorta, abdominal aorta endojen ve ekzojen CO yanıtları çalışıldı. Tüm damarların fenilefrin (Phe) ya da serotoninine (Ser) verdikleri kasılma yanıtları, HO inhibitörü inkübasyonu öncesi ve sonrasında kaydedilerek endojen üretilen CO'in vasküler tonusa katkısı değerlendirildi. CO donörü (CORM, Tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer) kullanılarak ekzojen CO'e verilen gevşeme yanıtları alınmasını takiben, siklik guanozin mono fosfat (cGMP) inhibitörü 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a] quinox-alin-1-one (ODQ) ve potasyum kanalı inhibitörü tetra etil amonyum (TEA) varlığında alınan CORM yanıtları ile CO'in etki mekanizması incelendi. Ayrıca izole edilen damarlardan HO-2 enzim ekspresyonu da western blot analiziyle saptandı. CO torasik ve abdominal aortlar, mezenter, renal, pulmoner, kalp, gastrokinemius kası iletim arterlerinde vasküler tonus düzenlemesine katılırken bu damar yataklarının direnç arterlerinde etki göstermedi. Grasilis kası damar yatağında hiç etkili değilken beyin dokusunda direnç arterlerinde de önemli şekilde tonus düzenlemesine etkili idi. HO-2 enzimi protein düzeyi ile endojen CO'in vasküler tonusa katkısının birbiri ile ilişkili olmadığı gösterildi. CO düz kasta gevşetici etkisini, çoğunlukla çapı yaklaşık olarak 600 µm den küçük olan arteriyel damarlarda K⁺ kanalları ile gösterirken, daha büyük çaplı damarlarda ise hem K⁺ kanalları hem de cGMP aracılığıyla oluşturduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: karbonmonoksit, hemoksijenaz, vasküler tonus, guanilat siklaz, potasyum kanalı.

ABSTRACT

CO is considered as an important mediator released from endothelium and smooth muscles and is responsible for regulating vascular tonus. Although CO has been known that is produced in many vascular tissues endogenously with enzymes HO-1 and HO-2, it has not been shown that contribution of CO to which vessel bed or in which ratio. The purpose of this descriptive study is to determine the contribution of CO to vascular tonus in vascular segments of various sizes and in vascular bed of various organs and through which mechanisms CO causes vasodilatation in these vessels. For this purpose, we used 6-8 months old Wistar Albino rats weighing 300-350 g. The arteries were carefully dissected out and were mounted on a myograph or tissue bath. Endogenous and exogenous vessel responses were studied in vascular beds of mesentery (main mesenteric artery, 1st, 2nd, 3rd branches), renal (renal artery, 1st, 2nd, 3rd branches), gastrocnemius muscle (feed artery, 1st, 2nd branches), gracilis muscle (femoral artery, muscular brunch, gracilis artery) heart (coroner, LAD), lung (main pulmonary artery, pulmonary artery, 1st branch), brain (pial artery), vascular beds, thoracic and abdominal aorta. To determine whether endogenously produced CO contributes to vascular tonus, PE or Ser concentration-response curves were generated in all vessels before and after treatment with the HO inhibitor CrMP. To examine vasodilator responses to CO donor (CORM, Tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer) were elicited in each ring on three separate occasions following pre-constriction with Phe or Ser: first in the absence of inhibitors, second in the presence of cGMP inhibitor 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) and third in the presence of non specific potassium channel inhibitor tetraethylammonium (TEA). Moreover, HO-2 expression from isolated vessels was found using the western blot analysis. While CO has contributed to vascular tonus regulation of thoracic and abdominal aorta, mesentery, renal, pulmonary, heart, gastrocnemius feed artery, it has not affected in resistance arteries of these vascular beds. Carbon monoxide was not effective at all vascular bed of gracilis muscle but it was also significantly effective in the regulation of vascular tone in resistance arteries of the brain tissue. It has been shown that, the contribution of HO-2 enzyme protein levels and the endogenous carbon monoxide to vascular tone is not related to each other. While CO generally shows the relaxant effect in smooth muscle via potassium channels in arterial vessels which are lesser than 600 μm , it performs the relaxant effect via either potassium channels or cGMP in the larger arteries.

Key words: carbon monoxide, hemoxigenase, vascular tonus, guanilate cyclase, potassium channel.

TEŞEKKÜR

Tez alıőamalarım süresince üstün bilgi birikimlerini ve deneyimlerini benden esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK'e, doktora eğitimim esnasında tüm katkılarından dolayı anabilim dalımızın değerli hocalarına, her konuda yardımlarını esirgemeyen Arő. Gör. Seher ÜLKER'e ve beraber çalıőtıđım araştırma görevlisi arkadaşlarıma, manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim aileme sonsuz saygı ve őükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Vasküler Sistemin Yapısı ve Fonksiyonu	3
2.1.1. Vasküler Sistemin Histolojik Yapısı	3
2.1.2. Vasküler Sistemin Fonksiyonu	4
2.2. Vasküler Tonusun Düzenlenmesi	5
2.2.1. Ekstresek Mekanizmalar	6
2.2.1.1. Vasküler Tonusun Nöral Kontrolü	6
2.1.2. Vasküler Tonusun Humoral Kontrolü	7
2.3. İntrensek Mekanizmalar	8
2.3.1. Doku Faktörleri	8
2.3.2. Parakrin Hormonlar	9
2.3.3. Miyojenik Mekanizmalar	10
2.3.4. Vasküler Tonusun Endotelial Kontrolü	10
2.4. Karbonmonoksit	15
2.4.1. Karbonmonoksidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	15
2.4.2. Endojen Karbonmonoksit Üretimi	15
2.4.3. Hemoksijenaz Enzimi	17
2.4.4. Karbonmonoksit Üretiminin Kontrolü	18
2.4.5. Karbonmonoksitin Fonksiyonları	19
2.4.6. Karbonmonoksidin Vasküler Tonusa Etkisi	20
2.4.6.1. Karbonmonoksidin Vazodilatasyon Mekanizmaları	21
GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1. Hayvanların Feda Edilmesi Ve Damarların İzolasyonu	24
3.2. Organ Banyosu ve Telli Miyograf Çalışması	27
3.3. Western Blot Analizi	30
3.3.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması	30
3.3.2. Elektroforez ve Blotlama İşlemleri	30
3.3.3. Görüntüleme ve Değerlendirme	31
3.4. Verilerin Değerlendirilmesi	31
BULGULAR	32
4.1. Aort Yanıtları	32
4.1.1. Aort Damarlarının Endojen CO Yanıtları	32

4.1.2. Aort Damarlarının Ekzojen CO Yanıtları	33
4.1.3. Aort Damarlarının HO-2 Ekspresyonu	33
4.2. Mezenter Damar Yatağı	34
4.2.1. Mezenter Yatağa Ait Damarların Endojen CO Yanıtları	34
4.2.2. Mezenter Yatağa Ait Damarların Ekzojen CO Yanıtları	35
4.2.3. Mezenter Yatağa Ait Damarların HO-2 Ekspresyonu	36
4.3. Böbrek Damar Yatağı	36
4.3.1. Böbrek Damar Yatağının Endojen CO Yanıtları	36
4.3.2. Böbrek Damar Yatağının Ekzojen CO Yanıtları	37
4.3.3. Böbrek Damar Yatağının HO-2 Ekspresyonu	38
4.4. İskelet Kası Dokusu	39
4.4.1.1. Gracilis Kası Damar Yatağına Ait Damarların Endojen CO Yanıtları	39
4.4.1.2. Gracilis Kası Damar Yatağına Ait Damarların Ekzojen CO Yanıtları	40
4.4.1.3. Gracilis Kası Damar Yatağının HO-2 Ekspresyonu	41
4.4.2.1. Gastrokinemius Kası Damar Yatağına Ait Damarların Endojen CO Yanıtları	41
4.4.2.2. Gastrokinemius Kası Damar Yatağına Ait Damarların Ekzojen CO Yanıtları	42
4.4.2.3. Gastrokinemius Kası Damar Yatağının HO-2 Ekspresyonu	44
4.5. Kalp Dokusu	44
4.5.1. Kalp Dokusu Damarlarının Endojen CO Yanıtları	44
4.5.2. Kalp Dokusu Damarlarının Ekzojen CO Yanıtları	45
4.5.3. Kalp Dokusu Damarlarının HO-2 Ekspresyonu	45
4.6. Pulmoner Damar Yatağı	46
4.6.1. Pulmoner Damar Yatağının Endojen CO Yanıtları	46
4.6.2. Pulmoner Damar Yatağının Ekzojen CO Yanıtları	47
4.6.3. Pulmoner Damar Yatağının HO-2 Ekspresyonu	48
4.7. Beyin Dokusu	48
4.7.1. Pial Arter Endojen CO Yanıtları	48
4.7.2. Pial arter Ekzojen CO Yanıtları	49
4.7.3. Pial arterin HO-2 Ekspresyonu	50
TARTIŞMA	52
SONUÇLAR	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	73
EKLER	74

Ek 1: Kocer G, Kuru O, Gündüz F, Bayram Z, Ozdem S, Aksoy D and Şentürk UK. The Effect of Exercise Training on the Responsiveness of Renal Resistance Arteries in Rats. Renal Failure, 33(6): 587–592, 2011.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ang II	:	Anjiotensin II
K⁺	:	Potasyum
NO	:	Nitrik oksit
CO	:	Karbonmonoksit
O₂	:	Oksijen
CO₂	:	Karbondioksit
H⁺	:	Hidrojen iyonu
ANP	:	Atriyel natriüretik peptit
VİP	:	Vazoaktif intestinal peptit
AMP	:	Adenozin mono fosfat
ADP	:	Adenozin difosfat
ATP	:	Adenozin tri fosfat
EDHF	:	Endotelden kaynaklanan hiperpolarize edici faktör
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
eNOS	:	Endotelyal nitrik oksit sentaz
iNOS	:	indüklenbilir nitrik oksit sentaz
nNOS	:	Nöronal nitrik oksit sentaz
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
sGC	:	Çözünebilir guanilat siklaz
sGMP	:	Siklik guanozin monofosfat
COX	:	Siklooksijenaz
MAPK	:	Mitojen activated protein kinaz
PGE₂	:	Prostaglandin E 2
PGI₂	:	Prostaglandin I 2
EET	:	Epoksieikosatrienoik asit
K_{IR}	:	İnward rectifying potasyum kanalı
Na⁺/K⁺ATPaz:	:	Sodyum potasyum ATPaz
ODQ	:	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a] quinox-alin-1-one
14,15 EET	:	14,15 epoksieikosatrienoik asit
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
COX-1	:	Siklooksijenaz 1
COX-2	:	Siklooksijenaz 2
PGI₂	:	Prostaglandin H 2
ACE	:	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ET	:	Endotelin
ECE	:	Endotelin dönüştürücü enzim
HO	:	Hemoksijenaz
HO-1	:	Hemoksijenaz-1
HO-2	:	Hemoksijenaz-2
HO-3	:	Hemoksijenaz-3
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
MİF	:	Migrasyon inhibitör faktör
TNF-α	:	Tümör nekrozis faktör-α
NFκB	:	Nükleer faktör κ B
PDGF	:	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
LTP	:	Long term potentiation
ZnDPBG	:	Zink döteroporfirin 2,4 bis etilen glikol

NTS : Nükleus traktus soliterius
Phe : Fenilefrin
BK_{Ca} : Kalsiyum bağımlı potasyum kanalı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1 Kan damarlarının histolojik yapısı	3
2.2. Dolaşımında yer alan kan damarı tipleri	4
2.3. İntrensek ve ekstrensek mekanizmalarla vasküler tonusun düzenlenmesi	6
2.4. Arteriyollerin etrafındaki dokulardan kaynaklanan vazoaaktif bileşikler	10
2.5. Enzimatik CO oluşumu	16
2.6. Vaküler düz kasta CO'in etki mekanizması	23
4.1. Torasik aort ve abdominal aort halkalarının Phe (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Phe (10^{-9} - 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri	32
4.2. Torasik aort ve abdominal aort halkalarının CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M) ve K ⁺ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri	33
4.3. Mezenter damar yatağına ait damar halkalarının Phe (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Phe (10^{-9} - 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri	34
4.4. Mezenter damar yatağına ait damar halkalarında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M) ve K ⁺ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri.	35
4.5. Böbrek damar yatağına ait damar halkalarının Phe (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Phe (10^{-9} - 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri	37
4.6. Böbrek damar yatağına ait damar halkalarında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M) ve K ⁺ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri	38
4.7. Grasilis kası damar yatağına ait damar halkalarının Phe (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Phe (10^{-9} - 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri	39
4.8. Grasilis damar yatağına ait damar halkalarında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M) ve K ⁺ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri	40
4.9. Gastrokinemius kası damar yatağına ait damar halkalarının Phe (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Phe (10^{-9} - 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri	42
4.10. Gastrokinemius damar yatağına ait damar halkalarında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} - 3×10^{-4} M) ve K ⁺ kanal blokörü TEA varlığında CORM	

(10^{-9} – 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri	43
4.11. Kalp dokusu damar yatağına ait damar halkalarının Ser (10^{-9} – 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Ser (10^{-9} – 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri	44
4.12. Kalp dokusu damar halkalarında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ve K^+ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri	45
4.13. Pulmoner damar yatağına ait Ser (10^{-9} – 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Ser (10^{-9} – 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri	46
4.14. Pulmoner dokusuna ait damar halkalarında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ve K^+ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri	47
4.15. Pial artere ait Ser (10^{-9} – 3×10^{-5} M), HO inhibitörü CrMP varlığında Ser (10^{-9} – 3×10^{-5} M) ve NA ile kastıktan sonra Ser (10^{-9} – 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri	48
4.16. Pial artere ait damar halkalarında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ve K^+ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri	49

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Damarların yapısı ve fonksiyonları	5
2.1. CO'in fiziksel özellikleri	15
2.2. CO'in farklı tür hayvanlarda vasküler etkileri	21
3.1. Çalışılan Damar Yatakalrı	28
4.1. Torasik aort ve abdominal aort halkalarının maksimal kasılma yanıtları	32
4.2. Torasik aort ve abdominal aort halkalarının maksimal gevşeme yanıtları	33
4.3. Torasik aort ve abdominal aort halkalarının HO-2 protein ekspresyonu	34
4.4. Mezenter damar yatağına ait maksimal kasılma yanıtları	35
4.5. Mezenter damar yatağına ait maksimal gevşeme yanıtları	36
4.6. Mezenter damar yatağına ait HO-2 protein ekspresyonu	36
4.7. Böbrek damarların maksimal kasılma yanıtları	37
4.8. Böbrek damarların maksimal gevşeme yanıtları	38
4.9. Böbrek damarlarının HO-2 protein ekspresyonu	39
4.10. Grasilis kasını besleyen damarların maksimal kasılma yanıtları	40
4.11. Grasilis kasını besleyen damarların maksimal kasılma yanıtları	41
4.12. Grasilis kasını besleyen damarların HO-2 protein ekspresyonu	41
4.13. Gastrokinemius kası arterlerinin maksimal kasılma yanıtları	42
4.14. Gastrokinemius kası arterlerinin maksimal kasılma yanıtları	43
4.15. Gastrokinemius kası arterlerinin HO-2 protein ekspresyonu	44
4.16. Kalp dokusuna ait damarların maksimal kasılma yanıtları	45
4.17. Kalp dokusuna ait damarların maksimal gevşeme yanıtları	45
4.18. Kalp dokusuna ait damarların HO-2 protein ekspresyonu.	46
4.19. Pulmoner damar yatağına ait damarların maksimal kasılma yanıtları	47
4.20. Pulmoner damar yatağına ait damarların maksimal gevşeme yanıtları	48
4.21. Pulmoner damar yatağına ait damarların HO-2 protein ekspresyonu	48
4.22. Pial arter ait damarların maksimal kasılma yanıtı ve bazal tonusu	49
4.23. Pial arter ait damarların maksimal gevşeme yanıtı	50
4.24. Pial arterin HO-2 ekspresyonu	50
4.25. Özet Tablo	51

GİRİŞ

Vasküler tonusun düzenlenmesi, yeterli doku oksijenizasyonu ve doku kanlanması için temel bir fonksiyondur. Bundan dolayı damar dışı kaynaklı nöral ve humoral faktörlerin yanında, endotel ve düz kas gibi çeşitli damar yapılarından kaynaklanan parakrin faktörler, myojenik mekanizma gibi birbiri ile etkileşimli karmaşık süreçleri içermektedir [1-3]. Birçok patolojik süreçte olduğu gibi, normal fizyolojik süreçte de vasküler tonusun düzenlenmesinde salgıladığı vazodilatör ve vazokonstriktör maddelerle asıl düzenleyicinin endotel olduğu kabul edilmektedir [1-3]. Vasküler endotelden salgılanan vazodilatör maddelerin başında nitrik oksit (NO), prostaglandin I₂ (PGI₂) ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF) gelmektedir [1, 3-5]. Son yıllarda vasküler tonusa katkısı bakımında ön plana çıkan moleküllerden biri de, endotelden salgılanan karbon monoksit (CO)'tir [6-8].

CO'ye bağlı oluşan gevşeme yanıtı, çizgili kas, böbrek, beyin, akciğer, kalp gibi dokulara ait çeşitli damar segmentlerinde gösterilmiştir [9-13]. CO'in dokuda önemli bir kısmı hem molekülünün, hemoksijenaz (HO) enzimi aracılığıyla yıkılması sırasında üretilmektedir [14-16]. Üç izoformu olan HO enziminin, HO-3 izoformu hakkında bilinenler azdır [6, 17]. Ancak geniş dağılım göstermesi yanında, hipoksi, oksidatif stres, okside lipidler, sitokinler, anjiyotensin II gibi faktörlere bağlı sentezlenen indüklenebilir form olan HO-1 ve yapısal olarak eksprese edilen HO-2 izoformu hakkında bilinenler oldukça fazladır [18-19]. Herhangi bir biyokimyasal veya biyofiziksel stresin olmadığı bazal koşullarda, endotel ve damar düz kasında eksprese edilen HO-2, CO'in bazal koşullardaki yapımından sorumlu tutulmaktadır [20-25]. NO ile benzer fizikokimyasal özelliklere sahip endojen vazoaktif bir molekül olan CO, damar gevşetici etkisini yine NO gibi çözünebilir guanilat siklaz enzimini (sGS) aktive ederek [15-16] veya damar düz kasında yer alan kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarını (BK_{Ca}) uyararak yapmaktadır [8, 26-27].

Aorttan başlayarak prekapiller sfinktere kadar uzun arteriyel damar ağacı göz önüne alındığında farklı segmentlerde, farklı tonus düzenleyicilerin ön plana çıktığı gözlenmektedir [28-30]. Genellikle damar ağacında, NO ve EDHF'nin rölatif katkısı; EDHF damar çapları azaldıkça daha önemli hale gelirken, NO büyük damarlarda hakim olduğu izlenmektedir [31]. Diğer yönden organlara spesifik olarak damar yatakları incelendiğinde ise, belirli damar yataklarının bazı mediyatörlere daha fazla yanıt verebildiği birçok çalışmada saptanmaktadır [30]. Bunun yanında NO ve EDHF'de olduğu gibi damar segmenti değiştikçe, mediatörün damar gevşemesine neden olan aracı mekanizması da değişim gösterebilmektedir [28-31].

Literatürde bulunan CO'nun damar tonusu ve/veya dolaşımın düzenlenmesiyle ilgili araştırmalar incelendiğinde, CO'in hangi damar segmentlerinde veya hangi organların damar yatağında tonüse ne oranda katıldığını gösteren kıyaslamalı bir yaklaşım bulunmamaktadır. Bunun yanında CO'in oluşturduğu vazodilatör etkinin mekanizmasının damar çapı veya damar yatağına

göre nasıl bir değişim gösterdiğini de incelenen bir araştırma yoktur. Yapılan çalışmalar CO'nun spot olarak yalnızca belli bir damar bölgesindeki çeşitli fonksiyonel etkilerini aydınlatmaya yöneliktir.

Tanımlayıcı bir araştırma olarak planlanan bu çalışmanın amacı, CO'nun farklı büyüklükteki damar segmentlerinde ve farklı organların damar yataklarında vasküler tonuse katkı düzeyini ortaya koymaktır. Ayrıca bu damar segmentlerinde, CO'in hangi mekanizma ön planda olarak gevşeme yarattığı ortaya konmaya çalışılacaktır.

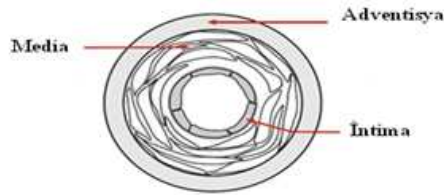
GENEL BİLGİLER

Vasküler sistem temel olarak iki amaca hizmet eder. Birincisi dağıtım bir diğeri de değişimdir. Dağıtım, kanın organlara götürülmesi ve organlardan uzaklaştırılması işlemini içerir. Değişim, kan akım hızının en düşük olduğu damar segmenti olan kapiller damarlarda, maddelerin kan ve doku arasındaki alış-verişini kapsar. Bu tezin ilgilendiği konu olan dağıtım, damarların anatomik olarak ve fizyolojik kontrol mekanizmalarıyla düzenlenmesi ile sağlanır. Damar çaplarının değişmesi kan basıncını düzenler ve kanın spesifik organlara ve organların belirli bölgelerine ulaşmasını sağlar [1, 32]

2.1. Vasküler Sistemin Yapısı ve Fonksiyonu

2.1.1. Vasküler Sistemin Histolojik Yapısı

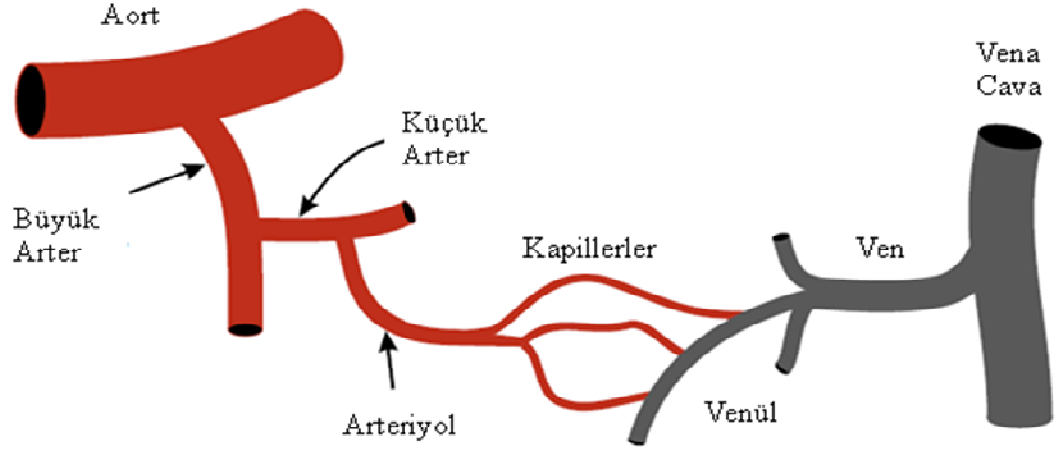
Damar ağı, kanı kalpten dokulara taşıyan arteriyal sistem, kan ve dokular arasında madde alış verişine izin veren kapiller damarlar ve kanın tekrar kalbe dönüşünü sağlayan venöz sistemden oluşur. Arteriyal ve venöz büyük damarlar, intima, media ve adventisya olmak üzere üç tabakadan oluşurken küçük damarlar ve kapillerler, endotel hücreleri ve bazal laminadan oluşurlar, düz kas yoklarıdır. İntima, tek sıra endotel hücrelerinden oluşur ve bazal lamina ile media tabakasından ayrılır. Büyük damarlarda, bazal lamina ve endotel hücrelerinin arasında bağ doku yer alır. Media, glikoproteinler, elastin ve kolajen matrikste iyice yerleşmiş düz kas hücrelerini içerir. Damarın büyüklüğüne bağlı olarak; düz kas hücrelerinin birkaç tabakası olabilir, bunlar longitudinal, helikal ve dairesel olarak düzenlenmiştir. Düz kas hücreleri kasıldığında damarın çapı azalır. Düz kas hücrelerinin kolajen ve elastine oranı damarın bütün mekanik özelliklerini belirler. Örneğin, aort büyük miktarda elastin içerir ve bu mekanizma, aortun arter basıncını kontrol etmesini sağlar. Küçük arter ve arteriyollerdeyse oransal olarak düz kas miktarı daha fazladır. Bundan dolayı bu damarlar kasılarak kan akımı ve kan basıncını düzenlemede daha etkindirler. En dış tabakaysa adventisya tabakasıdır. Bu tabaka medya tabakasından eksternal elastik laminayla ayrılır. Adventisya tabakası, kolajen, fibroblast, büyük damarlarda vaza vorumlar, lenfatikler ve otonom sinirler özellikle sempatik adrenerjik sinirleri içerir [33].



Şekil 2.1. Damarların histolojik yapısı

2.1.2. Vasküler Sistemin Fonksiyonu

Sol ventrikül kanı aortaya pompalar ve arteriyal damar sistemleri aracılığıyla tüm vücuda dağılır.”



Şekil 2.2. Dolaşımda yer alan kan damarı tipleri

Aort, kanı kalpten arteriyel sisteme dağıtan ana damardır ve pulsatil basıncı tamponlar ki bu fonksiyonu yüksek kompliyansı sayesinde yapmaktadır. Büyük arterler, aorttan dallanırlar (örn; karotis, mezenterik ve renal arterler) ve spesifik organ veya vücudun özel bölümlerine kan akımını sağlarlar. Büyük arterlerin normal fizyolojik koşullar altında doku kan akımının veya kan basıncının düzenlenmesinde rolleri yoktur. Büyük arterler organlara ulaştıklarında küçük arterlere, küçük arterler ise daha küçük arterlere dallanır. Arteriyel sistemde ilerleyen damarların çapları 200 μm 'ye ulaştığında arteriyol olarak isimlendirilir. Küçük arterler ve arteriyoller fonksiyonel olarak direnç damarları olarak ta sınıflandırılmaktadırlar. Bu segment organların kan akımının ve arteriyal kan basıncının düzenlenmesinden sorumludur. Direnç damarlarının fonksiyonlarının düzenlenmesi hem sinirsel hem de humoral olarak kontrol edilmektedir. Direnç arterleri, otonom sinirlerle özellikle sempatik adrenerjik sinirlerle inerve edilirler ve sinirsel aktiviteye bağlı olarak ta kasılır veya gevşerler. Direnç arterlerinin düz kaslarında dolaşımda yer alan hormonların (örn; katekolaminler, anjiyotensin II (ANG II) bağlandığı reseptörler de bulunur, bu hormonlar da damarların çapının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca direnç arterlerin fonksiyonları damar etrafındaki dokulardan veya damarın kendi yapılarında üretilen adenozin, potasyum (K^+), nitrik oksit (NO) ve karbonmonoksit (CO) gibi ürünlerle de düzenlenmektedirler [32, 34].

Damar çapları giderek küçülen arteriyollerden sonra kapiller damarlar gelmektedir. Kapiller damarların, damar düz kasları yoktur, endotel ve bazal membrandan oluşmaktadır. Dolaşımdaki en küçük damarlar olmasına rağmen sayı olarak çok fazladır. Bu nedenle en büyük kesit alanına sahip olup, vücuttaki başlıca değişim damarlarıdır. Kapiller endotel, madde değişimi için çok fazla yüzey alanına

sahiptir. Endotelden, oksijen (O₂), karbondioksit (CO₂), metabolik substratlar ve ürünlerin, dolaşımdaki hormonların, plazma ve doku intertisyumu arasındaki değişimi gerçekleştirir [32, 34].

Kapillerler bir araya gelerek post-kapiller venülleri oluştururlar. Post-kapiller venüllerde makromoleküller ve sıvılar için değişim damarları olarak hizmet verirler. Post-kapiller venüller birleşerek daha büyük form olan venülleri oluştururlar. Bu noktada damar duvarında düz kas yeniden görünmeye başlar. Venüller, kasılıp gevşeme özellikleriyle kapiller basınç ve venöz kan hacmini düzenler [34].

Venüller bir araya gelerek daha büyük venleri oluşturur. Venüller ve venler vücudun başlıca kapasitans damarlarıdır. Kan hacminin büyük bir kısmı bu damarlarda bulunur. Venlerin kasılması, venöz kan basıncını arttırarak venöz kan volümünü azaltırken kalbe geri dönen kan miktarını arttırırlar. En son venöz damarlar inferior ve süperior vena kava'dır ki bu damarlar kanı kalbin sağ atriyumuna taşır [34].

Tablo 2.1. Damarların yapısı ve fonksiyonları

	Aort	Büyük arterler	Küçük arterler	Arteriyoller	Kapillerler	Venüller	Venler	Vena kava
Damar Çapı (mm)	25	1.0-4.0	0.2-1.0	0.01-0.2	0.006-0.01	0.1-0.2	0.2-5	35
Kollajen lifler	■	■	■	■			■	■
Düz kas	■	■	■	■			■	■
Elastik lifler	■	■	■	■			■	■
Endotel	■	■	■	■	■	■	■	■
Fonksiyon	Dağıtım ve basıncın tamponlanması	Dağıtım	Dağıtım ve direnç	Direnç	Değişim	Değişim, toplama, kapasitans	Kapasitans	Toplama

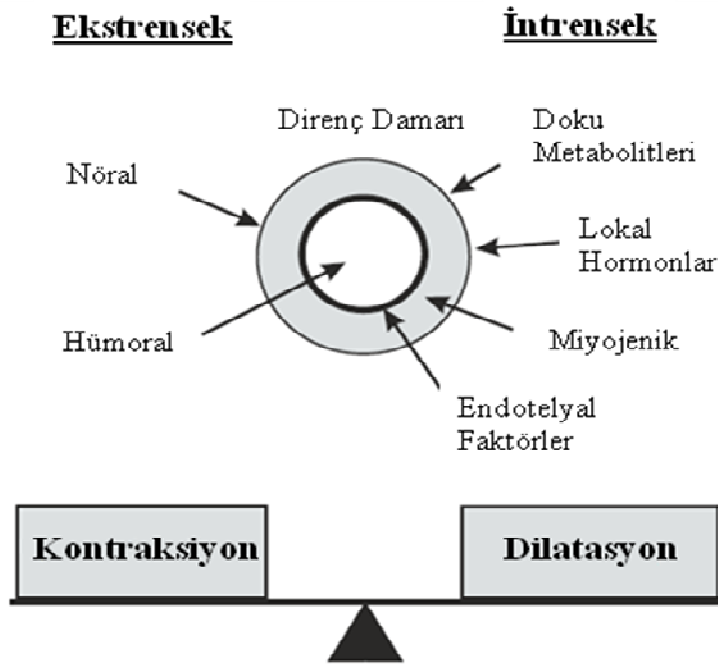
2.2. Vasküler Tonusun Düzenlenmesi

Fizyolojik koşullar altında kapiller öncesi direnç damarların (küçük arterler ve arteriyoller) çaplarının değişmesi sistemik vasküler direncin düzenlenmesinde en önemli mekanizmadır. Direnç damarlarının normal koşullarda kısmen kasılı olması vasküler bazal tonus olarak ifade edilmektedir. Direnç damarları, bazal tonuslarının üzerine daha da kasılırlarsa direnç artar, düz kaslarının gevşemesi sonucundaysa dilate olurlarsa, dirençleri azalır [35]. Venöz damarlarda da durum benzer şekildedir.

Ekstresek ve intrinsek mekanizmalar damar düz kas aktivasyonu nun derecesini belirler. Ekstresek mekanizmalar; sempatik sinirler ve dolaşımdaki hormonlar damar dokusunun dışından köken alırlar. İntrensek mekanizmalar da kan damarlarından veya damar dokusunun çevresinden kaynaklanırlar. İntrensek

mekanizmalar; endotelden kaynaklanan faktörler, düz kas miyojenik tonusu, lokal olarak üretilen hormonlar ve doku metabolitlerini kapsamaktadır. İntrensek ve ekstrensek mekanizmaların bir kısmı vazokonstriksiyonu uyarırken (sempatik sinirler, ANG II, endotelin I (ET-1)) diğerleri düz kas relaksasyonunu ve vasküler dilatasyonu uyarır (NO, adenosin, hidrojen iyonu (H⁺)). Bu çerçevede, vazokonstriktör ve vazodilatörler organizmanın gereksinimlerine göre vasküler tonusu belirlemek için yarışır [1, 35].

Genelde, vazokonstriktör mekanizmalar arteriyel basınç ve sistemik vasküler direnci sürdürmek için önemli olmasına karşın vazodilatör mekanizmalar da organların kan akımını düzenleme de ön plana çıkmaktadırlar.



Şekil 2.3. İntrensek ve ekstrensek mekanizmalarla vasküler tonusun düzenlenmesi

2.2.1. Ekstrensek Mekanizmalar

2.2.1.1. Vasküler Tonusun Nöral Kontrolü

Vasküler tonusun düzenlenmesinde görev alan otonom sinirlerin etkileri iki alt başlık altında incelenmektedir.

Parasempatik innervasyon. Parasempatik sinir sisteminin kranial bölümünün efferent lifleri bazı iç organları, başın kan damarlarını innerve eder, halbuki sakral bölümü genital organları, mesane ve kalın bağırsağın kan damarlarına gider. Direnç damarlarının az bir kısmının parasempatik lif alması nedeniyle, bu kolinerjik liflerin total vasküler dirence etkisi azdır [36].

Sempatik İnnervasyon. Postgangliyonik sempatik lifler innerve edecekleri arter ve venlerin etrafında yer alır. Kapillerlerin ve venüllerin sinirsel innervasyonları

yoktur. Sempatik efferent sinirlerin dalları damarın adventisya kısmında bulunur ve sempatik sinirlerin küçük şişkin alanları olan varikositlerden nörotransmitter salınımı gerçekleşmektedir. Sempatik aktivasyon direnç ve kapasitans damarlarda kasılmaya neden olarak sistemik vasküler direnci arttırmasının yanında venlerde kasılma yaparak venöz kapasitansı azaltır. Sempatik adrejenetik sinir uçlarından salınan norepinefrin, postsinaptik α_1 -adrenoreseptörlerine bağlanır ve vazokonstriksiyona neden olur. Benzer cevaplar küçük arter ve arteriyollerde bulunan postsinaptik α_2 -adrenoreseptörler aracılığıyla da gerçekleşir. Ayrıca norepinefrin, presinaptik α_2 -adrenoreseptörlerine bağlanarak ta kendi salınımını kontrol etmektedir [36-37].

Kan damarları postsinaptik β_2 - adrenoreseptörlere de sahiptir. Postsinaptik β_2 - adrenoreseptörlerin uyarılması vazodilatasyona yol açmaktadır. Fakat damarlarda α - adrenoreseptörler daha fazla ve daha baskın olduğu için β_2 -adrenoreseptörlerin vazodilatör etkisini görmek için ancak α -adrenoreseptörlerin tamamen bloke olması gerekir [36].

Direnç damarlarının sempatik aktivasyonu pek çok organda vasküler tonusa katkı sağlar. İskelet kası, deri, gastrointestinal ve renal dolaşım sempatik aktiviteden çok etkilenirken bunların tersine beyin ve kalp sempatik aktiviteden daha zayıf etkilenir. Genelleme yapacak olursak sempatik aktivasyon beyin ve kalp dışında arteriyel kan basıncını arttırır ve organ perfüzyonunu azaltır [36].

2.2.1.2. Vasküler Tonusun Humoral Kontrolü

Endokrin bezler veya özelleşmiş hücreler tarafından yapıldıktan sonra kana salgılanan ve kan yolu ile ulaştıkları organ ve dokularda fonksiyon düzenleyici olarak çok düşük miktarları ile görev yapan organik bileşiklere uyarma anlamına gelen hormon denilir. Dolaşımdaki birçok hormon damar sistemini etkiler. Atriyal natriüretik peptid (ANP), vazoaktif intestinal peptid (VIP) ve kininler vazodilatör hormonlardır. Vazopressin, noradrenalin, adrenalin ve ANG II dolaşımdaki vazokonstriktör hormonlardır [38].

Atrial natriüretik hormon. Kalp tarafından salgılanan atrial natriüretik peptid (ANP) çeşitli vazokonstriktör ajanların etkilerini antagonize eder ve kan basıncını düşürürse de dolaşımın düzenlenmesindeki rolü hala bilinmemektedir [36, 39-40].

Vazopressin. Arka hipofiz bezinden salınan vazopressin güçlü bir vazokonstriktördür. Periferal damarların direncini artırarak arteriyel kan basıncını artırır. Fakat bu etkisi sağlıklı bireylerde çok düşüktür. Ancak aşırı kanama gibi durumlarda kan hacmi çok fazla düştüğünde (hipovolemik şok), vazopressin kan basıncının tekrar normal seviyelere çekilmesinde en önemli vazokonstriktör ajandır [36, 38].

Anjiyotensin II. Yaygın vazokonstriktör etkiye sahip bir diğer hormon da ANG II'dir ve özellikle kan basıncı ya da ekstraselüler sıvı hacmindeki düşüşe cevap olarak salgılanır; sonuçta kan basıncının sürdürülmesinde son derece önemlidir.

ANG II, gerek doğrudan arteriyolar düz kas hücresine etki ederek, gerekse sempatik aktivite artışıyla işlev görebilmektedir[36, 41].

2.3. İntrensek Mekanizmalar

2.3.1. Doku Faktörleri

Doku faktörleri damarlarının suladığı dokularca üretilen maddeleri kapsamaktadır. Bu maddeler kan damarlarına etki ederek damar düz kasının kasılması veya gevşemesi yoluyla direnç ve kan akımını değiştirirler. Bazı durumlarda bu maddeler dolaylı ya endotel fonksiyonunu değiştirerek veya sempatik sinirlerden norepinefrin salgılatarak da damar düz kasına etki ederler. Vazoaktif maddelere, hücre aktivitesi veya metabolizması sonucu oluşan adenozin, CO₂, H⁺, K⁺, laktat gibi doku metabolitleri örnek olarak verilebilir. Bu metabolitlere ilaveten doku etrafında yer alan farklı hücre tiplerinden salınan ve lokal parakrin hormonlar olarak ta isimlendirilen histamin, bradikinin ve prostoglandinler gibi vazoaktif maddeler de sayılabilir [2].

Doku metabolizmasının artması veya azalması bu vazoaktif maddelerin salınımını değiştirir. Dokuda metabolik aktivite arttığında, örneğin kaslar kasılırken veya beyinde nöronal aktivite arttığında bu dokularda kanlanma artışı bu yolla açıklanmaktadır [2].

Adenozin. Böbrek damarları dışında adenozin, pek çok organda güçlü bir vazodilatatördür. Adenozin, 5` nükleotidaz enzimiyle adenozin monofosfattan (AMP) üretilir. AMP de, ATP ve ADP'den üretilir. Adenozin, hipoksida ve oksijen tüketiminin yüksek olduğu durumda artar. ATP konsantrasyonu, adenozin konsantrasyonundan yaklaşık 1000 kat daha fazla olduğundan az miktarda bile ATP hidroliz olunca adenozin konsantrasyonu çok artar. Hipoksi ve miyokardiyal oksijen tüketiminin fazla olduğu durumlarda adenozin, koroner kan akımının düzenlenmesinde önemli bir mekanizmadır [2, 42].

Karbondioksit (CO₂). CO₂, oksidatif metabolizmanın yanında, kan akımı azaldığında da doku ve damarlarda CO₂ konsantrasyonu da artar. CO₂, parankimal hücrelerden vasküler düz kas hücrelerine kolayca diffüze olarak damarları gevşetir. CO₂, özellikle beyin kan akımının düzenlenmesinde önemli rol oynar [2, 43].

Hidrojen İyonu. Hidrojen iyonu (H⁺), CO₂ konsantrasyonu artışına bağlı olarak veya anaerobik metabolizma arttığında artar. Lokal vazodilatasyona neden olan H⁺ iyonu özellikle serebral dolaşımında etkilidir [2, 44].

Potasyum İyonu. Potasyum iyonu (K⁺), iskelet ve kalp kaslarının kasılmasıyla hücre içinden dışına geçiş yapar. Kan damarlarının çevresinde hücre dışı K⁺ konsantrasyonunun artması vasküler düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon aracılığıyla damarlarda gevşemeye neden olmaktadır. K⁺, kasılan iskelet kasının kan akımının artmasında önemli bir rol oynadığı çok iyi bilinmektedir [2, 45].

Oksijen. Oksijen konsantrasyonu lokal kan akımının düzenlenmesinde önemlidir. Dokuların parsiyel oksijen basıncı düşmesi vazodilatasyona neden olarak dokunun kan akımını arttırmaktadır. Hipoksi, pulmoner damar yatağı hariç bütün damarlarda vazodilatasyona sebep olur [2, 35].

Ozmolarite. Kan ve doku interstisyumundaki ozmolarite değişikliklerinin lokal kan akımının düzenlenmesinde rolü vardır. Doku iskemisi ve metabolik aktivitenin artması, interstisyel sıvının ve venöz kanın ozmolaritesini arttırarak ta vazodilatasyona neden olmaktadır. Bu nedenle ozmolaritedeki spesifik olmayan değişikliklerin kan akımının düzenlenmesinde rol oynayabileceği tahmin edilmektedir [2, 35].

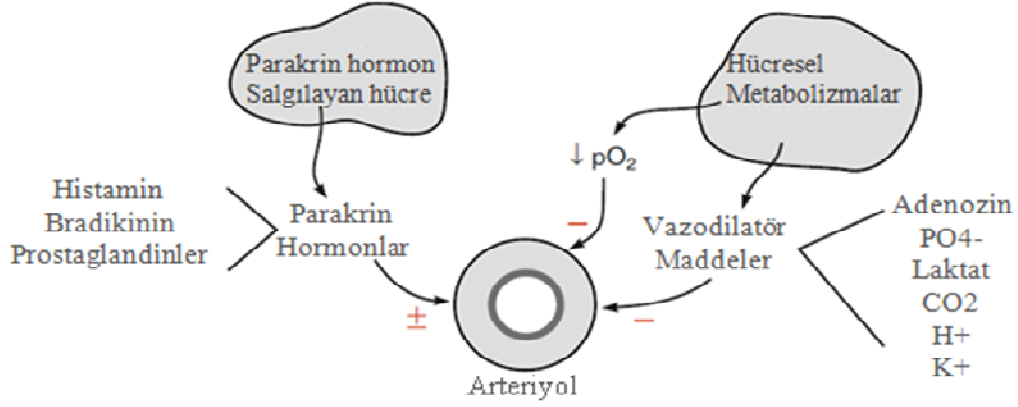
2.3.2. Parakrin Hormonlar

Parakrin fonksiyon, interselüler sıvı kanalları yada gap kavşakları boyunca bir hücre tipinden komşu farklı bir hücre tipine sinyal molekülünün gitmesidir [32]. Histamin, bradikinin, ve araşidonik asit ürünlerini içeren parakrin hormonlar kan akımının düzenlenmesinde doku metabolizmasından bağımsız mediyatörlerdir [32].

Histamin. İnflamasyon, alerji ve alerjik yanıtlar sonucunda mast hücrelerinden salınarak kapiller geçirgenlikte artışa, bazı damar yataklarında venöz konstriksiyona ve arteriolar vazodilatasyona sebep olur. Histamin vasküler etkilerini, H1 ve H2 resptörleri aracılığıyla gerçekleştirir [2].

Bradikinin. Kinin ailesinin bir üyesi olup bir doku hormonudur. Kallikreninle aktive ve anjiyotensin dönüştürücü enzim ile de inaktive edilir. Kardiyovasküler hastalıkların oluşum patogenezinde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir [46-47]. Bradikinin, endotel hücrelerinde yer alan B2 kinin reseptörleri aracılığıyla hücre içine Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırarak NO sentezini uyarır, fosfolipaz-A₂ aktivasyonu ile de membranda vazoaktif medyatörler sentezletir. Araşidonik asit metabolitleri ve NO aracılığıyla da dolaylı olarak vazodilatasyona neden olur [47-48]. Bradikinin, B2 reseptörleriyle düz kas releksasyonu, damarlarda permeabilite artışı, mast hücrelerinden histamin salınımı, doku inflamasyonu, sempatik sinir eksitasyonu katekolamin salınımı, membranlardan glikoz transportu ile insüline duyarlılığın artması gibi doğrudan etkileri de vardır.

Araşidonik asit metabolitler. Membranda bulunan bir fosfolipid olan araşidonik asitten üretilen prostasiklin ve prostaglandin E₂ (PGE₂), vazodilatör iken prostaglandin F_{2 α} , tromboksanlar ve lökotrienler vazokonstriktör olarak etki etmektedir. Birçok dokuda etkili oldukları gibi, birçok uyaran ile de salgılanmaları sonucu bazal tonüse etki ederek doku kanlanmasının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır [2].



Şekil 2.4. Arteriyollerin etrafındaki dokulardan kaynaklanan vazoaktif bileşikler.

2.3.3. Miyojenik Mekanizmalar

Doku metabolizması bazal durumda sabit olduğu zaman, perfüzyon basıncındaki değişmelere karşın sabit kan akımını devam ettirilmesi için vasküler direnç değişikliklerinin yapılması gerekmektedir. Bu mekanizma genel olarak kan akımının otoregülasyonu olarak kabul edilmektedir. Perfüzyon basıncı değiştiği zaman kan akımının hala sabit kalmasının nedeni miyojenik mekanizmayla açıklanabilir. Bu mekanizmaya göre, vasküler düz kas gerildiğinde vasküler düz kas membranında yer alan gerime duyarlı kanalları aktive eder ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttırarak damarlar kasılır [2, 35].

2.3.4. Vasküler Tonusun Endotelial Kontrolü

Vasküler tonusun kontrolünde endotelin katkısı çift yönlüdür. Endotelden, NO, prostasiklin ve endotelden kaynaklanan hiperpolarize edici faktör (EDHF) gibi vazodilatör ajanların yanı sıra endotelin gibi vazokonstriktör ajanlarda salgılanmaktadır. Vasküler tonus bu vazokonstriktör ve vazodilatör ajanlar arasındaki dengeye bağlıdır. En önemli düzenleyici ajanları aşağıda açıklanmıştır [2, 35].

Nitrik Oksit. NO, endotelden salınan en önemli mediyatördür. Endotelial gevşetici faktör varlığı ilk olarak Furchgott ve Zawadzki tarafından 1980 yılında tavşan aort halkasında sağlam bir endotel varlığında asetil koline gevşeme şeklinde yanıt verilmesiyle fark edilmiştir. Bu çalışmada sağlam ve perfüzyonu düzgün olan tavşan aort kesitlerinde noradrenalin ile oluşturulan vazokonstrüksiyonun asetil kolin ile vazorelaksasyona dönüştüğü, fakat endotel tabakası çıkarılan aort kesitlerinde vasküler düz kasın vazodilatasyon yeteneğinin kaybolduğu gözlenmiştir. Bu nedenle endotelial gevşetici faktör olarak tanımlanan prostanoidler dışında vazodilatör bir maddenin varlığı ortaya konmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu yeni faktörün normal endotel tarafından salındığı ve çeşitli ilaç ve ilaç dışı maddeler ile salınımının arttırıldığı gözlenmiştir [49]. Bundan 7 yıl sonra endotelial gevşetici faktörün NO olduğu tespit edilmiştir [50].

NO, L-arjinin amino asidinin nitrik oksit sentaz (NOS) enzimiyle oksidasyonu sonucunda sitrülün ile birlikte oluşur. NOS enziminin üç izoformu

bulunmaktadır. Beyinden klonlanan formu nöranal NOS (nNOS), endotel hücrelerinden klonlanan endotelial NOS (eNOS) ve son olarak uyarılabilir formu da indüklenebilir NOS'tur (iNOS). Bu üç izoformun hepsi de nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid ve flavin mononükleotid kofaktör bağlanma bölgesi ve kalsiyum (Ca^{2+}) kalmodulin bağlanma bölgelerine sahiptir. Tetrahidrobiopterin, enzimin hem grubundan L-arjinine elektron transfer eden önemli kofaktördür. İlginç olarak tetrahidrobiopterin yada L-arjinin yoksa elektron transferi moleküler oksijene kayarak süperoksit anyonunu oluşturmaktadır.

Asetil kolin, norepinefrin, bradikinin, trombin, ATP, vazopressin, serotonin, histamin, yağ asitleri, iyonoforlar ve kayma gerimi gibi NO salınımını düzenleyen pek çok faktör vardır. NO, düz kas membranını kolayca geçerek soluble guanilat siklazın (sGC) hem kısmına bağlanıp, siklik guanozin monofosfatı (cGMP) oluşumunu sağlamaktadır. cGMP, miyozin hafif zincir kinazın fosforunu uzaklaştırarak defosforiller ve hücre içi Ca^{2+} düzeyinin azalmasını sağlayarak ta gevşemeye neden olur.

Vasküler tonusun düzenlenmesinde endotelden salınan NO oldukça önemli rolü olan bir mediyatördür. NO ile endotelden salınan vazokonstriktörler ve sempatik sinir sistemi arasındaki denge bazal damar tonusunun sürdürülmesinde kritik fonksiyon gösterir. NOS enziminin vasküler tonusa katkısı gerek inhibitörleriyle gerekse de transgenik hayvanlarla yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Tavşan aortunda NOS enziminin L-NMMA ile inhibe edilmesi endotelial vazokonstriksiyona yol açarken eNOS'dan yoksun farelerin aortunda Ach'e verilen gevşeme yanıtı ortan kalkmıştır. NO'nun katkısı farklı canlı türleri ve aynı canlıda damar boyutları açısından farklılık göstermektedir. Özellikle iletim tipi büyük arterlerde NO'nun katkısı ön plandayken, damar çapı küçüldükçe NO yerini EDHF'ye bırakmaktadır.

NO, genel sistemik tonusun yanında diğer damar yataklarına göre koroner, pulmoner ve renal vasküler tonusun düzenlenmesinde daha önemli bir role sahiptir. Huang ve arkadaşları eNOS'dan yoksun hayvanların endoteli sağlam aort damarlarında asetil koline verilen gevşeme yanıtlarının azaldığını ve bu hayvanların hipertansif olduğunu ilk olarak göstermişlerdir [51]. Kardiyak, nöronal ve hormonal homeostatik mekanizmalar devreye girmesine rağmen eNOS'un yokluğunu kompanse edememektedir, hipertansiyon gelişmektedir [52]. Bu sonuçlar sistemik kan basıncının düzenlenmesinde eNOS kaynaklı NO'nun rolünün çok önemli olduğunu vurgulamaktadır.

eNOS'dan yoksun hayvanların pulmoner dolaşımında NO'nun katkısı incelendiğinde; bu hayvanların pulmoner arter basıncı ve damar direncinin arttığı gösterilmiştir. Pulmoner dolaşımında iNOS ve nNOS kaynaklı NO'nun, sistemik kan basıncına eNOS kadar katkısının olmadığı tespit edilmiştir.

Koroner damar tonusunun düzenlenmesinde NO'nun önemi NOS enziminin inhibisyonuyla gösterilmiştir. L-NMMA ile perfüze edilen kalpte bazal koroner

damar tonusu artış göstermesinin yanında, asetil kolin ve bradikinine verilen gevşeme yanıtı önemli ölçüde baskılanmıştır [53-54] .

NO'in böbrekte damar tonusu ve renal fonksiyonlara katkısını incelediğinde; eNOS'tan kaynaklanan NO'in, pre ve post-glomerüler arteriyolar tonüsün ve renal kan akımının kontrolünde önemli role sahip olduğu görülmektedir. Bu dengenin bozulması böbrek disfonksiyonuna ve bir süre sonra sistemik hipertansiyona yol açmaktadır [55]. eNOS yanında böbreklerde nNOS'un da önemli fonksiyonları vardır. Parasempatik ve nitretrjik sinirlerin yanında, tübül ve glomerül gibi nöral olmayan böbrek bölümlerinde de yer alan nNOS, böbrek fonksiyonu ve renal kan akımının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca izole edilen renal arter ve arteriyollerde de nitretrjik sinirlerin uyarılması vazodilatör etkilidir. Spesifik nNOS inhibitörlerinin uygulanması renal plazma akımını, medullar ve kortikal kan akımını azaltır, renal vasküler direnci artırır [56].

EDHF. NO'in aydınlatılmasından kısa süre sonra türe, damarın boyutlarına, uyarana bağlı olarak endotelden birden fazla farklı gevşetici faktörlerin salındığı da tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda asetil kolin'e verilen gevşeme yanıtlarının, NOS ve siklooksijenaz (COX) inhibitörleriyle engellenmediği saptandıktan sonra, birçok araştırmada NO ve PGI₂'den farklı endotel kaynaklı vazodilatör madde tanımlamıştır [57]. Bu vazodilatör yanıtların potasyum kanallarının bloke edilmesiyle ortadan kalktığı tespit edilmiştir. EDHF'nin etkisiyle ilgili üç farklı mekanizma önerilmektedir. Bu mekanizmalar türler arasında, damar yatakları arasında ve endotelial uyaranlara göre farklılık göstermektedir. Birinci öneri EDHF, Ca⁺² bağımlı K⁺ kanalları aracılığıyla endotelde hiperpolarizasyon oluşturur. Oluşan hiperpolarizasyon, gap junctionlar aracılığıyla vasküler düz kasa iletilerek düz kasta gevşemeye yol açar [58]. Bu fikre göre; endotelial K⁺ kanalları, düz kasta voltaj bağımlı Ca⁺² kanalları aracılığıyla Ca⁺² girişini azaltarak vasküler düz kasın kasılabilirliğine etki eder [59]. Diğer bir öneri; EDHF, EET gibi sitokrom p450 yolağının ürünüdür ve EET, BK_{Ca} kanalları aracılığıyla düz kasta hiperpolarizasyona yol açar [59]. Üçüncü öneri ise; endotel hücrelerinden orta ve küçük Ca⁺² bağımlı K⁺ kanalları aracılığıyla K⁺ çıkışı düz kas hücrelerindeki inward rectifying potasyum kanallarını (K_{IR}) ve sodyum potasyum ATPaz'ları (Na⁺/ K⁺ ATPaz) aktive eder [60]. EDHF, damar çapının artışıyla vazodilatasyonda ve doku perfüzyonunda önemli rol oynar.

Yapılan çalışmalarda K⁺, H₂O₂, C-natriüretik peptid, anandamid, 14,15 epoksieikosatrienoik asit (14,15 EET) birçok mediyatör EDHF olarak tanımlanmıştır. EDHF aracılı gevşeme iletim ve direnç damarlarının her ikisinde de tanımlansa da direnç arterlerinde ve damar boyu küçüldükçe katkısı daha fazladır [5]. İletim damarları olduğu halde koroner ve böbrek damar yatağında EDHF major rol oynar [61-62].

Endotelden salınan hiperpolarize edici faktörler incelendiğinde; 14,15 EET, araşidonik asidin sitokrom P450 metabolitidir ve 14, 15 EET düz kasa diffüze olarak kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarını açar. Bunun sonucunda potasyum iyonlarının hücre dışına çıkması ile ve damar düz kası hiperpolarize olarak gevşer.

14,15 EET, in vivo ve in vitro çalışmalarda insan koroner ve mammary arterinde ve bir o kadar da periferik musküler ve subkutan arterlerde damar gevşemesine katkısı gösterilmiştir [5, 63-65]. Sitokrom P450 metabolitleri böbrek dolaşımının düzenlenmesinde, kan basıncının uzun süreli kontrolünde ve sodyum homeostazisinde de önemli rol oynamaktadırlar [66-68].

Bir diğer EDHF de insan koroner arterinde önemli olduğunu gösterilen hidrojen peroksittir. H_2O_2 'nin mezenterik direnç damarlarında da anahtar rol oynadığını söyleyen yayınlar da mevcuttur [5]. Genelde, iletim arterlerinden küçük arterlere gidildikçe NO'nin vasküler tonusa katkısı azalırken EDHF'nin ki artmaktadır. EDHF üretimi ve NO düzeylerinin düzenlenmesi arasında bir etkileşim vardır. NO, sitokrom P450'nin hem grubuna bağlanarak bu enzimleri ve 12,15 EET'nin ürünlerini inhibe etmektedir. Süperoksit üretimi arttığında ise NO oksidatif olarak yıkılır ve NO biyoyararalanımı azalır. Artmış olan süperoksit, hidrojen peroksit'e dönüşür ve EDHF olarak görev yapar. Bu mekanizma aracılığıyla NO'nin azalması, kompensatuar olarak EDHF'nin artışına yol açar ve EDHF, küçük damarların gevşemesinde ön plana çıkar [41].

Prostasiklin. Prostasiklin (prostaglandin I_2 , PGI_2), COX 1 ve COX 2 aracılığıyla araşidonik asitten üretilirler. PGI_2 , endotelden salındığı keşfedilen ilk vazodilatör ajandır [5] ve endotelden salındıktan sonra damar düz kasında cAMP aracılığıyla gevşemeye yol açarlar. PGI_2 , vasküler homeostazisin sürdürülmesinde ve kan akımının kontrolünde esansiyel rol oynar [69]. Prostaglandinler, özellikle böbrekte vasküler tonusun kontrolünde önemli görevleri vardır [4]. Prostasiklinler, iskelet kaslarında kan akımı ve metabolik vazodilatasyonu düzenlemede büyük önemi vardır [4]. Prostasiklin sentezini uyaran agonistler arasında en güçlü uyaran bradikinin, bunun yanı sıra substans P, platelet kaynaklı büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü ve adenin nükleotidleridir [41].

Araşidonik Asitten Kaynaklanan Vazokonstriktörler. Endotelden daha çok prostasiklinler salınsa da hipertansiyon [70] gibi patolojik koşullarda vazokonstriktör aktiviteye sahip diğer prostaglandinler de üretebilebilir [41]. Prostaglandin H_2 (PGH_2) doğrudan COX1 ve COX2 ürünü iken, tromboksan ise PGH_2 'den tromboksan sentaz enzimiyle sentezlenir [71].

Diğer önemli vazokonstriktör ajan araşidonik asidin sitokrom P450 metabolizmasının ürünü olan 20 hidroksieikosatetraenoik asittir (20 HETE). Bu bileşik, kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarını inhibe ederek kasılmaya yol açar. 20 HETE sentezini, ANG II, endotelin, katekolaminler uyarırken NO inhibe eder [72].

Anjiyotensin II. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE), özellikle pulmoner damarların endotel hücrelerinde membrana bağlı olarak yer almaktadır [73]. ACE, ANG I'i ANG II'ye dönüştürmesinde ve bradikininin parçalanmasında görev almaktadır. Bunun yanında kardiyak ve vasküler hücreler renin anjiyotensin sisteminin tüm komponentlerini içerir [41] ve böylece ANG II'nin lokal olarak

üretilmesi damar fonksiyonları için de önemli olabilmektedir. ANG II'nin lokal üretimi, dolaşımdaki anjiyotensin veya renin düzeyleri yüksek olamadığı halde ACE inhibitörleri veya anjiyotensin reseptör antagonistlerinin neden etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Son dönemde yeni bir karboksipeptidaz olan ACE II'nin varlığı ortaya konmuştur [74]. Bu enzim ANG I veya ANG II'den 1 amino asit keserek, ANG II'yi azaltmak ve vazodilatör özellikte olan anjiyotensin 1-7 metabolitini arttırmaktadır. Bu bakımdan ACE ve ACE II arasındaki denge, ANG II düzeylerinin ve vazomotor tonusun kontrolünde önemlidir [75].

Endotelinler. Endotelinler (ET), aralarında endotel hücrelerinin de bulunduğu pek çok hücrede sentezlenip, salınırlar. ET, 18 amino asitten oluşan 3 izoformu vardır. ET, preproendotelin olarak sentez edilip, endotelin dönüştürücü enzim (ECE) aracılığıyla aktif ET'ye dönüştürülerek salınır. Preproendotelin sentezi, ANG II, LDL, hipoksi düşük kayma gerilimi ve inflamatuvar sitokinlerle uyarılır [76]. ET'ler, ET-A, ET-B ve ET-C reseptörleri aracılığıyla vasküler etkilerini gösterirler. ET-A reseptörü damar düz kasında daha fazlayken ET-B reseptörü endotel hücrelerinde bulunur. İlk aktive olduğunda güçlü vazokonstriksiyonu uyarmasına karşın ilerleyen süreçte NO salınımını uyararak etkisini azaltır [77]. Organizmada ET-1 konsantrasyonu arttığında hızla elemine edilmektedir. Özellikle pulmoner dolaşımdan ET-B reseptörü aracılığıyla geri alınmaktadır. Pulmoner dolaşımın dışında böbrek ve karaciğerinde ET-1'in eliminasyonun da katkısı vardır.

ET-1, kasıcı etkisini IP3 yolağı aracılığıyla gösterir [78]. Düşük konsantrasyonlarda, ANG II, serotonin, α -adrenerjik agonistler gibi protein kinaz C aracılıklı etki gösteren diğer vazokonstriktörleri de arttırır.

Kan basıncının ve bazal vasküler tonusun düzenlenmesinde ET-1'in de katkısı vardır. ET-1'e ait reseptörler bütün damar segmentlerinde bulunur ve ET-1 diğer ajanlara kıyasla 10 kat daha güçlü bir vazokonstriksiyon yapar [41]. Deney hayvanlarında sistemik olarak ET-1'e ait reseptörler bloke edilirse damarlarda vazodilatasyona ve kan basıncında %10-20 azalma görülür [41]. Benzer şekilde ECE enziminin inhibisyonu da normotansif insanlarda kan basıncının düşüşüne sebep olmuştur.

ET-1'in hedef organları arasında akciğer, böbrek ve kalp yer almaktadır. ET-1'in pulmoner dolaşıma etkisi tam anlaşılammıştır, fakat ET-1'in klirensi ve üretimi açısından oldukça önemlidir. Özellikle koroner damarlarda güçlü bir vazokonstriktördür ve etkisini ET-A reseptörü aracılığıyla gerçekleştirir. Bolus olarak uygulandığında miyokardiyal iskemiye hatta ventriküler aritmiye yol açabilmektedir. Böbrek dolaşımında da oldukça önemlidir. Afferent ve efferent arteriyolde vazokonstriksiyona neden olarak renal plazma akımını ve glomerüler filtrasyon hızını azaltır. Renal vazokonstriksiyon etkisini ET-A reseptörü aracılığıyla gerçekleştirir. ET-B reseptörü de idrarda sodyum atılımında önemlidir. ET-B reseptörü olmayan ratlarda tuza duyarlı hipertansiyon gelişebildiği gösterilmiştir.

Böylece ET-1, böbrekte iyon ve su homeostazisi açısından da önemli olabilmektedir [41].

2.4. Karbonmonoksit

2.4.1. Karbonmonoksidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

CO, tatsız, kokusuz, renksiz düşük molekül ağırlığına sahip diatomik bir gazdır ve CO'e ait fiziksel özellikler tablo 3.1'de belirtilmiştir [6]. CO, çevresel ve endüstriyel süreçte toksik bir yan ürün olarak üretilmektedir. NO'e göre CO, biyolojik sistemlerde daha stabildir ve eşleşmemiş elektronu da yoktur. Hemoglobine oksijenden 245 kez daha fazla affinitesi bulunmaktadır. Hem bağlanma bölgelerinde CO'in parsiyel işgali oksijen salınımını baskılar ve oksijen eğrisini sola kaydırır. CO'in oksijen taşıma kapasitesini azaltması doku hipoksisine yol açar.

Yirminci yüzyılın ortalarında, CO'idin endojen olarak üretildiği ve patofizyolojik koşullar altında CO'in üretiminin arttığı gösterilmiştir [6]. İnsan vücudunda CO'in günlük üretimi yaklaşık olarak 20 µM/saat'tir [6]. CO, uzun yıllar toksik, atık ve çevreyi kirleten gaz olarak bilinse de vücudumuzda üretilmesinin keşfedilmesiyle birlikte pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde önemli olduğu keşfedilmiştir.

Tablo 2.2: CO'in fiziksel özellikleri

Moleküler Ağırlık	28.01g
Kaynama noktası	-191.5
Erime noktası	-199
Özgül ağırlığı	0°C, 1 atm 1.250 g/L 25°C, 1 atm 1.145 g/L
Özgül ağırlığı	0°C, 1 atm 1.250 g/L 25°C, 1 atm 1.145 g/L
Havaya göre bağıl yoğunluğu	0.967
Sudaki çözünürlüğü	0°C 3.54 ml/100ml 20°C 2.32 ml/100ml 25°C 2.14 ml/100ml
Havadaki patlama sınırı	% 12.5-74.2
Çevirme faktörleri	0°C, 1 atm 1 mg/m ³ = 800 ppm 1 ppm= 1.250 mg/m ³ 25°C, 1 atm 1 mg/m ³ = 873 ppm 1 ppm= 1.145 mg/m ³

Ref:[6]

2.4.2. Endojen Karbonmonoksit Üretimi

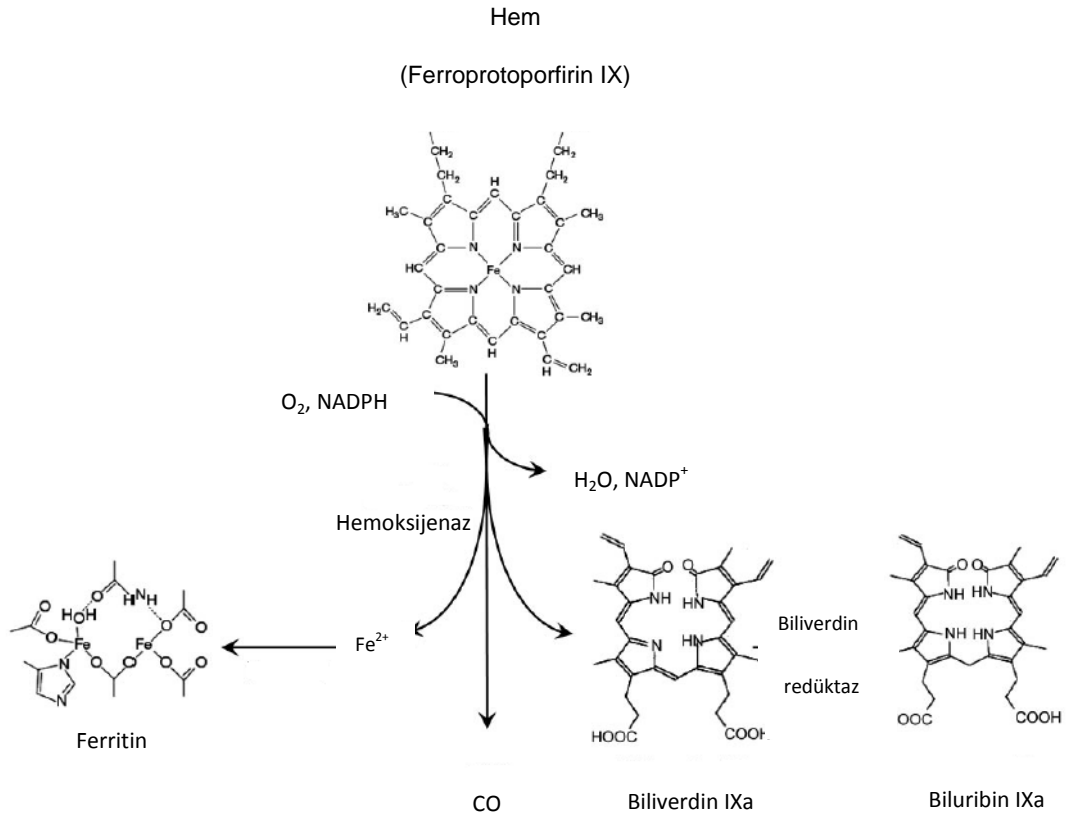
CO'idin geri dönüşümlü olarak hemoglobine bağlandığı ve doku hipoksisine neden olduğunu ilk olarak 1850'lerin başında Fransız fizyolog Claude Bernand farketmiş ve daha sonra 1912 yılında Douglas tarafından tanımlanmıştır [19]. 1895'de yapılan bir çalışmada CO'in hemoglobine bağlanması üzerinde, yüksek

parşiel oksijen basıncının antagonistik etkisi olduğu gösterilmiştir [79]. Endojen CO üretimine dair ilk bulgu 1898 yılında Saint-Martin ve Niclous tarafından ortaya atılmıştır. 1950'li yıllara gelindiğinde ise hemoglobinin dekompozisyonu sonucu insan vücudunda CO'nun varlığı deneysel kanıtlarla ispatlanmıştır [80].

CO'in temel biyolojik kaynağı (>%86) hem molekülünün, hemoksijenaz (HO) enzimiyle deşredasyonudur. Az bir kısmı da fotooksidasyon, lipid peroksidasyonu ve ksenobiyotik metabolizmalar sırasında oluşur [6].

CO'in non-enzimatik oluşumu. Hem molekülünün, metilen köprüleri kırılınca CO salınır. Sitokrom P450'in, NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) oksidasyonu ile inaktivasyonu, hem ve apoenzim arasındaki bağı kırılmasına dolayısıyla hem deşredasyonuna neden olur [81]. Non-enzimatik hem metabolizması bu şekilde meydana gelmesine rağmen, CO'nun çoğunluğu enzimatik hem metabolizması ile üretilir ve çoğunlukla retikuloendotelial sistemde gerçekleşir [18].

CO'in enzimatik oluşumu. İnsan kanında bulunan CO, oksijen taşıyıcı hemoglobinin deşredasyonundan kaynaklanır [82]. Endojen CO özellikle hem deşredasyonunda hız sınırlayıcı basamak olan mikrosomal hemoksijenaz enzimlerinin etkisiyle meydana gelmektedir [83]. Hemoksijenaz, heminin α -mezo karbon köprülerini kırarak biliverdin, demir ve CO oluşturur [82].



Şekil 2.5: Enzimatik CO oluşumu

2.4.3. Hemoksijenaz Enzimi

Tenhunen ve arkadaşlarının hem katabolizmasını tanımlamalarıyla 1968'de HO'nun keşfi gerçekleşmiştir [84]. Daha sonra enzimin üç farklı izoformu olduğu gösterilmiştir. Bunlardan HO-2 ve HO-3 yapısal olarak oluşur, HO-1 ise biyokimyasal veya biyofiziksel stresle indüklenebilir ve enzimin yaygın olarak bulunan izoformudur [85-86].

HO, hem molekülünün alfa ve meso karbon köprülerini kırar ve hemin biliverdine parçalanmasını sağlarken ortama CO, serbest Fe⁺² ve biliverdin salınır. HO, hemin oksidatif degradasyonunda hız sınırlayıcı faktördür. Reaksiyon sırasında üç molekül oksijen ve nikotinamid adenin dinükleotid-sitokrom p-450 redüktazdan (NADPH-sitokrom p-450 redüktaz) gelen elektronlar kullanılır [87-88]. Sonuç olarak reaksiyon sonunda bir molekül hemin CO, Fe⁺² ve biliverdine degradasyonu için üç molekül oksijen ve yedi adet elektron kullanılır. Biliverdin ise biliverdin redüktaz enzimi ile bilirubin IX α yapısına redüklenir [89]. Oluşan reaksiyon ürünlerinin birçok hücrel işlevi (antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik) olmasının yanında, HO lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikali oluşumunda etkili bir promoter molekül olan hemin ölümcül etkilerine karşı hücreyi korur [18, 82].

Hemoksijenazın, HO-1, HO-2 ve HO-3 olmak üzere üç formu bulunmaktadır. HO-1 uyarılabilir, HO-2 ve HO-3 ise yapısal formudur. HO-1 ve HO-2, sırasıyla 22g12 ve 16p13.3 kromozomlarda haritalanan genlerin ürünleridir, amino asit sekansları %40 oranında benzerdir. 24 amino asitlik hem katalitik bölgeleri HO-1 ve HO-2'nin her ikisinde de korunmuştur. HO-1 ve HO-2'nin hem degradasyonunun katalitik mekanizmaları benzer olmasına rağmen, enzimatik aktivitelerinin düzenlenmeleri farklı mekanizmalarla olmaktadır. HO-1 ve HO-2'nin her ikisi de membran bağımlı proteinlerdir. Karboksi ucundaki hidrofobik kuyruğuyla endoplazmik retikulum membranına demirlenmiştir. Diğer hücrelerin çoğunda olduğu gibi serebral damarların endotel hücrelerinde de HO-1 ve HO-2, benzer intraselüler lokalizasyona sahiptir. HO-2, büyük iletkenliğe sahip BK_{Ca} ile birlikte yer alır ki bu birliktelik fonksiyonel olarak önemlidir. Çünkü CO, BK_{Ca}'yı aktive ederek vazodilatasyona neden olur. Pulmoner arter endotel hücrelerinde, HO-1 plazma membranında kaveolada yer alır ve kaveolin HO-1'e bağlandığında kendi aktivitesini düzenler [90]. Enzimin HO-3 olarak adlandırılan fakat hakkında çok fazla bilgi olmayan üçüncü bir izoformu da tanımlanmıştır. HO-3, HO-2 amino asit yapısıyla benzerlik gösterir fakat hem katalizminde daha az etkin olmakla beraber hem bağımlı genlerin düzenleyicisi olarak ta görev yapar [86, 91] ve beyin, karaciğer, böbrek, dalakta eksprese olmaktadır [86].

HO-1, hemoksijenaz izoenzimlerinin uyarılabilir formudur. Bazal koşullar altında vücudumuzda toksik hemin elemine edildiği ve kırmızı kan hücrelerinin yıkıldığı karaciğer ve dalakta eksprese edilir. Kimyasal veya fiziksel bir uyarıya karşı damar dokusunun da yer aldığı pek çok dokuda uyarılabilir. HO-1 bir erken cevap genidir, stres, antioksidan response elementler [9, 92], nükleer faktör κ B [93] ve cAMP response element [94] aracılığıyla uyarılmaktadır. HO-1'in spesifik uyarınları arasında hem, NO, ROS, okside lipidler, metalloporfirinler ile demir ve kobalt gibi metaller yer almaktadır [94-99].

HO-2 izoenzimlerin yapısal formudur, ekspresyonu baskın olarak beyin ve testiste bulunur. Ayrıca damarlar, merkezi sinir sistemi, karaciğer, böbrekler ve gastrointestinal sistemde de yüksek miktarda HO-2 eksprese edilmektedir. Glutamat ile uyarım, hipoksi ve hipotansiyon gibi fizyolojik veya patofizyolojik koşullar HO-2'nin ekspresyonunu değiştirmeden, HO-2 aktivitesini arttırmaktadır.

2.4.4. Karbonmonoksit Üretiminin Kontrolü

Endojen olarak CO, NADPH'ın oksidasyonu ve HO enzimi aracılığıyla hem'in yıkımı sonucunda demir ve biliverdinle birlikte üretilmektedir.

HO-2 geni transkripsiyonel modifikasyonlara duyarsızdır ve sadece genin prometer bölgesinde bulunan glikokortikoid response element aracılığıyla adrenal glikokortikoid hormonlarla uyarılabilir. Uzun süren kortikostreoid tedavisi uygulanması sonucu çeşitli deney hayvanlarının nöronlarında HO-2 seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Transkripsiyonel modifikasyonlara duyarsız olmasına karşın akut olarak, posttranslasyonel modifikasyonlarla HO-2 enziminin aktivasyonunu ve endojen CO miktarını artırılabilir. HO-2'nin posttranslasyonel aktivasyonu, kalsiyum kalmodulin bağımlı [100] ve protein fosforilasyonu aracılığıyla olmaktadır [100-102]. Serebral damarlarda ve endotel hücrelerinde, HO-2 aktivasyonu, glutamat, iGluR agonistleri aracılığıyla ve kalsiyum kalmodulin bağımlı mekanizmalarla gerçekleşmektedir [101-102].

NO de HO-2 aktivitesinde dual bir etkiye sahiptir. NO, HO-2 üzerinde yer alan hem düzenleyici motife bağlanarak HO-2 aktivitesini inhibe ederken [103] diğer taraftan cGMP bağımlı mekanizmalarla da serebral küçük damarlarda HO-2'nin katalitik aktivitesini arttırmaktadır [101]. Benzer olarak izole kalp ve aortik endotel hücrelerinde NO, CO üretimini uyarmaktadır [104-105]. Böylece NO, HO-2'nin katalitik aktivitesinin doğrudan olarak inhibe ederken cGMP'yi arttırarak da dolaylı olarak uyarmaktadır.

Hem substratlarının kullanımını arttıran faktörler serebral damarlarda CO üretimini arttırır, bu da HO-2 aktivitesinin substrat bağımlı olduğunun göstergesidir [102, 106]. Böylece hücrel hem üretiminin düzenlenmesi, CO üretiminin düzenlenmesinde yer alabilir. Hücrel hem üretimi, mitokondriyal ve sitoplazmik reaksiyonların her ikisini de içeren çok basamaklı işlemdir. Hız sınırlayıcı basamak, süksinil CoA'dan δ -aminolevulinik asidin sentezi ve δ -aminolevulinik asitle katalizlenen glisindir [104, 107]. δ -aminolevulinik asit sentaz aktivitesi, hem ve okside hemin negatif geri bildirim inhibisyonu aracılığıyla kontrol edilmektedir. Sağlam küçük serebral damarlarda; intraselüler kalsiyum konsantrasyonunun artışı, PKC aktivitesinin artışına bağlı hem kullanımını ve CO üretimini arttırmaktadır [107-108].

Son bulgular HO-2 aktivitesinin redoks bağımlı mekanizmalarla da düzenlendiğini göstermektedir. İzole edilen serebral damarlarda ve serebral damarların endotel hücrelerinde TNF- α , ROS aracılı mekanizmalarla HO-2'yi aktive eder ve ROS'un major kaynağı da NADPH oksidaz 4'tür [109]. ROS, HO-2

aktivitesini HO-2 proteinine hem substratının bağlanmasını kontrol eden tiyol/disülfid redoks moleküler anahtarlarıyla modüle eder [110].

2.4.5. Karbonmonoksitin Fonksiyonları

CO, uzun yıllardan beri hem metabolizması sonucu oluşan yararsız, toksik bir ara ürün olarak tanımlanmıştır. Oysaki CO hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan önemli bir moleküldür. CO'nun fonksiyonları aşağıda özetlenmiştir.

CO'nun anti-inflamatuar etkisi. Sepsis hayvan modelleri ve hücre kültürü çalışmalarında HO-1 kaynaklı veya ekzojen CO'nun anti-inflamatuar etkili olduğu gösterilmiştir [111]. Fizyolojik olarak vücut sıvısındaki CO konsantrasyonu 100 ile 500 ppm arasında değişiklik göstermektedir. Bu konsantrasyon dağılımında CO makrofajlardan kaynaklanan TNF- α , makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF), interlökin-1 [111] ve aktive olmuş T hücrelerinden salınan interlökin-2 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını engeller [112]. Ayrıca CO anti-inflamatuar sitokin olan interlökin-10'nun sentezini uyarır. CO'nun anti-inflamatuar etkisi, cGMP'den bağımsız olarak p38 kinaz aracılıdır [111].

CO'nun anti-apoptotik etkisi. CO'nun olası antiapoptotik etkisi ilk kez in vitro olarak gösterilmiştir. Hücre kültürlerine ekzojen olarak CO uygulanması, fare endotel hücrelerinde [113] ve fibroblastlarında [114] tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ile başlatılan apoptozisi engellemiştir. Benzer anti-apoptotik etki HO-1 ekspresyonunda artış ile de gözlenmiştir [114]. Düşük konsantrasyonlarda ekzojen olarak CO uygulanması, pulmoner arter endotel hücre kültürlerinde iskemi ve reperfüzyonla uyarılan apoptozisi engeller [115]. Endotel hücrelerde, MAPK yolağının selektif kimyasal inhibitörü kullanılarak TNF- α ile uyarılan apoptozis üzerine CO'nun inhibitör etkisinin kalkması, p38 MAPK sinyal yolağının kullanıldığını göstermektedir [113]. Ayrıca HO-1 veya CO'nun TNF- α aracılı endotel hücre apoptozundan hücreyi korumak için, NF κ B bağımlı anti-apoptotik genler (c-IAP2 ve A1) ile birlikte çalıştığını gösteren araştırmalar mevcuttur [116].

CO'nun anti-proliferatif etkisi. CO'nun hücre proliferasyonundaki inhibitör etkisini ilk kez ortaya koyan Morita ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada, hipoksik koşullarda CO veya HO-1 kullanılarak düz kas hücre proliferasyonunun regüle edildiğini göstermişlerdir [117-118]. Hipoksi ile uyarılan HO-1 ekspresyonundaki artış sonucunda vasküler düz kas hücrelerinden endojen olarak üretilen ve salınan CO, hücre kültüründe endotel hücrelerin endojen cGMP üretimini arttırmıştır. Bu modelde vasküler düz kas proliferasyonunun CO ile baskılanması, ET-1 ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi endotel mitojenlerin ekspresyonunun cGMP bağımlı down-regülasyonu ile ilişkilidir [117].

CO'nun kanser hücreleri, T hücreleri, vasküler düz kas hücreleri gibi birçok hücre tipinde hücre proliferasyonunu engellediği de gösterilmiştir. Gen transferiyle ekzojen HO-1 uygulaması veya ekzojen CO uygulaması vasküler düz kas proliferasyonunu sadece cGMP üretimi ile değil, aynı zamanda G1-siklin bağımlı protein kinaz inhibitörü p21^{cip1} ve p38 MAPK aktivasyonu ile Go/G1'de durdurarak

yapmaktadır [16, 119-120]. Ayrıca, CO'nun ERK1/2 üzerinde baskılayıcı etki göstermesi anti-proliferatif etkiye katkıda bulunabileceğini göstermektedir [121].

CO'nun nörotransmisyonel etkisi. Olfaktör sinyal iletimi, uzun süreli güçlenme (LTP, long-term potentiation), nonadrenerjik nonkolinerlik (NANC) bağımlı kas gevşemesi, sirkadyan ritmin kolinerjik regülasyonu, kardiyovasküler fonksiyonların otonomik regülasyonu gibi birçok nörolojik süreçte CO bir sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır [19].

CO'nun LTP süresince postsinaptik ve presinaptik nöronların arasında retrograd haberci olarak görev yaptığı bilinmektedir [122]. Özellikle hipokampusun CA1 bölgesinde CO'nun retrograd bir haberci olduğu, bunun yanında presinaptik sGC'yi doğrudan aktifleyen bir molekül olarak da davrandığı belirtilmektedir [123].

Kan Basıncının Düzenlenmesi. CO, vasküler tonusa ve merkezi sinir sistemine etki ederek kan basıncını düzenlemektedir. Vasküler tonusa olan etkisini bir sonraki başlık altında ayrıntılı bir şekilde incelenecektir.

Endojen CO'idin merkezi sinir sistemine etkisine bakılırsa; hemoksijenaz inhibitörü olan zink döteroporfirin 2,4 bis etilen glikol (ZnDPBG)'nin sistemik olarak uygulanması beyinde HO aktivitesini bloke eder ve sempatik çıkışı artırarak, kan basıncını yükselttiği görülür. ZnDPBG'nin nükleus traktus solitarius (NTS) direk enjeksiyonunda kan basıncını artırır ve NTS içine CO'idin ipsilateral mikroenjeksiyonu artmış kan basıncını geri döndürür. Bu bulgular, NTS'de endojen CO üretimi, sempatik sinir sisteminin etkisini baskılayarak kan basıncının normal tutulmasına yardım ettiğini göstermektedir [6].

HO-1/CO sistemi kan basıncının düzenlenmesinde anahtar role sahip olduğu ve hipertansiyon patogenezinin bağlantılı yollarında ilişkisi olduğunu gösteren bulgular vardır. Kan basıncının düzenlenmesinde HO-1'in rolü farklı hayvan modellerinde ve deneysel modellerde değişiklik gösterir [6]. HO-1'in farmakolojik uyarılması veya HO substratlarının verilmesi spontan hipertansif ratlar (SHR)'da kan basıncında düşmeye yol açmaktadır. Biliverdin uygulanması sistemik kan basıncını anlamlı olarak değiştirmede için HO-1'in antihipertansif etkisinin CO aracılı olduğunu göstermektedir [6]. HO-1/CO sisteminin yararlı rolleri, ANG II ile uyarılan hipertansiyon modellerinde ve bir böbrek bir klip hayvan modelinde de gösterilmiştir.

2.4.6. Karbonmonoksidin Vasküler Tonusa Etkisi

CO'in damar tonusunun düzenlenmesinde etkileri olduğunu gösteren birçok araştırma vardır. Aorta başta olmak üzere birçok arterlerde CO'in damar tonusuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir [26, 124].

Ekzojen olarak uygulanan CO'in, fenilefrin (Phe) ile önceden kasılmış olan sıçan kuyruk arterinde gevşeme yaptığı ilk gösterilen bulgudur [26]. CO'in neden

olduğu vazodilatasyon için sağlam endotel gerekli değildir. Diğer yandan CO yapımının engellenmesi vasküler kontraktileti artırılmaktadır [26]. CO'nun birçok damar dokusunda vazodilatasyona sebep olduğu bilinmektedir, bu sonuçlar Tablo 3.2.'de gösterilmiştir [124].

Düşük konsantrasyonlar da CO uygulaması internal depolardan NO salınımına neden olarak da vazodilatör etki gösterebilmektedir [26]. Ayrıca endojen NO üretiminin azaldığı durumlarda endojen vazodilatör olarak da görev yapabilmektedir, bu açıdan NO için bir yedekleme molekülü olduğu ileri sürülmektedir [14].

Tablo 2.3. CO'nun farklı tür hayvanlarda vasküler etkileri

Doku	Tür	CO kaynağı	Vasküler etki
Aort	Tavşan	Ekzojen	Gevşeme
Aort	Sıçan	Ekzojen	Gevşeme
Basillar ve orta serebral arter	Köpek, tavşan	Ekzojen	Etkisiz
Karotid, Koroner ve femoral arter	Köpek	Ekzojen	Gevşeme
Koroner arter	Sıçan	Ekzojen	Gevşeme
Koroner arter	Domuz	Ekzojen	Gevşeme
Koroner arter	Domuz	Ekzojen	Gevşeme
Koroner arter ve ven	Domuz	Ekzojen	Gevşeme
Grasilis kası arteri	Sıçan	Endojen ve Ekzojen	Kasılma ?
Hepatik arter	Sıçan	Ekzojen	Etkisiz
Hepatik ven	Sıçan	Ekzojen	Gevşeme
Mezenterik arter	Domuz	Ekzojen	Gevşeme
Pial arteriyol	Domuz	Endojen ve Ekzojen	Gevşeme
Pulmoner arter	Tavşan	Ekzojen	Gevşeme
Pulmoner arter ve ven	Domuz	Ekzojen	Gevşeme
Renal arter	Sıçan	Ekzojen	Gevşeme
Kuyruk arteri	Sıçan	Ekzojen	Gevşeme

Ref:[21]

CO'nun vazodilatör etkilerinin yanı sıra, düz kas hücrelerinden CO salınımının vazokonstiktör ET-1 ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) üretimini engellediği gösterilmiştir [117]. Böylelikle bu inhibisyon CO'nun vasküler tonus üzerindeki etkilerine katkıda bulunmaktadır.

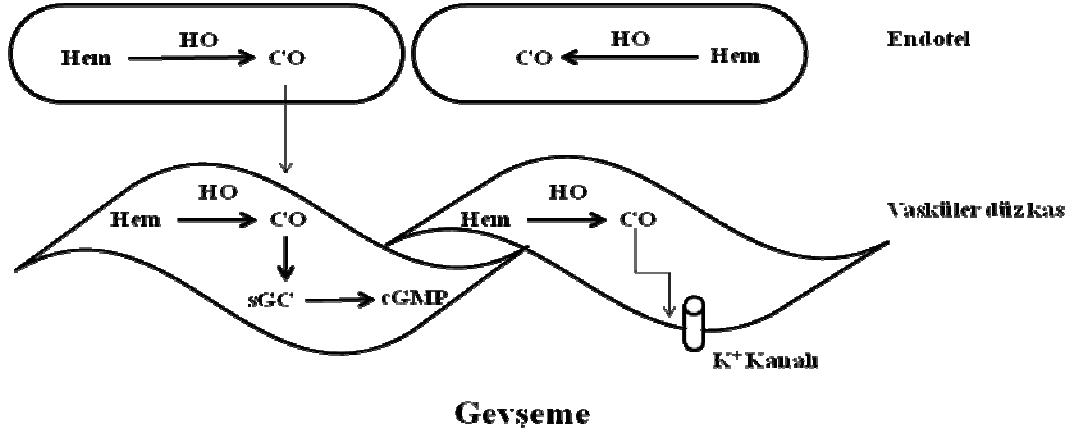
2.4.6.1. Karbonmonoksit Aracılı Vazodilatasyon Mekanizmaları

CO, vazodilatör etkisini cGMP ve BK_{Ca} kanallarını uyararak gerçekleştirilmektedir. Öncelikle BK_{Ca} kanallarını inceleyecek olursak eğer; arter ve arteyollerin damar düz kasında bulunan BK_{Ca} kanalları CO ile aktive olarak vazodilatasyona neden olur. Damar düz kas hücrelerinde bulunan BK_{Ca} kanalları por oluşturan α 1 alt ünitesi ve birlikte ekprese olduğu ve bu kanalın uyarılmasında görevi olmayan β alt ünitesinden oluşur [90, 125]. NO ve CO, BK_{Ca} kanallarının farklı alt ünitelerini uyarır. CO, BK_{Ca} kanallarının α alt ünitesini aktive eder ki mekanizması

henüz tam olarak çözülmemiştir. Fakat önerilen bir takım mekanizmalar vardır. Bunlar; 1) CO doğrudan BK_{Ca} kanallarının dışındaki histidin rezidülerine bağlanır [126] 2) CO, BK_{Ca} kanallarının hem bağlama alanında bulunan redükte heme bağlanır [127] 3) K⁺ tip 1 alanı için iletkenlik regülatöründe ki yüksek affinite divalent katyon sensöründe bulunan His/Asp rezidüsüne bağlanır [125] ve 4) BK_{Ca} kanallarının karboksil terminalindeki sistein 911'in rolü tanımlanmamıştır [128]. Fizyolojik koşullar altında CO, doğrudan amino aside bağlanamamaktadır ve bunu gösteren direk deneysel bir kanıt yoktur yada bağlandığını destekleyen kimyasal mekanizma da yoktur. Tek bir mekanizma var şöyle ki; CO, BK_{Ca} kanallarında bulunan heme bağlanır [129], [127]. Hücresel hem, indirgenmiş durumda üretilir ve lipid bilayer içinde hidrofobiktir [130]. Hemin 612-616 aminoasitleri arasında bulunan α alt ünitesinin hem bağlanma domainine bağlanması BK_{Ca} kanallarını inhibe eder [131-132]. Fizyolojik voltaj ve kalsiyum konsantrasyonunun da; hemin konsantrasyonu yaklaşık 5nM olduğunda arteriyel düz kas hücrelerindeki BK_{Ca} kanalının hem bağlama bölgesi için hemin afinitesi, yüksektir [132]. Bundan dolayı BK_{Ca} kanalı fonksiyonel hem proteindir. CO, kanala bağlı indirgenmiş heme bağlanınca kanalda hemle ilişkili değişiklikler yaparak kanalın aktivasyonuna yol açar [132]. Böylece BK_{Ca} kanalına bağlı hem, CO için reseptördür ve CO'ün bağlanması BK_{Ca} kanalının Ca⁺⁺ duyarlılığını artırır [132-133]. HO ve BK_{Ca} kanalları membranda birlikte yer alırlar ve HO-2 hem bağlanma bölgesiyle doğrudan ilişkide olabilir [110, 134]. Muhtemelen, HO-1 ve HO-2 sadece BK_{Ca} kanal aktivatörü olan CO'ü üretmeyebilir, aynı zamanda CO'ü üretmek için membranla ilişkili inhibitör hemi de indirgeyebilir.

Arteriyel düz kas hücrelerinde, BK_{Ca} kanalları, mikromolar düzeyde kalsiyum konsantrasyonuna duyarlıdır [135],[133, 136]. Lokal kısa süreli kalsiyum sparkları BK_{Ca} kanalını aktive eder [137]. Tek kalsiyum sparkı pek çok BK_{Ca} kanalını aktive eder. Arteriyel duvarda geçici potasyum akımı membran hiperpolarizasyonunu uyarır, voltaj bağımlı Ca⁺⁺ kanal aktivitesi azalır, Ca⁺⁺ global konsantrasyonunda azalmaya yol açar ve vazodilatasyon olur. Böylece CO, muhtemelen Ca⁺⁺ sparks frekansını yükselterek BK_{Ca} kanallarının aktivitesini arttırmaktadır.

CO'ün vasküler tonusta etkili olduğu diğer bir mekanizma da sGC'ı aktive ederek cGMP artışı aracılığıyla oluşan gevşemedir [138-139]. CO, cGMP aktivasyonunda NO'e kıyasla daha az etkilidir [140-142]. CO veya CO donörleri, aralarında pulmoner arter, aort, böbrek damarlarının da yer aldığı pek çok damar dokusunda [16, 143-145] cGMP'yi artırarak vazodilatasyona yol açmaktadır. Bununla birlikte, literatürde cGMP ile ilgili farklı görüşlerin yer aldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda CO'ün etki mekanizmasında yer alan sGC'ın etkili olabilmesi için BK_{Ca} kanallarının gerekli olduğu ileri sürülmektedir [27]. BK_{Ca} kanalları inhibisyonu ile CO'ün cGMP bağımlı gevşetici etkisinin de önüne geçilebilmektedir [13, 132, 146-148].



Şekil 2.6: Vasküler düz kasta CO'nun etki mekanizması

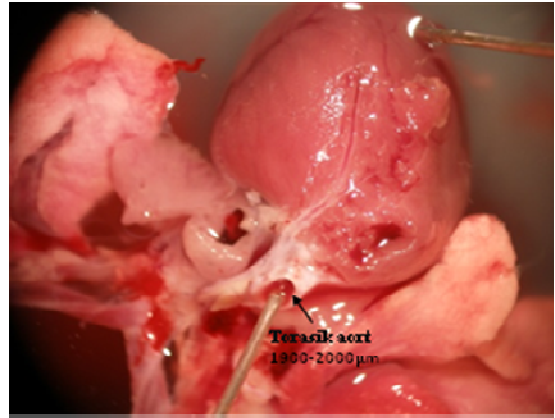
GEREÇ VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilen bu çalışmada 6-8 aylık, erişkin, Wistar cinsi toplam 100 adet erkek sıçan kullanıldı. Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesinden temin edilen sıçanlar, sıcaklığı $23 \pm 2^\circ\text{C}$ olan ve 12 saat gün ışığı - 12 saat karanlık periyodu uygulanan bir odada tutuldu ve kısıtlamaksızın (*ad libitum*) ticari sıçan yemi ile su tüketimine bırakıldılar.

3.1. Hayvanların Feda Edilmesi ve Damarların İzolasyonu:

Projemizde CO'in farklı organların damar yataklarında ve farklı büyüklükteki damar segmentlerinde vasküler tonuse katkı düzeyini ortaya koymayı ve HO enzim düzeylerini saptamayı amaçladık. Bu amaç doğrultusunda eter anestezi altında feda edilen hayvanların damarları aşağıda belirtildiği gibi izole edildi.

Torasik aorta (n=10): Trakea, kalp ve akciğerlerle birlikte aortun diyaframa kadar olan kısmı alındı. İzolasyon sırasında aort sistemden kesilerek diseke edildi. Sonrasında organ banyosuna asıldı veya Western blot analizi için -80° 'de saklandı.

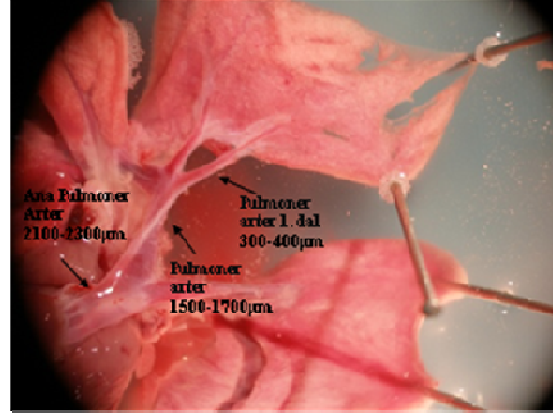


Abdominal aorta (n=10): Aortun diyaframdan sonra, femoral arterlere ayrıldığı yere kadar olan kısmı ayrıca alındı ve diseke edilerek organ banyosuna asıldı veya Western blot analizi için -80° 'de saklandı.



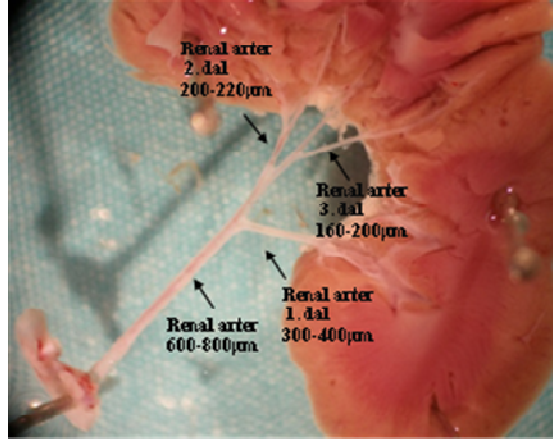
Pulmoner damar yatağı (n=10):

Pulmoner damar yatağında ana pulmoner arter, pulmoner arter ve pulmoner arterin 1. dalı çalışıldı. Trakea ile birlikte kalp ve akciğerler kesilerek soğuk krebs solüsyonunun içerisine alındı. Kalp ve akciğerler petriye iğne ile sabitlendi. Kalpten çıkan ana pulmoner arter bulunduktan sonra, akciğerlere doğru diseke edildi. Ana pulmoner arterin dalları olan sağ ve sol pulmoner arter ayrıca, akciğer loblarının içerisine doğru dallanan damarlar izole edildi. Bütün pulmoner arter yatağı izole edildikten sonra en uçtan başlayarak pulmoner arterin 1. dalı kesilerek miyografa, pulmoner arter ve son olarak ana pulmoner arter kesilerek organ banyosuna asıldı veya Western blot analizi için -80'de saklandı.

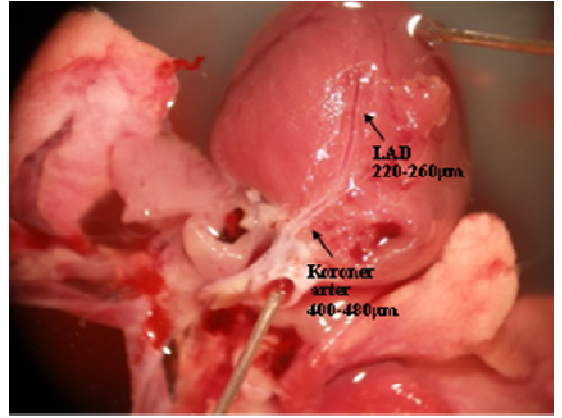


Böbrek damar yatağı (n=10):

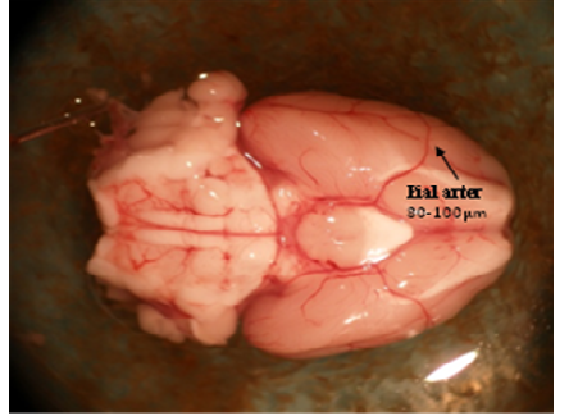
Böbrek damar yatağında renal arter, renal arterin 1, 2, ve 3. dalları çalışıldı. Renal arterle birlikte çıkarılan böbrekler dış bükeyden içeri doğru renal arterin bağlantısını kesmeden ortadan ikiye bistiği ile kesilip, petriye sabitlendi. Renal arterden başlayarak renal arterin 3. dalına kadar dallanmalar dikkate alınıp, diseke edildi. Böbreğe ait damar ağacı çıkarıldıktan sonra renal arterden başlayıp 1, 2 ve 3. damar segmentleri kesildi ve sonrasında miyograf düzeneğine asıldı veya Western blot analizi için -80'de saklandı.



Koroner damar yatağı (n=10): Koroner damar yatağında, koroner arter ve sol ön inen arter (LAD) çalışıldı. Torasik aorttan diseksiyona başlandı ve ana pulmoner arter kenara alındıktan sonra aortun diseksiyonuna devam edildi. Aortun kalpten çıktığı noktadan itibaren sol koroner arter izole edildi. Diseksiyona devam edilerek, koroner arterin dallarından biri olan LAD'nin trasesi kalp dokusunun sonuna kadar izole edilip, sırayla LAD ve koroner arterler çıkartılarak, miyograf düzeneğine asıldı veya Western blot analizi için -80'de saklandı.

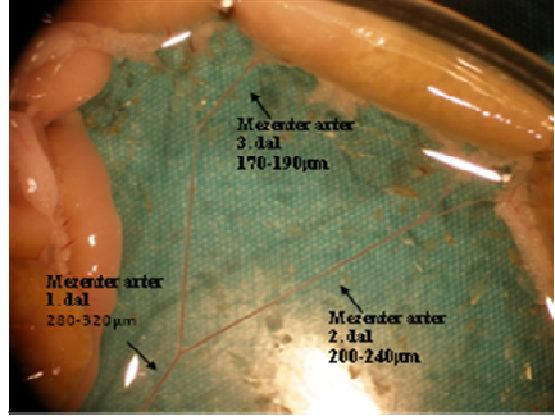


Pial arter (n=10): Beyine ulaşmak için boyun, servikal kısımdan diseke edilip kafatası kemikleri açıldı. Daha sonra beyin penset yardımıyla soğuk krebs içerisine alındı. Beyin petriye sabitlendikten sonra pial arter izole edilerek miyograf düzeneğine asıldı veya Western blot analizi için -80'de saklandı.



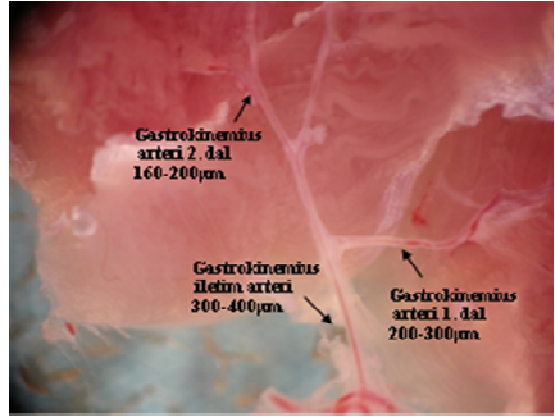
Mezenterik damar yatağı (n=10):

Mezenter damar yatağında ana mezenter arter ve mezenter arterin 1, 2 ve 3. dalları çalışıldı sıçan abdominal kısmından açıldıktan sonra ana mezenter arter saptanarak sabitlenip, abdominal aort kesilerek kanı boşaltıldı. Mezenter arter hızlıca izole edilerek, soğuk krebe alındı. Sonrasında mezenter damar yatağı bağlı bulunduğu barsak segmenti ile birlikte soğuk krebe alınıp, sabitlendi. Mezenter arter 1, 2 ve 3. dalları izole edilerek, miyograf düzeneğine asıldı veya Western blot analizi için -80'de saklandı.



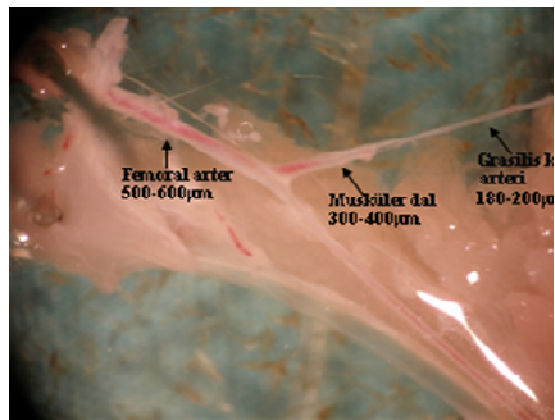
Gastrokinemius kasına ait damar yatakları (n=10):

Gastrokinemius kasına ait iletim, 1 ve 2. damar segmentleri çalışıldı. Denekler feda edildikten sonra gastrokinemius kası soğuk krebe solüsyonuna alındı. Gastrokinemius kası iki yaprak şeklinde petriye sabitlenip, iletim tipi arterten başlayarak sırayla 1 ve 2. dalı izole edildi. Sonrasında miyograf düzeneğine asıldı veya western blot analizi için -80'de saklandı.



Gracilis kası arteri (n = 10):

Femoral arterle birlikte gracilis kası petriye sabitlendi. Femoral arterin dallandığı noktada musküler dalı diseke edildi ve musküler arterin devamında da gracilis kası damarı izole edildi. Sonrasında miyograf düzeneğine asıldı veya western blot analizi için -80'de saklandı.



3.2. Organ Banyosu ve Telli Miyograf Çalışması

İzole edilen damarlar Tablo 4.1.'de de gösterildiği gibi organ banyosu veya telli miyografda çalışıldılar.

Organ Banyosu Çalışması: Büyük damarlara (torasik aorta, abdominal aort, ana pulmoner ve pulmoner arter) ait damar halkaları izole edilip, 2 mm uzunluğunda kesildikten sonra % 95 O₂, % 5 CO₂ içeren gaz karışımı ile gazlandırılmış, 37°C'de pH'sı 7,4 olan 20 ml krebs solüsyonu içeren organ banyosuna alındı. Damar halkaları çelik tellere asılarak gergin bir ip aracılığıyla izometrik transdüsere (FDT 1 A-10 MAY, Ankara, Türkiye) bağlandı ve daha önceden belirlenen 1 gram istirahat gerilimi altında, her 15 dakikada bir yıkanarak 60 dakika boyunca dinlendirildi. Daha sonra aşağıda telli miyograf çalışmasıyla ortak olan protokollerin uygulanmasına geçildi.

Telli Miyograf Çalışması: Diseksiyon mikroskopunda izole edilen direnç damarları (basillar arter, posterior serebral arter, renal arterin 1, 2 ve 3. dalı, mezenter arterin 1, 2 ve 3. dalı, gastrokinemius 1 ve 2. dalı, grasilis, koroner arter, LAD) ve bazı iletim tipi arterler (renal arter, femoral arter, ana mezenter arter, pulmoner arterin 1. dalı, gastrokinemius iletim arteri), boyları 2 mm olacak şekilde kesildi. Daha sonra damar segmentleri, içerisinde 37°C'lik Krebs solüsyonu bulunan miyograf (Model 620M, Danish Myo Technology, Aarhus N, Danimarka) düzeneğine konuldu. 25 µm çapındaki tungsten telin bir ucu bu düzeneğe vidalanarak sabitlendi. Tel ince uçlu iki forseps yardımıyla herhangi bir hasar vermeksizin damarın içinden geçirildi. Özellikle telin damar lümeni içinden geçişi sırasında endotel tabakasına zarar vermemesine dikkat edildi. Telin serbest kalan ucu da vidalanıp sabitlendikten sonra ikinci bir tel damara zarar vermeden tek seferde damar lümeni boyunca ilerletildi ve ikinci telin her iki ucu da kuvvet transdüserine, mekanik kuvvet uygulanmadan dimetrik düzeneğe vidalanarak sabitlendi. Miyograf haznesi tüm çalışma protokolleri boyunca %5 CO₂ - %95 O₂ içeren gaz karışımıyla gazlandırıldı.

Damar segmenti bazal duvar gerimi hesaplanmadan önce 15 dakika boyunca organ banyosunda dinlendirildi. Mikroskop yardımıyla mikrometrik ölçüm skalası kullanılarak her damarın boyutu ölçüldü. İki tel arasında belli dış damar çapı değerlerinde, damar duvarının oluşturduğu gerim kuvveti saptanarak bilgisayar yazılımı yardımıyla (LabChart Pro V7, Adinstruments, Bella Vista, Avusturalya) çap-gerim grafiği çizdirildi. Bazal damar gerimini belirlemek için, *in vivo* şartlarda 90 mmHg kan basıncı değerinde oluşan gerim yazılımla otomatik olarak hesaplandı. Sıcaklığı 37°C'de sabit tutulan banyo solüsyonu 15 dakikada bir değiştirilerek her damar preparasyonu o örnek için saptanan bazal gerimde bir saat boyunca dinlenmeye bırakıldı.

Bir saatlik dinlenme periyodu sonrasında organ banyosunda asılı büyük damar halkaları ve telli miyograf sistemine asılı direnç damarları ve iletim damarları için ortak deney protokolü izlendi.

Tablo 3.1: Çalışılan Damar Yatakaları

Damar İsmi	Damar Çapı	Düzenek
Torasik Aort	1900-2000 µm	Organ Banyosu
Abdominal Aort	1000-1400 µm	Organ Banyosu
Ana Pulmoner Arter	2100-2300µm	Organ Banyosu
Pulmoner Arter	1500-1700 µm	Organ Banyosu
Pulmoner Arter I. Dal	300-400 µm	Miyograf
Renal Arter	600-800 µm	Miyograf
Renal Arter I. Dal	300-400 µm	Miyograf
Renal Arter II. Dal	200-220 µm	Miyograf
Renal Arter III. Dal	160-200 µm	Miyograf
Koroner Arter	400-480 µm	Miyograf
LAD	220-260 µm	Miyograf
Ana Mezenter Arter	800-1000 µm	Miyograf
Mezenter Arter I. Dal	280-320 µm	Miyograf
Mezenter Arter II. Dal	200-240 µm	Miyograf
Mezenter Arter III. Dal	170-190 µm	Miyograf
Gastrokinemius İletim Arteri	300-400 µm	Miyograf
Gastrokinemius Arter I. Dal	200-300 µm	Miyograf
Gastrokinemius Arter II. Dal	160-200 µm	Miyograf
Femoral Arter	500-600 µm	Miyograf
Musküler Dal	300-400 µm	Miyograf
Grasilis Kas arteri	180-200 µm	Miyograf
Pial Arter	80-100 µm	Miyograf

Ortak Deney Protokolü: 1 saatlik dinlenme periyodu ardından damarlar için bir ön-uyarılma sayılan vitalizasyon aşamasına geçildi. Bu işlem için 20 mM KCl içeren Krebs solüsyonuna, ayrıca 10^{-7} M konsantrasyon da Phe ilave edildi. Bu işlem üç sefer tekrarlandı ve damarlar her uygulamadan sonra normal Krebs solüsyonuyla yıkandı. Vitalizasyon aşamasından sonra 30 dk dinlenmeleri sağlandı.

Dinlenme periyodunu takiben damar lümeninin iç yüzünü döşeyen endotel tabakasının sağlıklı olup olmadığı araştırıldı. 10^{-6} M Phe ile kastırılan damara aynı konsantrasyonda asetilkolin (Sigma A6625, St. Louis, USA) uygulanarak, gevşeme cevabının yüzde olarak büyüklüğü saptandı. % 60 ve üzerinde gevşeme cevabı veren damarlar endotel pozitif olarak değerlendirildi. % 60'ın altında gevşeme yanıtı veren damarlar ise deney protokolüne alınmadı (çalışmamızda kullandığımız damarların hepsi % 70 ile % 90 arasında gevşeme gösterdiler).

Deney protokolünün bundan sonraki her aşaması banyo solüsyonuna eklenen spesifik olmayan NOS inhibitörü L-NAME (1 mM, Sigma N5751, St. Louis, USA) varlığında değerlendirildi. Bu CO çalışmalarında ortamdan NO uzaklaştırılarak, yalnızca CO'nun etkisini gözlemlemek için yapılan rutin bir uygulamadır. Bu aşamaya kadar aynı işlemlere maruz kalan damarlar için bundan sonra aşağıda tarif edilen protokoller uygulandı. Birbirini takip eden uygulamaların aralarında 30 dk dinlenme periyodu bırakıldı.

Endojen CO yanıtları. Damarların kümülatif olarak 10^{-9} – 3×10^{-5} M dozda Phe'e (Sigma P6126) karşı kasılma yanıtları kaydedildi. Daha sonra damarlar 30 dakika boyunca HO inhibitörü chromium mesoporphyrin (CrMP; 30 µM, Frontier

CrMP459, Utah, USA) ile inkübe edildikten sonra Phe doz yanıtları tekrar alındı. Koroner arter, LAD, pial arter ve pulmoner arter damar yatağında kasıcı ajan olarak Phe yerine aynı dozlarda seratonin (Ser) kullanıldı. CrMP inkübasyonu sonrası kasıcı ajanlara verilen kasılma yanıtının artışı, CO'in damar tonusuna endojen olarak katkısı olarak değerlendirildi.

CO'in pial arterin bazal tonusuna katkısı oldukça fazla olduğu için HO inhibitörü olan CrMP ile inkübasyonu sonrasında pial arterin bazal tonusu maksimal kasılma yanıtlarına yaklaştı. Artmış bazal tonus ile maksimal yanıt aralığı daraldığı için, CO'in endojen katkısını bu durumda sağlıklı değerlendirmek mümkün olmadı. Bu sorunu çözmek için bazal Ser doz yanıtlarının alınacağı protokolda bazal tonusun yükseltilmesi hedeflendi. Bu amaçla Ser doz yanıtlarına geçmeden damarların bazal tonusu noradrenalin ile (10^{-6} M) yükseltilerek, CrMP kullanıldığı durumdaki düzeylere gelmesi sağlandı. Daha sonra ise Ser yanıtları alındı.

Ekzojen CO yanıtları. Öncelikle damarlara 3×10^{-6} M Phe verilerek ya da 3×10^{-6} M Ser ile submaksimal kasılma yanıtı elde edildi. Ardından damarların kümülatif tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer (CORM, carbon monoxide-releasing molecule, $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$) (Aldrich 288144, St. Louis, USA) dozlarına (10^{-9} – 3×10^{-4} M) verdikleri gevşeme yanıtları kaydedildi.

CO damarlarda gevşeme etkisini cGMP ve Ca^{+2} bağımlı K^+ kanalları aracılığıyla gerçekleştirdiğinden dolayı deney protokolümüzde CO'in etki mekanizmasını ortaya koymak için CORM'un artan dozlarına verilen gevşeme yanıtları, selektif sGC inhibitörü 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ; 10^{-5} M, 30 dk) (Sigma A0168, St. Louis, USA), ve non-selektif K^+ kanal blokörü tetrahylammonium chloride (TEA; 10^{-2} M, 30 dk) (Fluka 86611, Steinheim, USA) varlığında da alındı.

3.3. Western Blot Analizi

3.3.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması

HO-2 proteinlerinin tayini için -80°C 'de saklanan tüm damar segmentlerinin buz üzerinde çözülmesi sağlandı ve aynı damar segmentinde yer alan deneklerin damarları havuz oluşturacak şekilde birleştirildi. Damar örnekleri daha etkili bir homojenizasyon için, buz üstünde küçük parçalara ayrıldı. 0,2 g doku için 600 μl lysis tamponu ve 1 ml lysis tampon için 50 μl proteaz inhibitör kokteyl (Sigma-9417, St. Louis, USA) eklenip vorteksledikten sonra 1 saat boyunca bekletildi. Karışım 10 saniyelik sonikasyonun ardından 25 dk-15000 rpm'de $+4^\circ\text{C}$ de santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı ve ticari protein kiti ile protein analizi yapıldı (Pierce-23236, Rockford, USA). Aynı miktarda protein içeren örneklere 5x laemli eklendi, örnekler 5dk $95-100^\circ\text{C}$ 'lik suda kaynatıldı ve kısa bir santrifüjden (5 dk-8000 rpm) sonra örnekler yüklemeye hazır hale geldi.

3.3.2. Elektroferez ve Blotlama İşlemleri

%12,5'lük sodyum dodesil sulfat (SDS) poliakrilamid jel hazırlanarak önceden yerleştirilmiş olan camların arasına döküldü. Jel donduktan sonra moleküler ağırlık standardı (Fermentas SM0441, Maryland, USA) ve 100 µg protein içeren örnekler jel kuyucuklarına pipet yardımıyla yüklendi. 3 saat süresince 80 volt'ta elektroferez yapıldı. Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış proteinlerin PVDF membrana (Biorad 162-0177, Kaliforniya, USA) transferi için transfer sandviçi hazırlandı. Transfer işlemi +4°C'de, 2,5 saat 250mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektroblob uygulamasıyla proteinler PVDF membrana aktarıldıktan sonra, membran % 5'lik süttözu (Biorad-170-6404, Kaliforniya, USA) içeren TBS-T (%0,1 Tween-20içeren TBS) tamponu kullanılarak 1 saat 22°C'de inkübe edildi.

Primer antikor uygulamasından önce PVDF membranlar TBS-T solüsyonu ile 30 dk boyunca 4 kez tazelenen tampon ile yıkandı. Membranlar %5'lik süttözu içeren 1:1000 oranında seyreltilmiş HO-2 primer antikorarı (StressGen, OSA-200E, Farmingdale, USA) veya 1:500 dilüsyonda hazırlanmış β-aktin (Abcam ab16039) içeren solüsyon ile gece boyunca, 4°C'de, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Ardından membranlar TBS-T ile 30 dk boyunca 4 kez yıkandı ve 1:80000 oranında seyrelmiş horseradish peroksidaz bağlı sekonder antikor (Sigma A0168, Sigma A2074, St. Louis, USA) içeren TBS-T solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membranlar 30 dk boyunca 4 kez TBS-T ile yıkandı ve görüntülemeye hazır hale getirildi.

3.3.3. Görüntüleme ve Değerlendirme

Sekonder antikorla konjuge peroksidaz enziminin, kemiluminisans oluşturan ürünü için substrat içeren ECL reaksiyon karışımı (Amersham-RPN2132, Buckingham, İngiltere), PVDF membranların (Biorad-162-0177, Kaliforniya, USA) üzerine uygulandı. 5 dk bekleme sürecinden sonra fotoğraf filmi (Amersham 28-9068-36, Buckingham, İngiltere) kullanılarak spesifik antikor bağlanmalarının yeri film üzerinde belirlendi.

Görüntülerin yarı-kantitatif analizi için bilgisayar ortamına aktarılan film paternleri bilgisayar yazılımı yardımıyla değerlendirildi (image J paket programı). Sonuçlar HO-2/β-aktin şeklinde β-aktin proteinin miktarına oranlanarak ayrı ayrı hesaplanarak ifade edildi.

3.4. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi. Maksimum kasılma/gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesinde eşleşmiş t testi kullanıldı. Tekrarlayan ölçümlerle elde edilen farklı ajan dozlarındaki kasılma/gevşeme cevaplarının değerlendirilmesinde tekrarlayan ölçümlerin varyans analizi ve post hoc test olarak ta Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel önemlilik derecesi p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

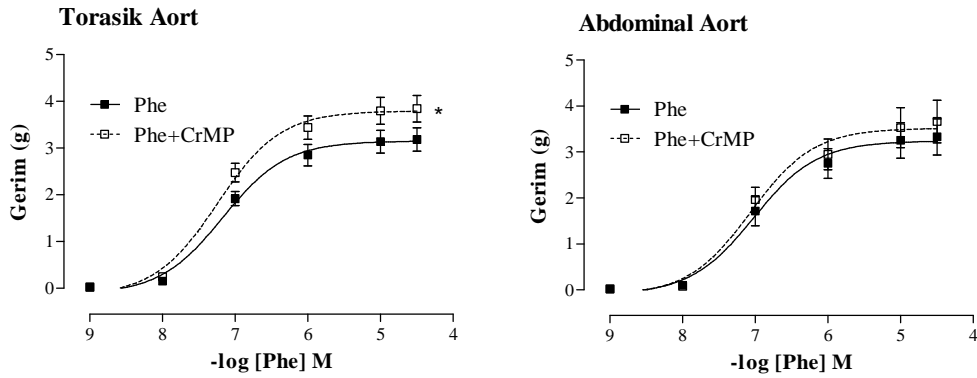
BULGULAR

Bu çalışmada ağırlığı 300-350g olan 6-8 aylık, erişkin, Wistar cinsi toplam 100 adet erkek sıçan kullanıldı.

4.1. Aort Yanıtları

4.1.1. Aort Damarlarının Endojen CO Yanıtları

Torasik aort ve abdominal aort halkalarında endojen CO yanıtları, bazal ve HO inhibitörü CrMP ile inkübasyon sonrası alınan Phe kasılma doz yanıt eğrileri ve maksimal kasılma değerleri Şekil 4.1. ve Tablo 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Torasik aort ve abdominal aort halkalarının Phe (10^{-9} – 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Phe (10^{-9} – 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri, Phe eğrisinden fark, * $p < 0,05$.

Torasik aort ve abdominal aort halkalarının Phe’e ve CrMP varlığında Phe’e verdikleri kasılma yanıtlarında tekrarlayan ölçümler için varyans analizi sonucu torasik aort halkasının doz yanıt eğrileri arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$) fakat abdominal aort sonuçları arasında fark yoktu. Bunun yanında amaranın Phe’e ve CrMP varlığında Phe’e verdikleri maksimal kasılma yanıtlarına bakıldığında (Tablo 4.1) hem torasik aort hem de abdominal aort kasılma yanıtlarında anlamlı fark gözlemlendi (sırasıyla; $p < 0,05$, $p < 0,01$).

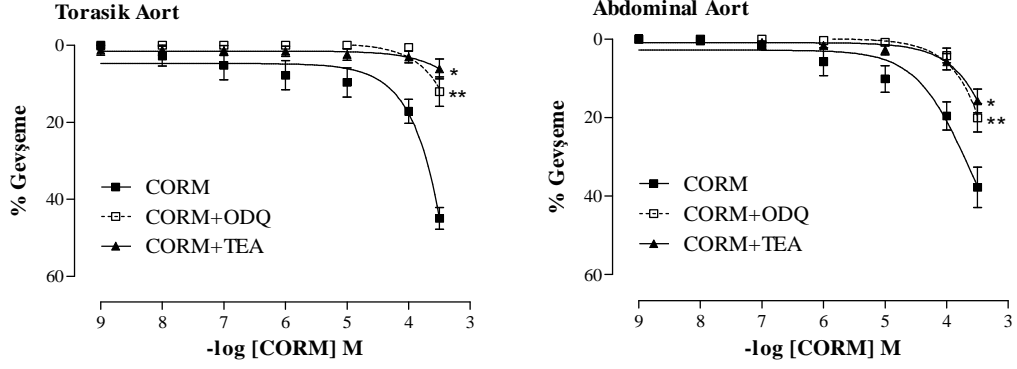
Tablo 4.1. Torasik aort ve abdominal aort halkalarının maksimal kasılma yanıtları (Emax).

Protokol	Phe (g)	Phe+CrMP (g)	Fark
Torasik Aort	3,18±0,25	3,84±0,29**	%21,59
Abdominal Aort	3,14±0,39	3,44±0,46**	%8,78

Phe’den fark ** $P < 0,01$

4.1.2. Aort Damarlarının Ekzojen CO Yanıtları

Torasik aort ve abdominal aort halkalarında ekzojen CO yanıtları, bazal, sGC inhibitörü ODQ ve K⁺ kanal blokörü TEA inkübasyonları sonrasında CO donörü CORM'a verilen gevşeme doz yanıt eğrileri ve maksimal gevşeme değerleri Şekil 4.2. ve Tablo 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Torasik aort ve abdominal aort halkalarının CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ve K⁺ kanal blokörü TEA varlığında CORM ($10^{-3} \times 10^{-4}$ M) doz-yanıt eğrileri, CORM eğrisinden fark, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Torasik aort ve abdominal aort damar halkalarının her ikisinde CORM gevşeme eğrisi ile kıyaslandığında CORM+ODQ ve CORM+TEA eğrilerinde anlamlı bir azalış tespit edildi (sırasıyla; $p < 0,01$, $p < 0,05$). Maksimal gevşeme yanıtlarında da her iki damar segmentinde hem ODQ hem de TEA CORM gevşeme yanıtlarını anlamlı olarak baskılandı ($p < 0,01$).

Tablo 4.2. Torasik aort ve abdominal aort halkalarının maksimal gevşeme yanıtları (Emax).





Protokol	CORM (%)	CORM+ODQ (%)	CORM+TEA (%)
Torasik Aort	44,98±2,82	12,08±3,81**	6,19±2,57**
Abdominal Aort	39,48±5,154	18,52±3,65**	15,24±3,01**

CORM'dan fark ** $p < 0,01$

4.1.3. Aort Damarlarının HO-2 Ekspresyonu

Torasik aort ve abdominal aort damarlarından elde edilen örneklerde ölçülen HO-2 protein düzeyleri, aynı dokuda ölçülen β -aktin miktarına oranlanmıştır. Sonuçlarımıza göre HO-2 protein düzeyleri torasik aortta abdominal aorta göre daha yüksek izlenmiştir.

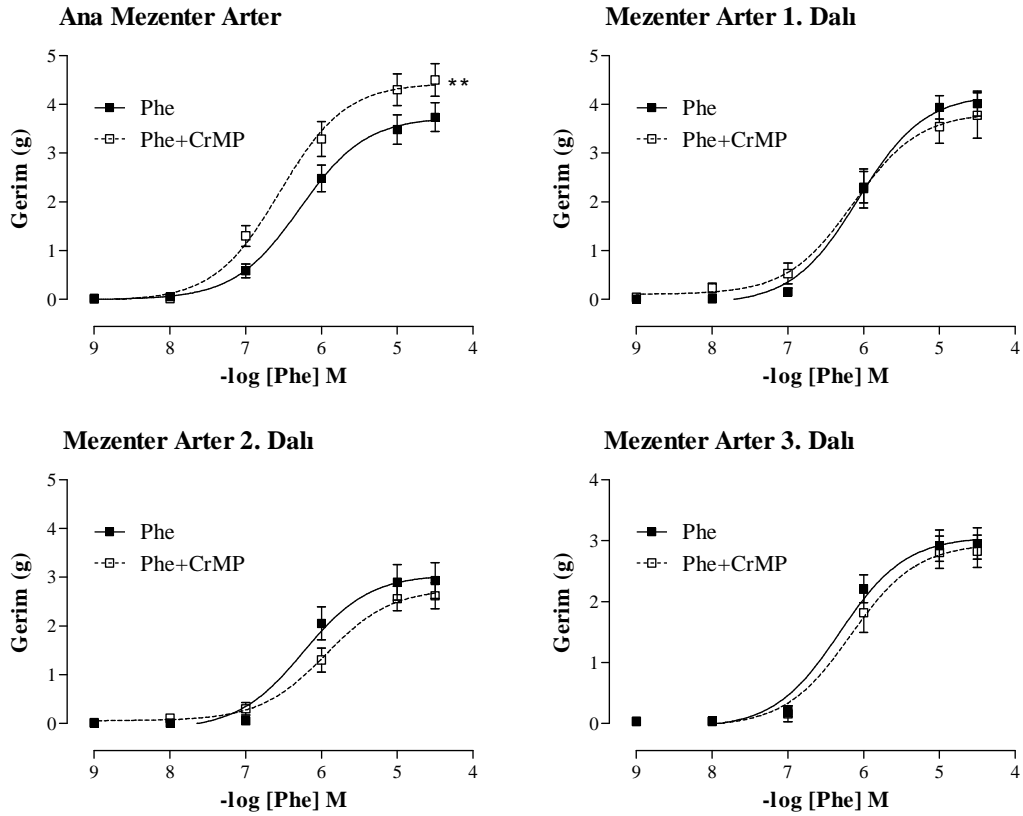
Tablo 4.3. Torasik aort ve abdominal aort halkalarının HO-2 protein ekspresyonu

Damar Segmenti	HO-2	B-aktin	HO-2/ B-aktin
Torasik aort			1,82±1,13
Abdominal aort			0,92±0,56

4.2. Mezenter Damar Yatağı

4.2.1. Mezenter Yatağa Ait Damarların Endojen CO Yanıtları

Ana mezenter arter, mezenter arterin 1, 2 ve 3. dallarına ait damar halkalarında endojen CO yanıtları, bazal ve HO inhibitörü CrMP ile inkübasyon sonrası alınan Phe kasılma doz yanıt eğrileri ve maksimal kasılma değerleri Şekil 4.3 ve Tablo 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Mezenter damar yatağına ait damar halkalarının Phe (10^{-9} – 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Phe (10^{-9} – 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri, Phe eğrisinden fark, ** p<0,01.

Mezenter damar yatağına ait damar halkalarının HO enzim inhibitörü CrMP ile inkübasyonu sonrasında alınan Phe kasılma yanıtlarında sadece ana mezenter arterde anlamlı bir farklılık tespit edilirken ($p < 0,01$) diğer damar segmentlerinde herhangi bir anlamlılık tespit edilemedi. Damarların Phe’e ve CrMP varlığında Phe’e

verdikleri maksimal kasılma yanıtlarında da (Tablo 5.4.) sadece ana mezenter arterin kasılma yanıtında anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0,01$).

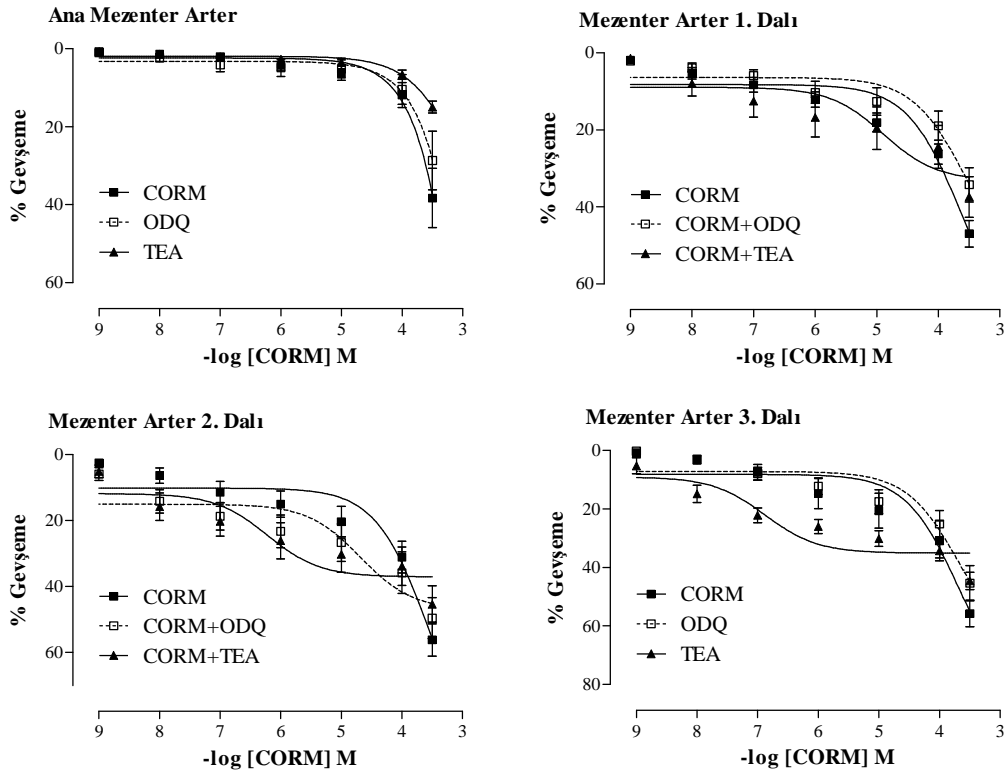
Tablo 4.4. Mezenter damar yatağına ait maksimal kasılma yanıtları (Emax).

Protokol	Phe (g)	Phe+CrMP	Fark
Ana Mezenter Arter	3,74±0,3	4,5±0,33**	%21,07
Mezenter Arter 1. Dal	4,02±0,25	3,77±0,46	Yok
Mezenter Arter 2. Dal	2,93±0,27	2,62±0,27	Yok
Mezenter Arter 3. Dal	2,96±0,26	2,83±0,27	Yok

Phe'den fark ** $p<0,01$

4.2.2. Mezenter Yatağına Ait Damarların Ekzojen CO Yanıtları

Mezenter damar yatağına ait damar halkalarında ekzojen CO yanıtları, bazal, sGC inhibitörü ODQ ve K^+ kanal blokörü TEA inkübasyonları sonrasında CO donörü CORM'a verilen gevşeme doz yanıt eğrileri ve maksimal gevşeme değerleri Şekil 4.4 ve Tablo 5.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Mezenter damar yatağına ait damar halkalarında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ve K^+ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri.

Mezenter damar yatağına ait damar halkalarının tümünde CORM gevşeme doz-yanıtları ne ODQ ne de TEA ile inkübasyon sonucunda değişmemiştir. Maksimal gevşeme yanıtları incelendiğinde ise, CORM gevşeme yanıtı ana mezenter

arter ($p<0,05$) ve mezenter arterin 1. dalında ($p<0,01$) her iki inhibitör de eşit olarak baskımlarken, mezenter arterin 2 ve 3. dalında ise sadece K^+ kanal blokörü olan TEA ile baskılanmıştır ($p<0,05$).

Tablo 4.5. Mezenter damar yatağına ait maksimal gevşeme yanıtları (Emax).









Protokol	CORM (%)	CORM+ODQ (%)	CORM+TEA (%)
Ana Mezenter Arter	44,04±7,59	35,09±7,51*	13,49±1,52*
Mezenter Arter 1. Dal	47,03±3,43	34,31±4,46**	37,46±5,28**
Mezenter Arter 2. Dal	56,25±4,86	49,58±6,2	45,41±5,56*
Mezenter Arter 3.Dal	55,81±4,55	45,44±5,97	44,73±2,96*

CORM'dan fark * $p<0,05$, ** $p<0,01$

4.2.3. Mezenter Yatağına Ait Damarların HO-2 Ekspresyonu

Mezenter yatağına ait damar segmentlerinden elde edilen örneklerde ölçülen HO-2 protein düzeyleri, aynı dokuda ölçülen β -aktin miktarına oranlanmıştır. Sonuçlarımıza göre HO-2 protein düzeylerinin mezenter damar segmentlerinde birbirine benzer olduğu izlendi.

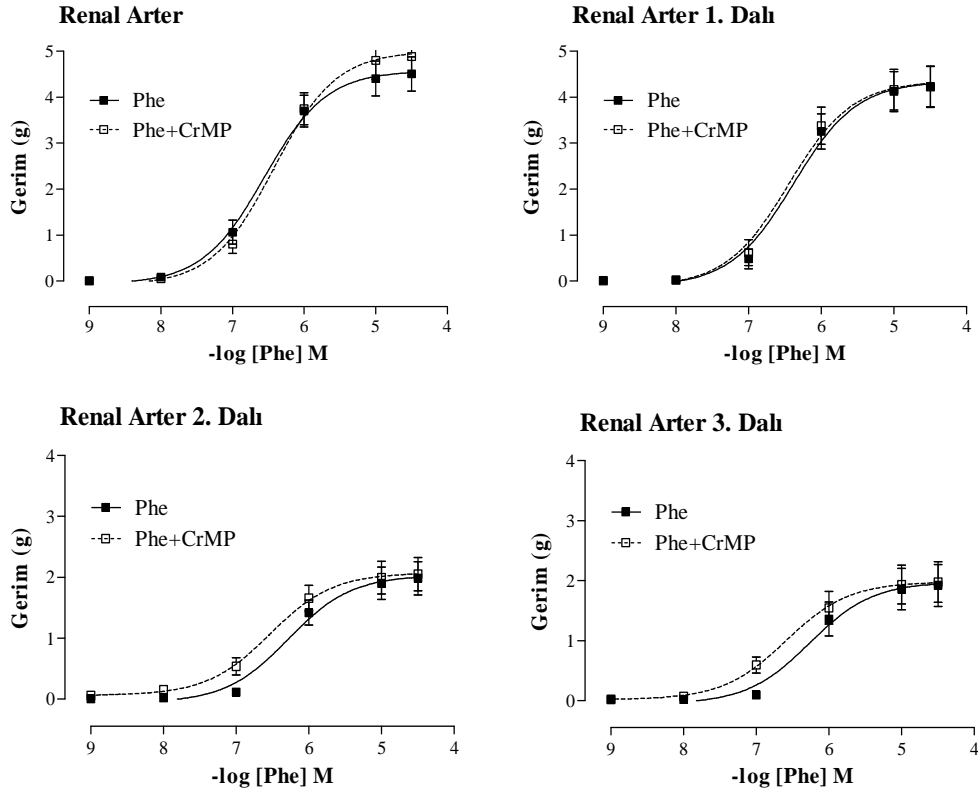
Tablo 4.6. Mezenter damar yatağına ait HO-2 protein ekspresyonu

Damar Segmenti	HO-2	B-aktin	HO-2/ B-aktin
Ana Mezenter Arter			0,65±0,28
Mezenter Arter 1. Dal			0,78±0,38
Mezenter Arter 2. Dal			0,34±0,17
Mezenter Arter 3.Dal			0,48±0,06

4.3. Böbrek Damar Yatağı

4.3.1. Böbrek Damar Yatağına Ait Endojen CO Yanıtları

Renal arter, renal arterin 1, 2 ve 3. dallarına ait damar halkalarında, endojen CO yanıtları bazal ve HO inhibitörü CrMP ile inkübasyon sonrası alınan Phe kasılma doz yanıt eğrileri ve maksimal kasılma değerleri Şekil 4.5 ve Tablo 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Böbrek damar yatağına ait damar halkalarının Phe (10^{-9} – 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Phe (10^{-9} – 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri.

Böbrek damar yatağına ait damar halkalarının hiç birinde Phe kasılma doz-yanıt eğrilerinde herhangi bir farka rastlanmadı. Fakat renal arterin CrMP varlığında alınan maksimal Phe kasılma yanıtı, maksimal Phe kasılma cevabı ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0,05$).

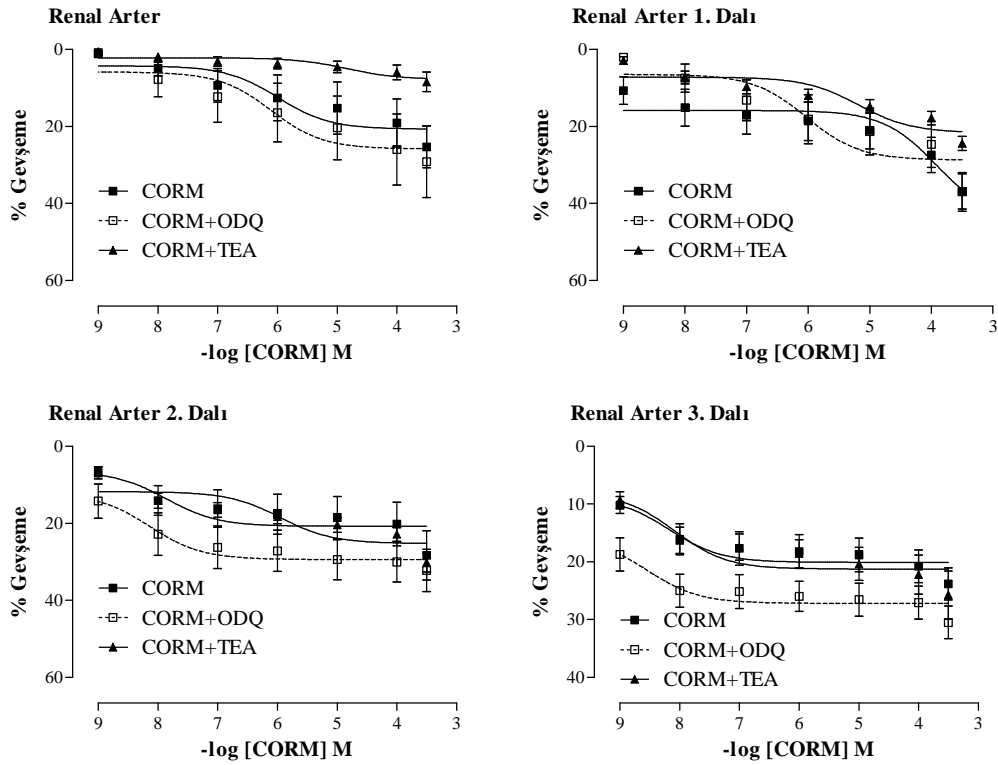
Tablo 4.7. Böbrek damarların maksimal kasılma yanıtları (Emax).

Protokol	Phe (g)	Phe+CrMP (g)	Fark
Renal Arter	4,51±0,37	4,89±0,42*	%8,7
Renal Arter 1. Dal	4,24±0,44	4,22±0,45	Yok
Renal Arter 2. Dal	1,99±0,27	2,05±0,27	%3,53
Renal Arter 3. Dal	1,92±0,35	1,98±0,34	%6,3

Phe'den fark * $p < 0,05$

4.3.2. Böbrek Damar Yatağının Ekzojen CO Yanıtları

Böbrek damar yatağına ait damar halkalarında ekzojen CO yanıtları, bazal, sGC inhibitörü ODC ve K^+ kanal blokörü TEA inkübasyonları sonrasında CO donörü CORM'a verilen gevşeme doz yanıt eğrileri ve maksimal gevşeme değerleri Şekil 4.6 ve Tablo 4.8'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Böbrek damar yatağına ait damar halkalarında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ve K^+ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri.

Phe ile önceden kasılmış böbrek damar yatağına ait damar halkalarının tümünde CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ile oluşturulan gevşeme doz-yanıt eğrilerine ODQ ve TEA ile inkübasyonunun etkisi olmamıştır. Ancak CORM'a verilen maksimal gevşeme yanıtları sadece renal arter ve renal arterin 1. dalında TEA ile baskılanmıştır ($p < 0,05$).

Tablo 4.8. Böbrek damarlarının maksimal gevşeme yanıtları (E_{max}).

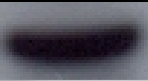







Protokol	CORM (%)	CORM+ODQ (%)	CORM+TEA (%)
Renal Arter	25,34±5,45	29,18±9,33	8,5±2,5*
Renal Arter 1. Dalı	36,95±5,5	37,05±5,01	24,45±1,84*
Renal Arter 2. Dalı	28,31±6,38	32,31±5,52	30,21±2,48
Renal Arter 3. Dalı	23,84±2,76	30,53±2,84	25,77±4,17

CORM'dan fark, * $p < 0,05$

4.3.3. Böbrek Damar Yatağının HO-2 Ekspresyonu

Böbrek damar yatağına ait damar segmentlerinden elde edilen örneklerde ölçülen HO-2 protein düzeyleri, aynı dokuda ölçülen β -aktin miktarına oranlanmıştır. Sonuçlarımıza göre HO-2 protein düzeyleri renal arterde daha yüksek olduğu izlenmiştir.

Tablo 4.9. Böbrek damarlarının HO-2 protein ekspresyonu

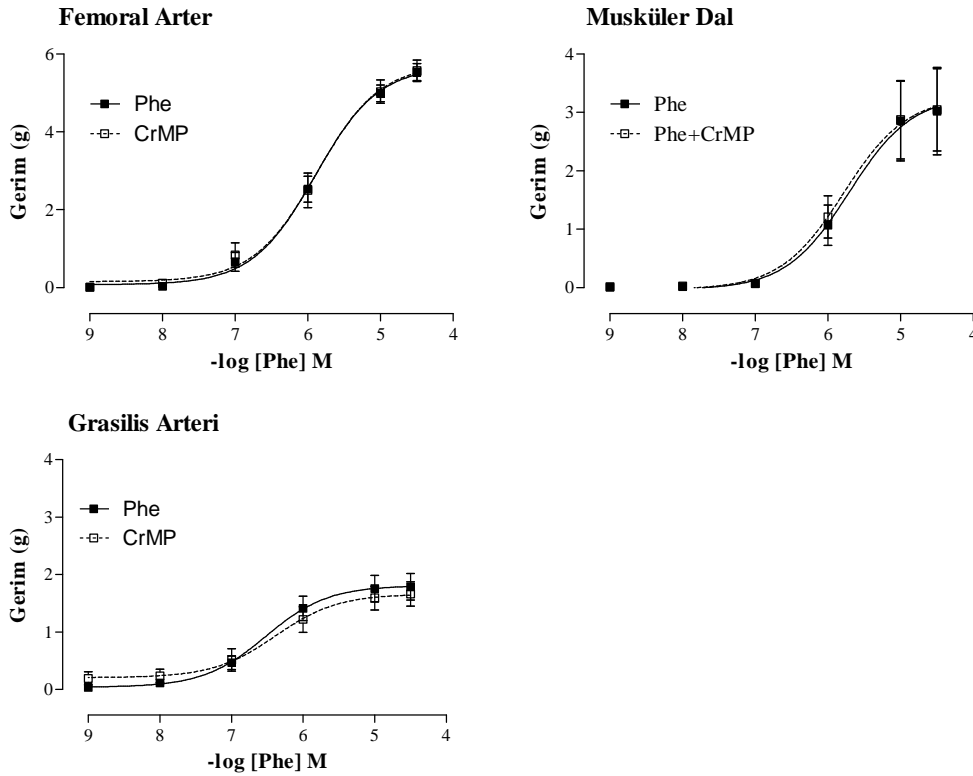
Damar Segmenti	HO-2	B-aktin	HO-2/ B-aktin
Renal Arter			1,22±0,51
Renal Arter 1. Dalı			0,94±0,21
Renal Arter 2. Dalı			1,05±0,06
Renal Arter 3. Dalı			0,84±0,13

4.4. İskelet Kası Dokusu

İskelet kası dokusunda CO'in vasküler tonusa etkisi gastrokinemius ve gracilis kaslarını besleyen iletim ve direnç damarlarında incelenmiş olup CO'in endojen ve ekzojen yanıtları aşağıda verilmiştir.

4.4.1.1. Gracilis Kası Damar Yatağına Ait Damarların Endojen CO Yanıtları

Gracilis kasını besleyen femoral arter, femoral arterin musküler dalı ve gracilis kası damarına ait endojen CO yanıtları, bazal ve HO inhibitörü CrMP ile inkübasyon sonrası alınan Phe kasılma doz yanıt eğrileri ve maksimal kasılma değerleri Şekil 4.7 ve Tablo 4.10'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Gracilis kası damar yatağına ait damar halkalarının Phe (10^{-9} – 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Phe (10^{-9} – 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri.

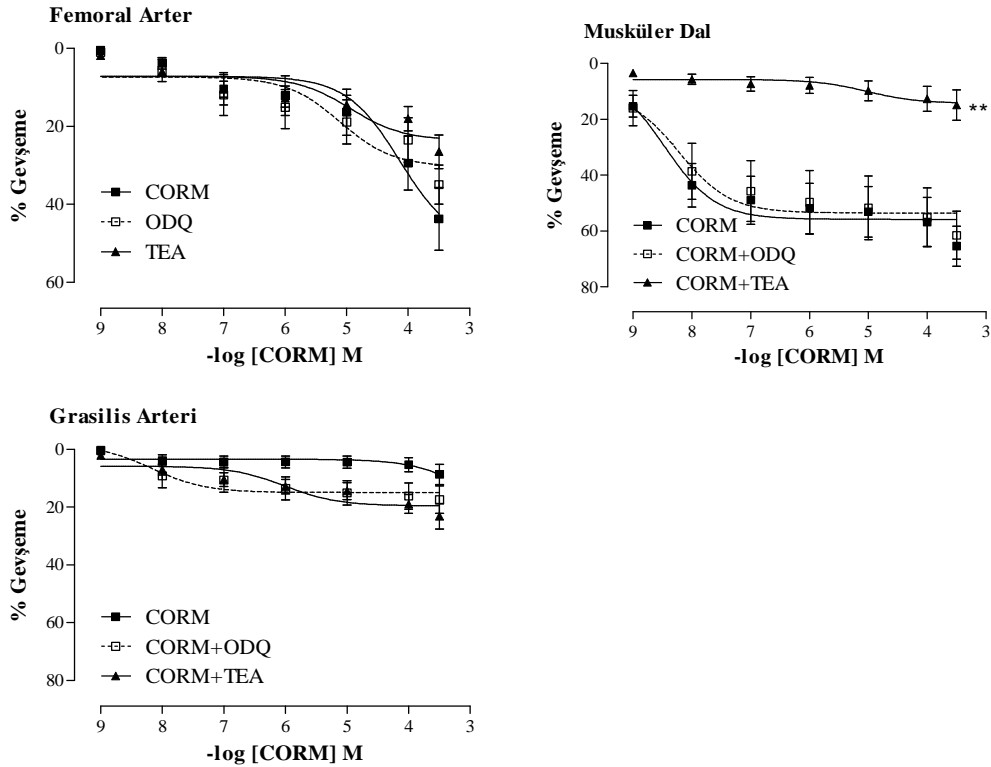
Grasilis kası damar yatağına ait damar halkalarının Phe'e ve CrMP varlığında Phe'e verdikleri kasılma yanıtlarında tekrarlayan ölçümlerin varyans analizi sonucu damarlar arasında istatistiksel bir fark saptanmadı. Damarların Phe'e ve CrMP varlığında Phe'e verdikleri maksimal kasılma yanıtlarına bakıldığında da (Tablo 5.10.) damarların kasılma yanıtlarında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Tablo 4.10. Grasilis kasını besleyen damarların maksimal kasılma yanıtları (Emax).

Protokol	Phe (g)	Phe+CrMP (g)	Fark
Femoral Arter	5,54±0,22	5,57±0,28	Yok
Musküler Dalı	3,02±0,75	3,05±0,7	%6,21
Grasilis Arteri	1,79±0,23	1,66±0,21	Yok

4.4.1.2. Grasilis Kası Damar Yatağına Ait Damarların Ekzojen CO Yanıtları

Grasilis kasını besleyen femoral arter, musküler dalı ve grasilis kası direnç arterlerinde ekzojen CO yanıtları, bazal, sGC inhibitörü ODQ ve K⁺ kanal blokörü TEA inkübasyonları sonrasında CO donörü CORM'a verilen gevşeme doz yanıt eğrileri ve maksimal gevşeme değerleri Şekil 4.8 ve Tablo 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8: Grasilis damar yatağına ait damar halkalarında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ve K⁺ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri.

CORM gevşeme yanıtlarının tekrarlayan ölçümlerin varyans analizi yapıldığında sadece musküler dalda K⁺ kanal inhibitörü TEA inkübasyonu sonrasında elde edilen gevşeme yanıtlarında anlamlı bir fark görüldü (p<0,01). Maksimal gevşeme yanıtları yönünden karşılaştırıldığında ise femoral arter (p<0,05) de CORM'a verilen gevşeme doz-yanıtlarını hem ODQ hem de TEA baskımlarken musküler dalda ise sadece TEA ile baskılanmıştır (p<0,05).

Tablo 4.11. Grasilis kasını besleyen damarların maksimal kasılma yanıtları (E_{max}).







Protokol	CORM (%)	CORM+ODQ (%)	CORM+TEA (%)
Femoral Arter	43,76±8,5	32,03±5,44*	26,55±4,33*
Musküler Dal	65,48±7,16	61,58±8,6	14,91±5,46**
Grasilis Arteri	8,74±3,87	17,47±4,88	23,25±2,14

CORM'dan fark, *p<0,05, **p<0,01

4.4.1.3. Grasilis Kası Damar Yatağının HO-2 Ekspresyonu

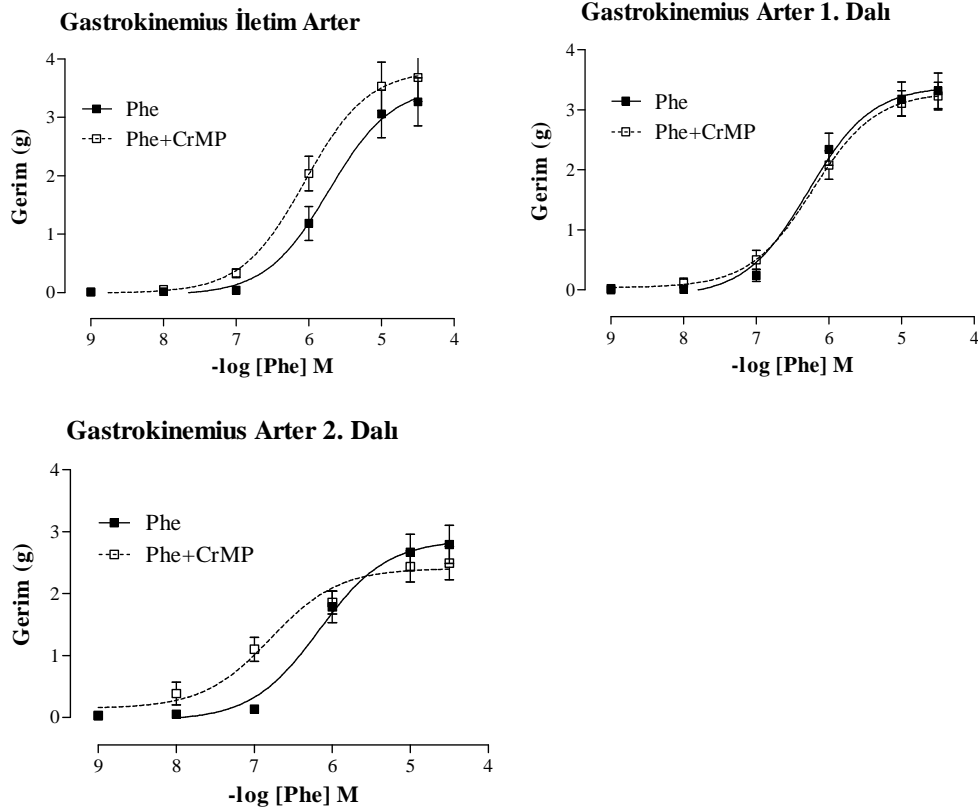
Grasilis kasını besleyen damarlardan elde edilen örneklerden ölçülen HO-2 protein düzeyleri, aynı dokuda ölçülen β-aktin miktarına oranlanmıştır. Sonuçlarımıza göre HO-2 protein düzeyleri musküler dalda daha yüksek olduğu izlenmiştir.

Tablo 4.12. Grasilis kasını besleyen damarların HO-2 protein ekspresyonu

Damar Segmenti	HO-2	B-aktin	HO-2/ B-aktin
Femoral Arter			0,78±0,57
Musküler Dal			1,22±0,2
Grasilis Arteri			0,75±0,32

4.4.2.1. Gastrokinemius Kası Damar Yatağına Ait Damarların Endojen CO Yanıtları

Gastrokinemius kasını damar yatağına ait damarlardan gastrokinemius iletim arteri, 1 ve 2. dallarının endojen CO yanıtları bazal ve HO inhibitörü CrMP ile inkübasyon sonrası alınan Phe kasılma doz yanıt eğrileri ve maksimal kasılma değerleri Şekil 4.9 ve Tablo 4.13'de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Gastrokinemius kası damar yatağına ait damar halkalarının Phe (10^{-9} – 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Phe (10^{-9} – 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri.

Gastrokinemius kası damar yatağına ait damar halkalarındaki endojen CO'in vasküler tonusa katkısını göstermek için, bazal ve HO inhibitörü CrMP ile inkübasyon sonrası alınan Phe kasılma doz yanıt eğrileri ve maksimal kasılma değerleri Şekil 5. Ve Tablo 5.'de gösterilmiştir. Gastrokinemius kası damar yatağına ait damar halkalarının Phe'e ve CrMP varlığında Phe'e verdikleri kasılma yanıtlarında tekrarlayan ölçümlerin varyans analizi sonucu damarlar arasında istatistiksel bir fark saptanmadı. Maksimal kasılma yönünden değerlendirildiğinde sadece gastrokinemius iletim arterinde maksimal Phe kasılma yanıtı ile karşılaştırıldığında CrMP varlığında alınan maksimal Phe kasılma yanıtının anlamlı olarak arttığı saptandı ($p < 0,01$).

Tablo 4.13. Gastrokinemius kası arterlerinin maksimal kasılma yanıtları (Emax).

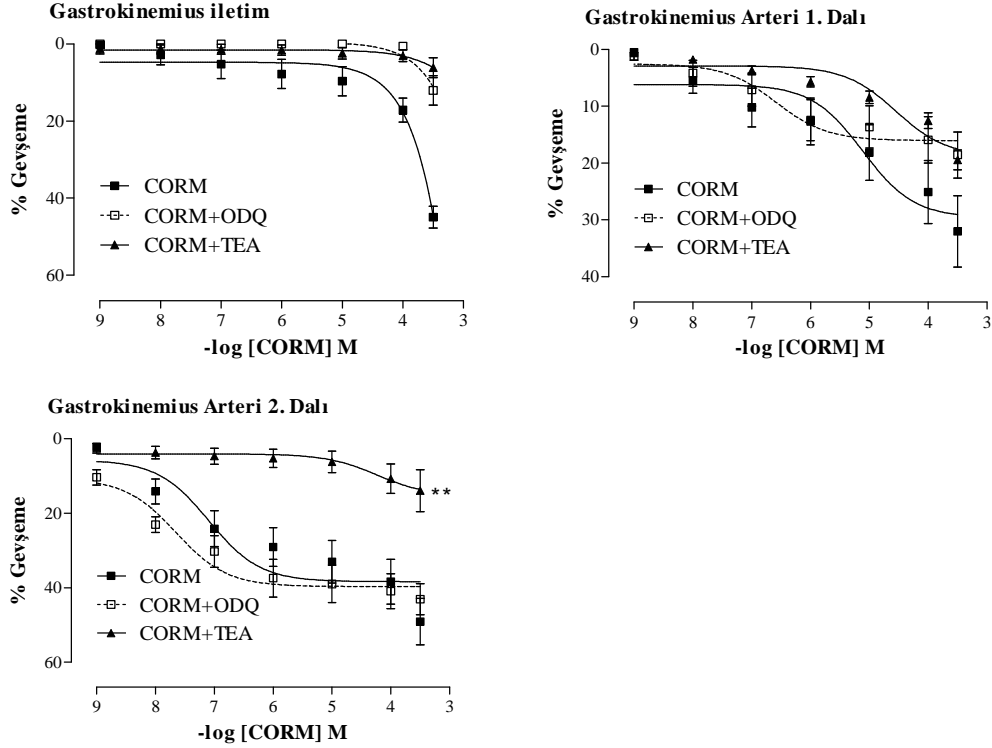
Protokol	Phe (g)	Phe+CrMP (g)	Fark
Gastrokinemius İletim	3,27±0,41	3,68±0,41**	% 17,32
Gastrokinemius 1. Dal	3,32±0,3	3,23±0,23	Yok
Gastrokinemius 2. Dal	2,80±0,31	2,49±0,27	Yok

Phe'den fark * *p < 0,01

4.4.2.2. Gastrokinemius Kası Damar Yatağına Ait Damarların Ekzojen CO Yanıtları

Gastrokinemius kası damar yatağına ait damar halkalarının ekzojen CO yanıtları, bazal, sGC inhibitörü ODQ ve K^+ kanal blokörü TEA inkübasyonları

sonrasında CO donörü CORM'a verilen gevşeme doz yanıt eğrileri ve maksimal gevşeme değerleri Şekil 4.10 ve Tablo 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Gastrokinemius damar yatağına ait damar halkalarında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ve K^+ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri, CORM eğrisinden fark, ** $p < 0,01$.

Gastrokinemius damar yatağında ODQ ve TEA inkübasyonları sonrasında CORM'a verilen gevşeme doz-yanıtları incelendiğinde (şekil 5.10) sadece gastrokinemius 2. dalında TEA varlığında alınan gevşeme yanıtında anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0,01$). Maksimal gevşeme yanıtları açısından değerlendirildiğinde (tablo 5.10) de gastrokinemius iletim arteri ($p < 0,05$), gastrokinemius 1. ($p < 0,05$) ve 2. ($p < 0,05$) damar segmentlerinde de TEA ile CORM'a verilen gevşeme yanıtı inhibe edildi.


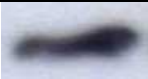




Tablo 4.14. Gastrokinemius kası arterlerinin maksimal kasılma yanıtları (Emax).

Protokol	CORM (%)	CORM+ODQ (%)	CORM+TEA (%)
Gastrokinemius iletim	35,06±6,04	38,61±10,08	11,90±2,9*
Gastrokinemius 1. Dal	32,06±6,29	18,58±4,06	19,46±1,75*
Gastrokinemius 2. Dal	49,13±6,18	33,52±4,21	13,95±5,63**

4.4.2.3. Gastrokinemius Kası Damar Yatağının HO-2 Ekspresyonu

Gastrokinemius kasını besleyen damarlardan elde edilen örneklerden ölçülen HO-2 protein düzeyleri, aynı dokuda ölçülen β -aktin miktarına oranlanmıştır. Sonuçlarımıza göre HO-2 protein düzeyleri gastrokinemius damar segmentlerinde birbirine denk olduğu izlenmiştir.

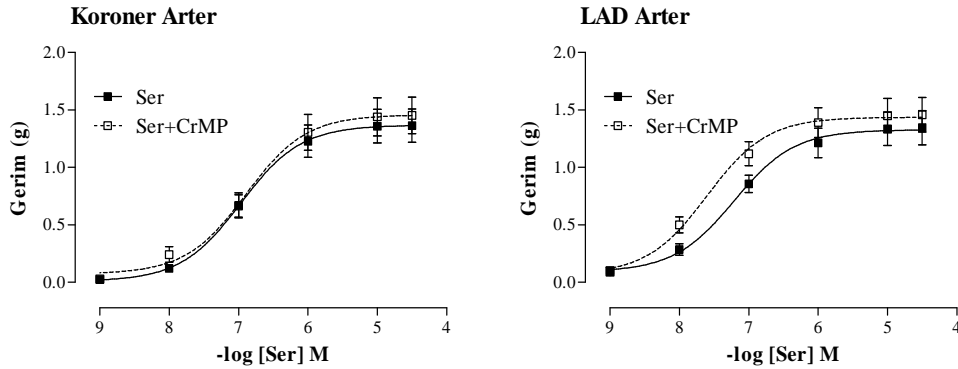
Tablo 4.15. Gastrokinemius kası arterlerinin HO-2 protein ekspresyonu

Damar Segmenti	HO-2	B-aktin	HO-2/ B-aktin
Gastrokinemius iletim			1,09±0,19
Gastrokinemius 1. Dal			1,14±0,002
Gastrokinemius 2. Dal			1,32±0,42

4.5. Kalp Dokusu

4.5.1. Kalp Dokusu Damarlarının Endojen CO Yanıtları

Kalp dokusunda yer alan koroner arter ve LAD damarlarının endojen CO yanıtları bazal ve HO inhibitörü CrMP ile inkübasyon sonrası alınan Ser kasılma doz yanıt eğrileri ve maksimal kasılma değerleri Şekil 4.11 ve Tablo 4.16'de gösterilmiştir.



Şekil 5.11. Kalp dokusu damar yatağına ait damar halkalarının Ser (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Ser (10^{-9} - 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri.

Koroner ve LAD damar halkalarının Ser'e ve CrMP varlığında Ser'e verdikleri kasılma yanıtlarında tekrarlayan ölçümlerin varyans analizi sonucu damarlar arasında istatistiksel bir fark saptanmadı. Damarların Ser'e ve CrMP varlığında Ser'e verdikleri maksimal kasılma yanıtlarına bakıldığında da (Tablo 5.16.) koroner arter kasılma yanıtlarında anlamlı bir fark gözlenirken ($p > 0,01$) LAD damar yanıtlarında herhangi bir farklılık tespit edilemedi.

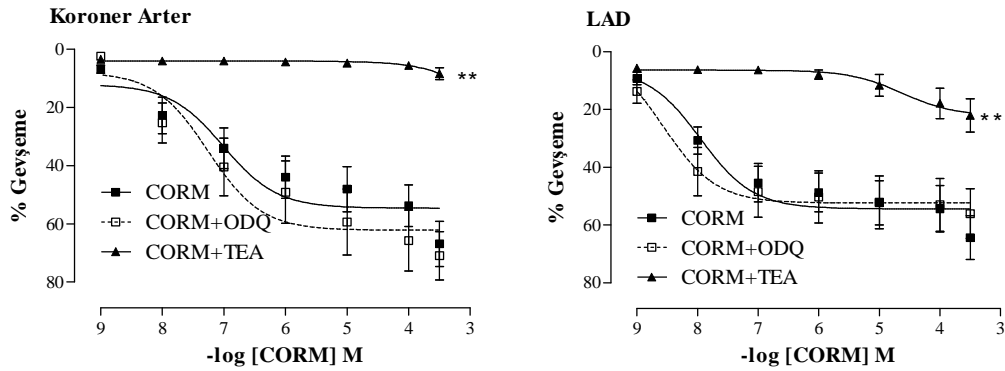
Tablo 4.16. Kalp dokusuna ait damarların maksimal kasılma yanıtları (Emax).

Protokol	Ser (g)	Ser+CrMP (g)	Fark
Koroner Arter	1,36±0,14	1,45±0,16*	%6,65
LAD	1,39±0,15	1,46±0,15	%5,72

Ser'den fark *p <0,05

4.5.2. Kalp Dokusu Damarlarının Ekzojen CO Yanıtları

Kalp dokusunu besleyen koroner ve LAD damarlarının ekzojen CO yanıtları, bazal, sGC inhibitörü ODQ ve K⁺ kanal blokörü TEA inkübasyonları sonrasında CO donörü CORM'a verilen gevşeme doz yanıt eğrileri ve maksimal gevşeme değerleri Şekil 4.12 ve Tablo 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 5.12. Kalp dokusu damar halkalarında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ve K⁺ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri, CORM eğrisinden fark, ** p<0,01.

Hem koroner arterde hem de LAD damar segmentinde CORM'un sergilediği gevşeme yanıtı K⁺ kanal blokörü olan TEA ile inkübasyon sonrasında hem doz yanıt eğrilerinde hem de maksimal gevşeme yanıtlarında engelledi (p<0,01).

Tablo 5.17. Kalp dokusuna ait damarların maksimal gevşeme yanıtları (Emax).





Protokol	CORM (%)	CORM+ODQ (%)	CORM+TEA (%)
Koroner arter	66,93±7,81	71,01±8,34	8,38±2,07**
LAD	64,28±7,54	56,1±8,55	22,14±5,78**

CORM'dan fark, ** p<0,01.

4.5.3. Kalp Dokusu Damarlarının HO-2 Ekspresyonu

Kalp dokusunu besleyen damarlardan elde edilen örneklerden ölçülen HO-2 protein düzeyleri, aynı dokuda ölçülen β -aktin miktarına oranlanmıştır. Sonuçlarımıza göre koroner arterde HO-2 protein düzeyleri LAD'ye göre daha yüksek olduğu izlenmiştir.

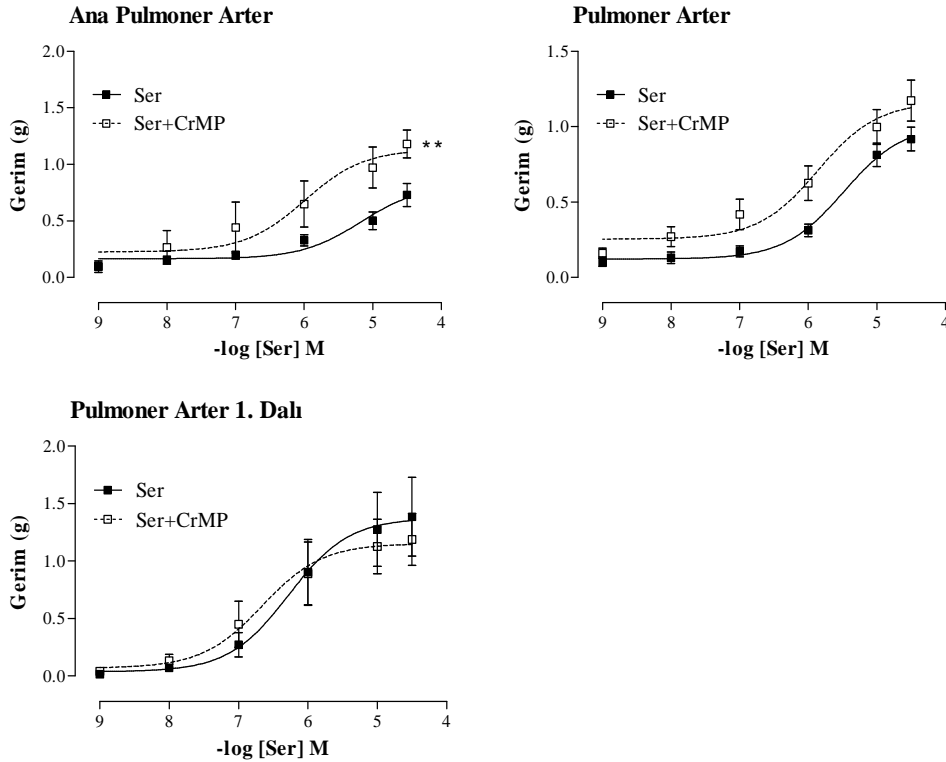
Tablo 4.18. Kalp dokusuna ait damarların HO-2 protein ekspresyonu.

Damar Segmenti	HO-2	B-aktin	HO-2/ B-aktin
Koroner arter			1,37±0,06
LAD			0,59±0,03

4.6. Pulmoner Damar Yatağı

4.6.1. Pulmoner Damar Yatağın Endojen CO Yanıtları

Akciğer dokusunu besleyen ana pulmoner arter, pulmoner arter ve pulmoner arterin 1. dalı damarlarının endojen CO yanıtları bazal ve HO inhibitörü CrMP ile inkübasyon sonrası alınan Ser kasılma doz yanıt eğrileri ve maksimal kasılma değerleri Şekil 4.13 ve Tablo 4.19’da gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Pulmoner damar yatağına ait Ser (10^{-9} – 3×10^{-5} M) ve HO inhibitörü CrMP varlığında Ser (10^{-9} – 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri, Ser eğrisinden fark, ** p<0,01.

Sadece ana pulmoner artere ait damar halkalarında Ser’e ve CrMP varlığında Ser’e verdikleri kasılma yanıtlarında istatistiksel bir farka rastlandı (p>0,01). Damarların Ser’e ve CrMP varlığında Ser’e verdikleri maksimal kasılma yanıtları incelendiğinde (Tablo 5.19.) ana pulmoner arter ve pulmoner arterin kasılma yanıtlarında anlamlı bir fark gözlenirken (p>0,01) pulmoner arterin 1. dalının maksimal kasılma yanıtlarında herhangi bir farklılık tespit edilemedi.

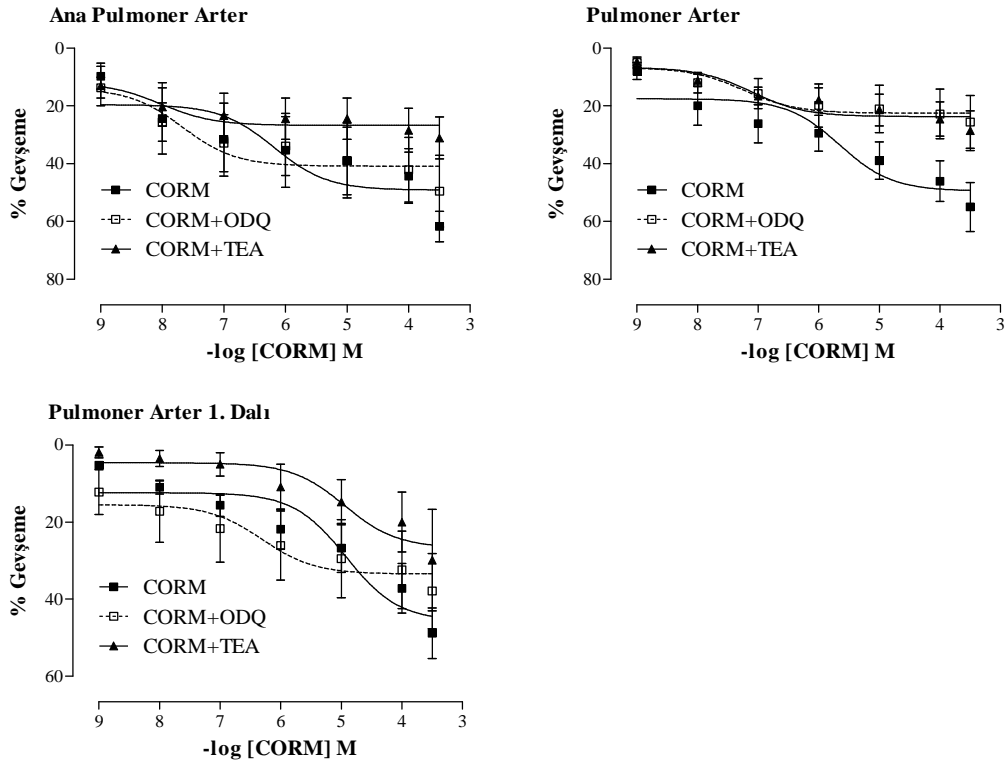
Tablo 4.19. Pulmoner damar yatağına ait damarların maksimal kasılma yanıtları (Emax).

Protokol	Ser (g)	Ser+CrMP (g)	Fark
Ana Pulmoner Arter	0,73±0,1	1,18±0,12**	%69,39
Pulmoner arter	0,92±0,08	1,17±0,14**	%26
Pulmoner 1.Dal	1,38±0,34	1,19±0,23	Yok

Ser'den fark ** p <0,01

4.6.2. Pulmoner Damar Yatağının Ekzojen CO Yanıtları

Akciğer dokusuna ait damarlardan ana pulmoner arter, pulmoner arter ve pulmoner arterin 1. dalında ekzojen ekzojen CO yanıtları, bazal, sGC inhibitörü ODQ ve K⁺ kanal blokörü TEA inkübasyonları sonrasında CO donörü CORM'a verilen gevşeme doz yanıt eğrileri ve maksimal gevşeme değerleri Şekil 4.14 ve Tablo 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Pulmoner dokusuna ait damar halkalarında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ve K⁺ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri.

CORM gevşeme yanıtlarının tekrarlayan ölçümlerin varyans analizi yapıldığında damar segmentlerinden elde edilen gevşeme yanıtlarında anlamlı bir fark görülmedi. Maksimal gevşeme yanıtları yönünden karşılaştırıldığında da ana pulmoner arter ve pulmoner arterde hem TEA (sırasıyla; p<0,05, p<0,01) hem de ODQ (sırasıyla; p<0,05, p<0,01) ile baskılanırken, pulmoner arterin 1. dalında CORM 'a verilen maksimal gevşeme yanıtları TEA (p<0,05) ile baskılandı.

Tablo 4.20. Pulmoner damar yatağına ait damarların maksimal gevşeme yanıtları (Emax).







Protokol	CORM (%)	CORM+ODQ (%)	CORM+TEA (%)
Ana Pulmoner Arter	61,80±5,27	38,87±7,96*	31,12±7,31*
Pulmoner Arter	55,03±8,49	25,61±9,12**	28,66±6,88**
Pulmoner Arter 1. Dal	49,89±6,6	38±9,76	29,92±13,18*

CORM'dan fark, *p<0,05, **p<0,01

4.6.3. Pulmoner Damar Yatağının HO-2 Ekspresyonu

Pulmoner damar yatağına ait damarlardan elde edilen örneklerden ölçülen HO-2 protein düzeyleri, aynı dokuda ölçülen β -aktin miktarına oranlanmıştır. Sonuçlarımıza göre HO-2 protein düzeyinin pulmoner arter 1. dalında diğer segmentlere göre oldukça düşük olduğu izlenmiştir.

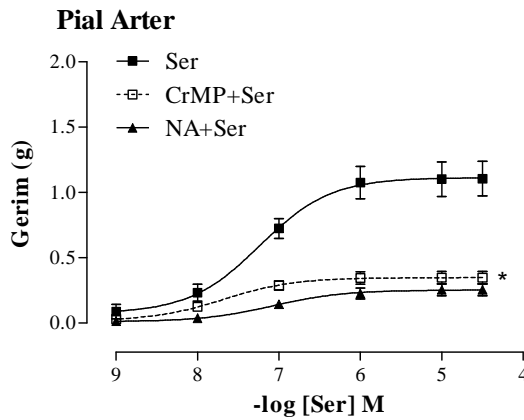
Tablo 4.21. Pulmoner damar yatağına ait damarların HO-2 protein ekspresyonu.

Damar Segmenti	HO-2	B-aktin	HO-2/ B-aktin
Ana Pulmoner Arter			2,22±1,62
Pulmoner Arter			0,72±0,03
Pulmoner Arter 1. Dal			0,49±0,18

4.7. Beyin Dokusu

4.7.1. Pial Arter Endojen CO Yanıtları

Beyin dokusunun pial tabakasını besleyen pial arterin endojen CO yanıtları bazal, HO inhibitörü CrMP ile inkübasyon sonrası ve noradrenalin (NA) ile kastıktan sonra alınan Ser kasılma doz yanıt eğrileri ve maksimal kasılma değerleri Şekil 4.15 ve Tablo 4.22'de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Pial artere ait Ser (10^{-9} – 3×10^{-5} M), HO inhibitörü CrMP varlığında Ser (10^{-9} – 3×10^{-5} M) ve NA ile kastıktan sonra Ser (10^{-9} – 3×10^{-5} M) doz-yanıt eğrileri, Ser+NA eğrisinden fark, *p<0,05.

CO'ünün pial arterin tonusunu düzenlemeye katkısı önemli ölçüdedir. Bundan dolayı HO inhibitörü olan CrMP ile inkübasyonu sonrasında pial arterin bazal tonusu neredeyse Emax değerine yaklaşmıştır. Bu nedenle pial arter damar halkalarında CO'ünün endojen katkısını ortaya çıkarmak için, farklı bir kasıcı ajan olan noradrenalinle, CrMP ile oluşan bazal tonus düzeyine kadar bazal tonusları artırılarak, Ser doz-yanıtı tekrar çalışılmıştır. Pial arter damar halkalarının NA ile kastıktan sonra Ser'e ve CrMP varlığında Ser'e verdikleri kasılma doz-yanıtlarında tekrarlayan ölçümlerin varyans analizi sonucu damarlar arasında istatistiksel bir fark saptandı ($p<0,01$). NA ile kastıktan sonra Ser'e ve CrMP varlığında Ser'e verdikleri verdikleri maksimal kasılma yanıtlarında da (Tablo 4.15) istatistiksel öneme rastlandı ($p<0,05$).

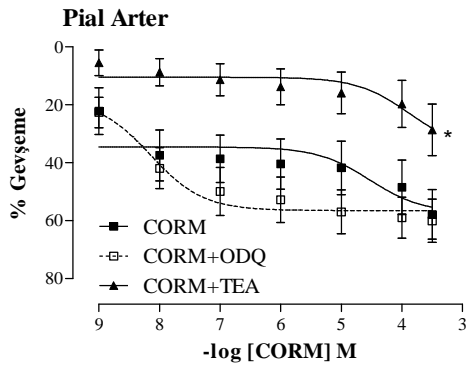
Tablo 4.22. Pial arterin maksimal kasılma yanıtı (Emax) ve bazal tonusu.

Protokol	Ser	Ser+NA	Ser+CrMP	Fark
Pial arter bazal tonus (g)	0,43±0,075	1,06±0,11	1,26±0,09	%52,14
Pial arter Emax (g)	1,1±0,14	0,25±0,046	0,36±0,055*	

Ser+NA'dan fark, * $p<0,05$

4.7.2. Pial arter Ekzojen CO Yanıtları

Beyin dokusunun pial tabakasını besleyen pial arterin ekzojen CO yanıtları, bazal, sGC inhibitörü ODQ ve K^+ kanal blokörü TEA inkübasyonları sonrasında CO donörü CORM'a verilen gevşeme doz yanıt eğrileri ve maksimal gevşeme değerleri Şekil 4.16 ve Tablo 4.23'te gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Pial artere ait damar halkalarında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M), cGMP inhibitörü ODQ varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ve K^+ kanal blokörü TEA varlığında CORM (10^{-9} – 3×10^{-4} M) doz-yanıt eğrileri, CORM eğrisinden fark, * $p<0,05$.

Pial arter damar segmentinde CORM'un sergilediği gevşeme yanıtı, ODQ inkübasyonu sonrası fark göstermezken, K^+ kanal blokörü olan TEA ile inkübasyon sonrasında hem doz yanıt eğrilerinde ($p<0,05$) hem de maksimal gevşeme yanıtlarında anlamlı düzeyde inhibisyon oldu ($p<0,01$).

Tablo 4.23. Pial arterin maksimal gevşeme yanıtı (Emax).

Protokol	CORM (%)	ODQ (%)	TEA(%)
Pial arter	54,91±8,59	60,11±7,45	28,69±8,88 **C

CORM eğrisinden fark, **p<0,01

4.7.3. Pial arterin HO-2 Ekspresyonu

Pial arterden elde edilen örneklerden ölçülen HO-2 protein düzeyleri, aynı dokuda ölçülen β -aktin miktarına oranlanmıştır. Sonuçlarımıza göre pial arterde HO-2 protein düzeyinin yüksek olduğu izlenmiştir.

Tablo 4.24. Pial arterin HO-2 ekspresyonu.

Damar Segmenti	HO-2	B-aktin	HO-2/ B-aktin
Pial arter			2,02±0,32

Tablo 4.25. Özet tablo

Damar İsmi	Damar çapı	Endojen		Ekzojen	
		Katkısı	Farkı	ODQ	TEA
Torasik Aort	1900-2000 µm	**	%21,59	**	**
Abdominal Aort	1000-1400 µm	**	%8,78	**	**
Ana Mezenter Arter	800-1000 µm	**	%21,27	*	*
Mezenter Arter I. Dal	280-320 µm	-	-	**	**
Mezenter Arter II. Dal	200-240 µm	-	-	-	*
Mezenter Arter III. Dal	170-190 µm	-	-	-	-
Renal arter	600-800 µm	*	%8,7	-	*
Renal arter 1. dal	300-400 µm	-	-	-	*
Renal arter 2. dal	200-220 µm	-	%3,53	-	-
Renal arter 3. dal	160-200 µm	-	%6,30	-	-
Femoral arter	500-600 µm	-	-	*	*
Muasküler dal	300-400 µm	-	%6,21	-	**
Grasilis	180-200 µm	-	-	-	-
Gastrokinemius İletim	300-400 µm	**	%17,32	-	*
Gastrokinemius 1. dal	200-300 µm	-	-	-	*
Gastrokinemius 2. dal	160-200 µm	-	-	-	**
Koroner	400-480 µm	*	%6,65	-	**
LAD	220-240 µm	-	%5,72	-	**
Ana Pulmoner arter	2100-2300 µm	**	%69,39	*	*
Pulmoner arter	1500-1700 µm	**	%26	**	**
Pulmoner arter 1. dal	300-400 µm	-	-	-	*
Pial Arter	80-100 µm	*	%52,14	-	**

TARTIŞMA

Bu çalışmada, gaz yapısına sahip otokrin/parakrin moleküllerden biri olan ve endotelden salgılanarak vasküler tonusun düzenlenmesine katkıda bulunan CO'in, arteriyel damar ağacındaki vazodilatör etkisini ve etkisinin mekanizmasını karşılaştırmalı olarak ortaya koyduk. CO damar gevşetici etkisini, ön planda direnç tipi arterlerden ziyade, iletim tipi arteriyel damar segmentlerinde göstermektedir. Bunun yanında CO'in organa özel damar ağacı yanıtları incelendiğinde, öncelikle serebral ve akciğer vasküler tonusuna katkısının diğer organ damar yataklarına göre daha fazla olduğu saptanmıştır. CO'in düz kasta gevşetici etkisini, çoğunlukla çapı yaklaşık olarak 600 µm den küçük olan arteriyel damarlarda K⁺ kanalları ile gösterirken, daha büyüklerde ise hem K⁺ kanalları ve cGMP aracılığıyla oluşturmaktadır.

CO'in dolaşımın düzenlenmesine etkisine, gittikçe artan bir ilgi gösterilmesinin en önemli nedeni, çeşitli patolojik süreçlerde vasküler tonusa etkisinin artarak, önemli mediatörlerden biri haline gelmesidir [149]. Aralarındaki ilişki oldukça karmaşık olsa da, CO'in, NO için bir yedekleme molekülü olduğu ve NO üretilmesindeki yetersizlik durumlarında sentezinin oldukça arttığı bilinmektedir [149-151]. Esansiyel hipertansiyon, hem, hem derivatıvleri, ısı şoku, ağır metaller, NO, NO donörleri, okside lipidler, hiperoksi, lipopolisakkaritler, phorbol ester, sodyum arsenit, radyasyon, ultraviyole, hidrojen peroksit, hipoksi, endotoksin, büyüme faktörleri, oksidatif stres, çeşitli sitokinler, kayma gerilimi, şiddetli ışık, Ang II, glikoz yoksunluğu gibi süreçlerde HO enzimlerinin protein miktarı ve aktivitesi artmaktadır [18-19, 149]. Patolojik durumlarda CO'in vasküler tonusa etkisini oldukça detaylı ortaya konmasına rağmen, normal fizyolojik koşullarda vasküler tonusa katkısı bakımında halen yeterli bilgi birikimi yoktur. Elbette CO'in değişik türlerde birçok damar segmentinde vazorelaksasyona neden olduğu Tablo 3-2'de de gösterildiği gibi iyi bilinmektedir. Organizmada CO'in hangi organların veya hangi büyüklükte damarların tonusuna katkıda bulunduğu, bazı derlemelerde ancak farklı çalışmalardan elde edilen sonuçlar üzerinden yorumlanmaya çalışılmaktadır [91, 152]. Biz çalışmamızda, normal fizyolojik koşullarda CO'in vasküler tonusa katkısını belirleyebilmek amacıyla, sıçanların arteriyel damar ağacını hem organlara spesifik hem de farklı damar çaplarına yönelik inceleyebilecek bir yaklaşım yaptık.

Vasküler yanıtlar açısından, CO'in etkisinin incelenmesinde literatürde farklı yöntemler göze çarpmaktadır. CO'in vasküler dokuya uygun düzenekle gaz şeklinde verilmesi, çeşitli HO inhibitörlerinin veya donörlerinin doz-yanıtlarının incelenmesi veya CO oluşumunun inhibisyonu sonucu verilen konstrüktör yanıt değişikliğinin değerlendirilmesi gibi yaklaşımlar olasıdır [153-156]. Çalışmamızda endojen CO üretiminin vasküler tonusuna katkısını, uygun konstrüktör bir mediatöre (fenilefrin veya serotonin), HO inhibisyonu sonucu CO üretiminin ortadan kaldırılmasıyla verilen kasılma yanıtı artışı üzerinden değerlendirdik. CO donörüne verilen gevşeme

yanıtları ise ekzojen CO yanıtı olarak değerlendirildi. Bu gevşeme yanıtlarının TEA veya ODQ ile inhibe edilmesi ile incelenen damarda, CO'in hangi mekanizmayı kullandığı belirlenmeye çalışıldı.

Kapiller düzeye kadar sağlanan kan akımında görevli damarları temel olarak, iletim damarları ve direnç damarları olarak iki kısımda incelemek olasıdır. Kanın hedef organa kadar getirilmesi, yani dağılımından sorumlu olan iletim damarları daha büyük çapa sahiptir. Genellikle perfüzyon basıncı dar sınırlar içinde tutulduğundan, kan akımını önemli ölçüde belirleyen damar direncidir [157]. Birçok dokuda damar direnci büyük ölçüde çapı 100 ile 500 µm arasında değişen direnç damarlarının fonksiyonu olarak karşımıza çıkar [158]. Damarlar üzerinde organ banyolarında yapılan çalışmalarda genellikle büyük iletim veya besleyici tip arterler incelenebilmektedir. Direnç damarı denilebilecek düzeydeki küçük arter (100 - 500 µm) yanıtlarının incelenmesi için kullanılan iki teknik vardır. Bunlardan ilki olan telli miyografya çeşitli maddelere karşı damarın verdiği yanıtlar izometrik kuvvet transdüseriyle kaydedilmektedir. Diğeri ise damarın iki kanül arasına takılıp içinden geçen sıvının akım veya basıncının istendiği gibi düzenlenebildiği ve yanıtlarının daha fizyolojik koşullarda alınabileceği basınç miyografya tekniğidir [159-160]. Basınç miyografya akım ve basınç ayrı ayrı kontrol edilebildiğinden, damarlarda akım aracılığıyla değişen kayma geriliminin damar tonusuna etkisi de incelenebilmektedir. Damarın silindirik yapısının korunması ve akım-basınç ikilisinin ayrı ayrı kontrol edilebilmesinden dolayı basınç miyografya daha fizyolojik bir teknik olsa da, protokol sürelerinin uzun olması ve nisbeten daha zor manipülasyonu nedeniyle, basınç miyografyanın yanı sıra telli miyografya da tercih edilebilen bir tekniktir. Bu çalışmada CO'in vasküler tonusa etkisini incelemek amacıyla aort ve 7 farklı organ damar yatağından izole edilen toplam 22 damar segmenti incelendi. Aort ve pulmoner arterlerin büyük segmentlerinde organ banyosu, kullanılırken, diğer damar segmentlerinin hepsinde telli miyografya elde edilen sonuçlar ile CO yanıtları değerlendirildi. Her organın damar yatağında izole edilmesi mümkün olan ve telli miyografya incelenebilecek en alt damar segmenti düzeyine kadar inildi.

Farklı Damar Yataklarında CO Yanıtları

Organların damar yatağına özel olarak yaklaşım yapıldığında tüm sonuçların özet olarak verilmeye çalışıldığı Tablo 4.25.'ten de görülebileceği gibi, endojen CO'in katkısı beyin ve akciğer dokusunda oldukça ön plana çıkmaktadır. Bunun yanında mezenter, böbrek, çizgili kas, kalp dokularında da CO'in belli oranda vasküler tonusa katkısı olmaktadır.

CO'in aortta tonusuna yaptığı katkı incelendiğinde, torasik aortta daha fazla olduğu izlenmektedir. İletim tipi damarların en büyüğü olan aortta CO'in gevşetici etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [9, 144, 161-162]. Doğrudan aorttan ayrılan kalp, mezenter ve renal arter damar yataklarının yanıtlarında birbirine oldukça benzer idi. Kalp, mezenter ve renal damar yataklarının ana dalları, CO üretimini inhibe edilmesi sonucu fenilefrin yanıtlarında, sırasıyla % 6, % 21 ve % 4,5 civarında istatistiksel olarak anlamlı artış göstermeleri, bu damar segmentlerinde vasküler tonus düzenlenmesine CO'in belirli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Ancak her üç damar yatağının ilerleyen dallarında, yani iletim tipinden, direnç arterlerine gidildikçe CO'in vasküler tonusa katılımının ortadan kalktığı izlenmektedir. Ancak bizim sonuçlarımıza göre bazal fizyolojik koşullarda, her üç damar yatağının direnç arterleri kısmında CO'in bir katkısı olmamasına rağmen, siroz, hipoksi, hipertansiyon gibi durumlarda ilgili damar yatağında direnç damarları düzeyinde de katkısının önemli düzeye geldiği çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir [163-165].

Literatürde birçok araştırmada gösterildiği [13, 166-168] gibi bizim çalışmamızda da CO'in vasküler tonusa en önemli katkıda bulunduğu damar yatağı olarak, pial arter sonuçları ile incelenen beyin dokusu olduğu görülmüştür. CO'in pial arterdeki endojen katkısını incelemek için ortama konan HO inhibitörü CrMP, banyoya herhangi bir vazokonstrüktör mediatör koymadan bile damarların pial arterlerin bazal tonusunu oldukça yükselterek maksimal kasılma yanıtlarına yaklaştırmıştır. HO inhibisyonu sonrası bazal tonusun artmasından dolayı, serotonin kasılma yanıtı, bazal ile maksimal yanıt birbirine yakın olduğu için, inhibisyonuz protokolle karşılaştırma yapılabilecek düzeyde olamamıştır. Bu durumu ekarte edebilmek için, HO inhibisyonu yapılmadan serotonin doz-yanıtlarının alındığı protokolün bazal yanıtları, HO inhibisyonu yapılan bazal yanıtlarına denk gelecek şekilde submaksimal dozda noradrenalin ile yükseltilmiştir. Böylece pial arterde serotonin doz-yanıtları HO inhibisyonu olmadan ve olduktan sonra kıyaslanabilir duruma gelmiştir. Hem yalnızca banyoya CrMP eklenmesi ile bazal tonsun çok artması, hem de CrMP ile HO inhibisyonu sonrası pial arterlerde, serotoninin kasılma yanıtlarının %52 düzeyinde artması, beyin dokusunda CO'in vasküler tonusu düzenlemede oldukça önemli olduğunu göstermektedir.

Akciğer dokusunun vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli bir yeri olduğu daha önceki çalışmalarla da saptanan CO, bizim çalışmamızda da benzer sonuçları verdi [169]. Ana pulmoner arterde çok daha belirgin olmak üzere, pulmoner arterde de CO endojen üretiminin ile birçok damar yatağına göre akciğer dokusunda ön planda olduğu gözlenmiştir. Fakat akciğer dokusunun derinliğine doğru yol aldıkça, CO'in endojen üretiminin bazal fizyolojik koşullarda katkısının olmadığı saptanmıştır.

CO'in damarlar üzerindeki gevşetici etkisi çok iyi bilinmesine rağmen, gracilis çizgili kası arterlerinde tam tersi olacak şekilde kasıcı etkinin [170-171] literatürde bulunması, bizi bu dokuyu daha dikkatli incelemeye yöneltti. CO'in gracilis direnç damarlarında vazokonstrüksiyon yaptığını gösteren her iki çalışmada da, CO'in ekzojen uygulaması söz konusudur. Yine aynı grup araştırmacılar gracilis kası damarlarında, HO inhibitörü CrMP ile kasılma olduğunu, dolayısıyla endojen CO'in gevşetici etkisi olduğunu gösteren sonuçları da vardır [172]. Gracilis damarlarındaki çelişkili sonuçlardan dolayı CO'in etkisini iki farklı çizgili kas dokusu damar yatağında çalıştık. Gastroknemius kası damar yatağı incelendiğinde, endojen CO yanıtlarının, incelenen diğer organların damar yataklarına oldukça benzer olduğu görülmektedir. Gastroknemius iletim arterinde, CO üretiminin vasküler tonusa katkısı varken, direnç damarları olan 1 ve 2. dal gastroknemius

arterlerinde ise herhangi bir katkısı yoktu. Ancak gracilis direnç damarının köken aldığı ve gracilis kası damar yatağının iletim arterleri olarak kabul edebileceğimiz femoral arter ve muskuler dalında, aynı gracilis direnç arteri gibi vasküler tonusa anlamlı bir endojen CO katkısı olmadı. Bizim sonuçlarımız da diğer damar yataklarına göre farklı bir görünüm sergileyen gracilis kası damar yatağına ait literatürdeki çelişkili sonuçların olmasıyla örtüşmektedir. Bu çelişkili durum CO ile nitrik oksit sentaz enzimi arasındaki etkileşim veya damar duvarına ulaşan CO miktarının farklılığına bağlanmaktadır, ancak diğer damar yatakları da göz önüne alındığında bu açıklamaların yeterli olduğu görünmemektedir. CO'in vasküler fonksiyonlara etkisi açısından gracilis damar yatağı daha detaylı incelemelere gereksinim duymaktadır.

Organizmada CO oluşumu, ihmal edilebilir non-enzimatik yol göz önüne alınmazsa, HO enzimleri aracılığıyla olmaktadır. Daha önce de söz edildiği gibi, indüklenebilir form olan HO-1 izoformunun birçok uyaran ile seviyesi artmakta ve CO üretimine önemli katkıda bulunmaktadır. Az sayıda araştırma farklı sonuç verse de [124], HO-1 izoformunun protein düzeyi herhangi bir uyaran yoksa, çok fazla eritrosit yıkımının olduğu karaciğer ve dalak dışında, bazal fizyolojik koşullarda ölçülebilir sınırının altındadır [19, 173-177]. Beyin gibi CO'in önemli düzeyde vasküler tonusa katkısının olduğu dokularda bile HO-1'in vasküler yanıtlara katkısı olmadığı belirtilmektedir [90]. Çalışmamızda yalnızca kontrol hayvanlar kullanıldığı ve herhangi bir uyaran veya patolojik süreç kullanılmadığı için yaptığımız ön çalışmada HO-1 izoformu proteinini biz de saptayamadık. Bundan dolayı sonuçlarımızda HO-2 izoformu düzeyine yer verdik.

Damar segmentlerinin Western blot analizi ile belirlenen HO-2 enzimi protein miktarlarının, CO'in endojen katkısının en fazla olduğu damar segmentleri olan pial arter ve ana pulmoner arterde olduğu görüldü. Bunun yanında kalp ve pulmoner damar yataklarından alınan örneklerin HO-2 protein miktarları, kendi içlerinde endojen CO yanıtları ile uyumlu sonuçlar verdi. Ancak mezenter, böbrek ve çizgili kas dokularından alınan damar numunelerinden saptanan HO-2 protein miktarı, yine aynı damar segmentlerinin CO'in vasküler tonusa katkısı ile birebir örtüşmüyordu. Bu dokularda endojen CO'in vasküler tonusa anlamlı bir etkisinin olmadığı saptanan mezenter arter 1. dal, renal arter 2. dal, gastroknemius arteri 1 ve 2. dallarında, önemli ölçüde HO-2 proteini olduğu görüldü. HO-2 enzimi protein düzeyi sonuçları ile endojen CO'in vasküler tonusuna katkısı birlikte değerlendirildiğinde, sonuçlar birbiri ile tam örtüşmemektedir. HO-2 protein düzeyi her zaman aktiviteyi yansıtmamaktadır, bu durum HO-2 aktivitesinin çeşitli mekanizmalarla anlık olarak değişime uğramasına ve hem substratının tedarikine bağlıdır. Hücre içi "hem" üretimi hız kısıtlayıcı basamağının δ -maninolevülinik asit sentaz enziminin olduğu, içinde mitokondrial ve sitoplazmik çeşitli reaksiyonların bulunduğu çok basamaklı bir düzenlemeyi içerir [90]. HO-2 aktivitesi CO üretmek için kullanacağı hem substratına bağımlıdır. Yeterli miktarda hem olması yanında, HO-2 enziminin aktivitesi posttranslasyonel modifikasyon ile de düzenlenmektedir. Bu düzenleme Ca^{+2} /calmodulin'e bağımlı HO-2 proteininin fosforilasyonunu içermektedir [167]. Ayrıca NO'ye bağlı olarak ta HO-2 aktivitesi çok hızlı düzenlenebilmektedir. NO, enzimin hem regülatuar motiflerine bağlandığında, HO-2 aktivitesi inhibe olmaktadır

[103]. Son olarak, HO-2 aktivitesinin NADPH oksidaz 4 enzimine bağılı olarak, beyin damarları ve beyin damarları endotel hücrelerinde redoks-bağımlı mekanizma ile düzenlenebildiği gösterilmiştir [103]. Fizyolojik bazal koşullarda damar dokusunda bulunan HO-2 enzim proteini miktarı tam bir gösterge olmadığından, CO'in endojen vasküler kontrole katkısı substrat miktarı ve HO-2 aktivitesi üzerinden değerlendirilmelidir.

Farklı Damar Çaplarında CO Yanıtları

Bu çalışmanın amaçlarından bir diğeri, endojen üretilen CO'in vasküler kontrole etkisinin organların damar yatağındaki durumu yanında, diğeri bir bakış açısı da, etkili olduğu damar segmentlerinin çapına göre değerlendirmektir. Bu bakış açısı ile değerlendirildiğinde, endojen CO üretiminin iletim tipi damarlarda etkisinin ön planda olduğu izlenmektedir. Mezenter, renal, kalp, pulmoner, çizgili kas (gastroknemius kası) organların damar yataklarının iletim arterlerinin hepsinde ve aortta, CO'in vasküler kontrole katkısı istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde saptandı. Aynı zamanda bizim sonuçlarımıza göre bu damar yataklarının direnç damarlarında ise, endojen CO'in katkısının olmadığı görüldü. Bu bakış açısına göre iki damar segmentinde uyumsuzluk vardı. İlki gracilis kası damar yatağının iletim damarları olan femoral arter ve muskuler dalda anlamlı düzeyde endojen CO üretiminin vasküler tonusa katkısı yoktu. Daha önce de söz edildiği gibi bu damar yatağı CO yanıtları açısından farklılık göstermektedir. Diğeri farklılık ise beyin dokusu damar yatağına ait olarak incelenen ve bir direnç damarı olan pial arterde oldu. Vasküler yanıtları incelenen diğeri direnç arterlerinde CO'in hiç katkısı yokken, pial arterin vasküler tonusunun kontrolünde CO çok önemli yer tutmaktadır. Yapılan birçok araştırmada serebral kan akımının kontrolünde CO'in rolü net olarak gösterilmiştir [90, 167].

Dışarıdan uygulanan CO'e verilen gevşeme yanıtlarına genel olarak bakıldığında hemen tüm damar segmentlerinde etkin bir vazodilatasyon olduğu görülmektedir. CO donörü CORM ile ekzojen CO uygulamasının, damar yataklarına göre değişse de, submaksimal doz fenilefrin veya serotonin sonrası ortalama %40-50 düzeyinde gevşeme yaptığı izlenmektedir. Sonuçlarımızdan izlenen dışarıdan uygulanan CO'in organizmanın genelinde iletim ve özellikle direnç damarlarında da etkin gevşeme yanıtı oluşturması, hipertansiyon gibi kan basıncının kontrol altına alınması gereken durumlarda ilaç olarak kullanılma olasılığını akla getirmektedir. Literatürde de bu konuda çeşitli yaklaşımlar olduğu görülmektedir [6, 18, 124, 152]. Ekzojen CO uygulaması böbrek damar yatağında, diğeri organ damar yataklarına göre bir miktar daha düşük saptanmıştır. Fakat ekzojen CO verilmesine en az gevşeme yanıtı veren damar segmenti gracilis arteri oldu. Endojen damar yanıtlarında da, diğeri damar yataklarına göre farklı sonuçlar veren gracilis kası damar yatağının CO ile ilişkisi tüm açılardan farklılık göstermektedir. Bundan dolayı herhangi bir araştırmanın amacı gracilis damar yatağındaki CO'in çelişkili sonuçlarını araştırmak değil ise, CO'in organizmada vasküler kontrole etkisinin incelendiği araştırma ise, gracilis arterinin kullanılmaması daha iyi olacaktır.

CO arterler üzerindeki gevşetici etkisini temel olarak sGC enzimi aracılığıyla üretimini arttırdığı cGMP veya kalsiyum bağımlı K⁺ kanalları üzerinden yapmaktadır [90, 153]. Ekzojen CO uygulaması protokolünde, damar segmentlerinin

CO donörü CORM'a verdikleri gevşeme yanıtı sonrası, o damar segmentinde CO'nun hangi mekanizma ile gevşeme yaptığını ortaya koymak için sGC inhibitörü ODQ veya K⁺ kanal inhibitörü TEA kullanıldı. CO'in vazodilatör etkisinin mekanizması açısından sonuçlarımız değerlendirildiğinde, herhangi bir damar yatağına özgünlükten ziyade, damar çapına göre farklılaşma vardı. cGMP'nin yolağının damar yanıtlarında gevşemeye katkısının olduğu damar segmenti, K⁺ kanallarının katkıda bulunduğu segmente göre oldukça daha azdı. cGMP aort halkalarında, ana mezenter ve renal damarlarda, gastroknemius kası iletim arterinde, akciğer ve kalp dokusu büyük damarlarında CO aracılı gevşemeye katkıda bulunuyordu. Ayrıca dikkat çeken bir başka durumda cGMP gevşemede etkin olduğu damar segmentlerin hiç birinde gevşemeden tek başına sorumlu değildi. Kalsiyum ile aktive K kanallarının ise hemen tüm damar segmentlerinde CO'e verilen gevşeme yanıtlarına katkısı oldu. K⁺ kanalları direnç damarlarındaki CO'e bağlı gevşeme yanıtından tek başına sorumlu iken, büyük damarlarda cGMP ile birlikte etkin olduğu göze çarpmaktadır. Bazı yayınlarda CO'in vazodilatör etkisinin aort gibi büyük damarlarda cGMP ile ortaya çıkarken, direnç damarlarında kalsiyumla aktive K⁺ kanalları aracılığıyla oluştuğu yer almaktadır [6, 152]. Ancak bu yorumlar yapılan farklı çalışmalardan köken almaktadır ve karşılaştırmalı bir çalışmaya dayanmamaktadır. CO'in etki mekanizmasında yer alan sGC'in etkili olabilmesi için BK_{Ca} kanallarının gerekli olduğu da ileri sürülmektedir [27]. BK_{Ca} kanalları inhibisyonu ile CO'in cGMP bağımlı gevşetici etkisinin de önüne geçilebilmektedir [13, 132, 146-148]. Bizim sonuçlarımız üzerinden CO'in etki mekanizması hakkında genel bir değerlendirme yapılacak olunursa, CO'in gevşetici etkisi 600 µm üzeri damarlarda cGMP ve kalsiyumla aktive K⁺ kanalları aracılığıyla, 600 µm altındaki damarlarda ise yalnızca K⁺ kanalları ile ortaya çıkmaktadır.

Organizmadaki çeşitli damar yataklarının tonusunun düzenlenmesinde CO'in katkısını incelediğimiz çalışmamızın sonuçlarından, ileride yapılacak CO vasküler tonus konulu araştırmalara yol gösterebilecek önemli veriler elde edilmiştir. Aynı çalışmada hem bir çok farklı organın damar yatağının incelenmesi ve bu organlara ait damar yataklarının iletim arterlerinden direnç damarlarına kadar incelenmesi kıyaslama yapabilme imkanını vermektedir. CO'in vasküler tonusa etkisi iletim tipi damarlarda varken, direnç damarlarında yoktur. Bu durum beyin damarlarında geçerli değildir ve endojen CO oluşumu bir direnç damarı olan pial arterin vasküler tonusunun düzenlenmesine önemli düzeyde katkı yapmaktadır. Endojen CO oluşumunun damar üzerindeki etkisinde dikkat çekici diğer bir durumda, HO-2 enzimi protein miktarının bazal fizyolojik koşullarda CO'in damarların üzerindeki etkisini yansıtmadığıdır. Gevşemeye CO'in hiç etkisinin olmadığı gracilis arteri yanıtları dışında, ekzojen verilen CO'in tüm damar yataklarında etkin bir vazodilatasyona neden olmaktadır. CO aracılı gevşemenin mekanizmasında 600 µm'den küçük damarlarda kalsiyumla aktive K⁺ kanalları, 600 µm'den büyük damarlarda ise hem cGMP ve hem de kalsiyumla aktive K⁺ kanallarının sorumlu olduğu izlenmiştir. Çeşitli patolojik süreçler veya uyaranlar sonucu üretimi değişen CO'in vasküler tonusa etkisinin de kıyaslamalı olarak çalışılması, CO'in kan basıncı kontrolündeki etkisi hakkında daha ayrıntılı sonuçlar alınmasını sağlayacaktır.

SONUÇLAR

Çalışmamız, CO'in damarlardaki endojen katkısını ve damar gevşemesindeki etki mekanizmasını geniş kapsamlı olarak ortaya koyan ilk çalışmadır. CO damar gevşetici etkisini, direnç tipi arterlerden ziyade, daha çok iletim tipi arteriyel damar segmentlerinde göstermektedir. Bunun yanında CO'in organa özel damar ağacı yanıtları incelendiğinde, öncelikle serebral ve akciğer vasküler tonusuna katkısının diğer organ damar yataklarına göre daha fazla olduğu saptanmıştır. CO'in düz kasta gevşetici etkisini, çoğunlukla çapı yaklaşık olarak 600 µm den küçük olan arteriyel damarlarda K⁺ kanalları ile gösterirken, daha büyüklerde ise hem K⁺ kanalları ve cGMP aracılığıyla oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Griffith, T.M., Modulation of blood flow and tissue perfusion by endothelium-derived relaxing factor. *Exp Physiol*, 1994. 79(6): p. 873-913.
2. Klabunde, R.E., *Organ Blood Flow*, in *Cardiovascular Physiology Concepts*, B. Sun, Editor. 2011, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 142-147.
3. Triggle, C.R. and H. Ding, The endothelium in compliance and resistance vessels. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011. 3: p. 730-44.
4. Vallance, P., Endothelial regulation of vascular tone. *Postgrad Med J*, 1992. 68(803): p. 697-701.
5. Bellien, J., C. Thuillez, and R. Joannides, Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans. *Fundam Clin Pharmacol*, 2008. 22(4): p. 363-77.
6. Durante, W., F.K. Johnson, and R.A. Johnson, Role of carbon monoxide in cardiovascular function. *J Cell Mol Med*, 2006. 10(3): p. 672-86.
7. Mustafa, M.R. and E.J. Johns, The role of haem oxygenase in renal vascular reactivity in normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens*, 2001. 19(6): p. 1105-11.
8. Wang, R., Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. *Can J Physiol Pharmacol*, 1998. 76(1): p. 1-15.
9. Furchgott, R.F. and D. Jothianandan, Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels*, 1991. 28(1-3): p. 52-61.
10. Lin, H. and J.J. McGrath, Vasodilating effects of carbon monoxide. *Drug Chem Toxicol*, 1988. 11(4): p. 371-85.
11. Steinhorn, R.H., F.C. Morin, 3rd, and J.A. Russell, The adventitia may be a barrier specific to nitric oxide in rabbit pulmonary artery. *J Clin Invest*, 1994. 94(5): p. 1883-8.
12. Thorup, C., et al., Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol*, 1999. 277(6 Pt 2): p. F882-9.
13. Leffler, C.W., et al., Carbon monoxide and cerebral microvascular tone in newborn pigs. *Am J Physiol*, 1999. 276(5 Pt 2): p. H1641-6.

14. Zakhary, R., et al., Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(2): p. 795-8.
15. Christodoulides, N., et al., Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. *Circulation*, 1995. 91(9): p. 2306-9.
16. Morita, T., et al., Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(5): p. 1475-9.
17. Zhang, F., et al., Vasoregulatory function of the heme-heme oxygenase-carbon monoxide system. *Am J Hypertens*, 2001. 14(6 Pt 2): p. 62S-67S.
18. Wu, L. and R. Wang, Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev*, 2005. 57(4): p. 585-630.
19. Ryter, S.W., J. Alam, and A.M. Choi, Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*, 2006. 86(2): p. 583-650.
20. Christou, H., et al., Prevention of hypoxia-induced pulmonary hypertension by enhancement of endogenous heme oxygenase-1 in the rat. *Circ Res*, 2000. 86(12): p. 1224-9.
21. Ndisang, J.F., W. Zhao, and R. Wang, Selective regulation of blood pressure by heme oxygenase-1 in hypertension. *Hypertension*, 2002. 40(3): p. 315-21.
22. Utz, J. and V. Ullrich, Carbon monoxide relaxes ileal smooth muscle through activation of guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol*, 1991. 41(8): p. 1195-201.
23. Motterlini, R., et al., Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo. *Circ Res*, 1998. 83(5): p. 568-77.
24. Porter, V.A., et al., Frequency modulation of Ca²⁺ sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am J Physiol*, 1998. 274(5 Pt 1): p. C1346-55.
25. Ramos, K.S., H. Lin, and J.J. McGrath, Modulation of cyclic guanosine monophosphate levels in cultured aortic smooth muscle cells by carbon monoxide. *Biochem Pharmacol*, 1989. 38(8): p. 1368-70.
26. Wang, R., Z. Wang, and L. Wu, Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br J Pharmacol*, 1997. 121(5): p. 927-34.

27. Wang, R., L. Wu, and Z. Wang, The direct effect of carbon monoxide on KCa channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch*, 1997. 434(3): p. 285-91.
28. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991. 43(2): p. 109-42.
29. Campbell, W.B. and J.R. Falck, Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension*, 2007. 49(3): p. 590-6.
30. Mattson, D.L. and F. Wu, Nitric oxide synthase activity and isoforms in rat renal vasculature. *Hypertension*, 2000. 35(1 Pt 2): p. 337-41.
31. Shimokawa, H., et al., The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1996. 28(5): p. 703-11.
32. Bern, R.M., Kalp, Kan Damarları ve Kana Genel Bakış, in *Fizyoloji*, A. Aktaş, Editor. 2008, Mosby: ankara. p. 365-373.
33. Klabunde, R.E., Cellular Structure and Function, in *Cardiovascular Physiology Concepts*, B. Sun, Editor. 2011, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 50-52.
34. Klabunde, R.E., Vascular Function, in *Cardiovascular Physiology Concepts*, B. Sun, Editor. 2011, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 91-93.
35. Bagher, P. and S.S. Segal, Regulation of blood flow in the microcirculation: role of conducted vasodilation. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011. 202(3): p. 271-84.
36. Klabunde, R.E., Neurohumoral Control of the Heart and Circulation, in *Cardiovascular Physiology Concepts*, B. Sun, Editor. 2011, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 118-121.
37. Hirst, G.D. and F.R. Edwards, Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev*, 1989. 69(2): p. 546-604.
38. Monos, E., V. Berczi, and G. Nadasy, Local control of veins: biomechanical, metabolic, and humoral aspects. *Physiol Rev*, 1995. 75(3): p. 611-66.
39. Ganong, W.F., Kardiyovaküler Düzenleyici Mekanizmalar, in *Tıbbi Fizyoloji*, W.F. Ganong, Editor. 2002, McGraw-Hill: Ankara. p. 578.
40. Clerico, A., et al., Thirty years of the heart as an endocrine organ: physiological role and clinical utility of cardiac natriuretic hormones. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. 301(1): p. H12-20.
41. Griendling, K.K., Biology of the Vessel Wall, in *Hurst's The Heart*, V. Fuster, Editor. 2007, The McGraw-Hill Companies. p. 137-139.

42. Deussen, A., et al., Metabolic coronary flow regulation--current concepts. *Basic Res Cardiol*, 2006. 101(6): p. 453-64.
43. Erlichman, J.S., J.C. Leiter, and A.V. Gourine, ATP, glia and central respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol*, 2010. 173(3): p. 305-11.
44. Miller, A.A., G.R. Drummond, and C.G. Sobey, Reactive oxygen species in the cerebral circulation: are they all bad? *Antioxid Redox Signal*, 2006. 8(7-8): p. 1113-20.
45. Oberleithner, H., K. Kusche-Vihrog, and H. Schillers, Endothelial cells as vascular salt sensors. *Kidney Int*, 2010. 77(6): p. 490-4.
46. Manolis, A.J., et al., Cardioprotective properties of bradykinin: role of the B(2) receptor. *Hypertens Res*, 2010. 33(8): p. 772-7.
47. Duka, A., et al., Angiotensin-converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarct: role of the kinin B1 and B2 receptors. *Hypertension*, 2008. 51(5): p. 1352-7.
48. O'Kane, K.P., et al., Local L-NG-monomethyl-arginine attenuates the vasodilator action of bradykinin in the human forearm. *Br J Clin Pharmacol*, 1994. 38(4): p. 311-5.
49. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980. 288(5789): p. 373-6.
50. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987. 327(6122): p. 524-6.
51. Huang, P.L., et al., Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, 1995. 377(6546): p. 239-42.
52. Atochin, D.N. and P.L. Huang, Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction. *Pflugers Arch*, 2010. 460(6): p. 965-74.
53. Cannon, R.O., 3rd, Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem*, 1998. 44(8 Pt 2): p. 1809-19.
54. Amezcua, J.L., et al., Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br J Pharmacol*, 1989. 97(4): p. 1119-24.
55. Zoccali, C., The endothelium as a target in renal diseases. *J Nephrol*, 2007. 20 Suppl 12: p. S39-44.

56. Toda, N. and T. Okamura, Modulation of renal blood flow and vascular tone by neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *J Vasc Res*, 2011. 48(1): p. 1-10.
57. Fleming, I. and R. Busse, Vascular cytochrome P450 in the regulation of renal function and vascular tone: EDHF, superoxide anions and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant*, 2001. 16(7): p. 1309-11.
58. Little, T.L., J. Xia, and B.R. Duling, Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall. *Circ Res*, 1995. 76(3): p. 498-504.
59. Coleman, H.A., M. Tare, and H.C. Parkington, Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004. 31(9): p. 641-9.
60. Edwards, L.A., Symposium on diarrhea. 6. Infectious diarrhea. *Can Med Assoc J*, 1977. 116(7): p. 753-5.
61. Moran, J.H., et al., Cytotoxicity of linoleic acid diols to renal proximal tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997. 146(1): p. 53-9.
62. Bylund, J., et al., Cytochromes P450 with bisallylic hydroxylation activity on arachidonic and linoleic acids studied with human recombinant enzymes and with human and rat liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998. 284(1): p. 51-60.
63. Miura, H. and D.D. Gutterman, Human coronary arteriolar dilation to arachidonic acid depends on cytochrome P-450 monooxygenase and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ Res*, 1998. 83(5): p. 501-7.
64. Archer, S.L., et al., Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels. *Circulation*, 2003. 107(5): p. 769-76.
65. Coats, P., et al., Endothelium-derived hyperpolarizing factor : identification and mechanisms of action in human subcutaneous resistance arteries. *Circulation*, 2001. 103(12): p. 1702-8.
66. Imig, J.D., Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. 289(3): p. F496-503.
67. Larsen, B.T., W.B. Campbell, and D.D. Gutterman, Beyond vasodilatation: non-vasomotor roles of epoxyeicosatrienoic acids in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. 28(1): p. 32-8.

68. Gauthier, K.M., et al., Roles of epoxyeicosatrienoic acids in vascular regulation and cardiac preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007. 50(6): p. 601-8.
69. Parkington, H.C., H.A. Coleman, and M. Tare, Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol Res*, 2004. 49(6): p. 509-14.
70. Nasjletti, A., Arthur C. Corcoran Memorial Lecture. The role of eicosanoids in angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension*, 1998. 31(1 Pt 2): p. 194-200.
71. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 291(3): p. H985-1002.
72. Miyata, N. and R.J. Roman, Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system. *J Smooth Muscle Res*, 2005. 41(4): p. 175-93.
73. Gumkowski, F., et al., Heterogeneity of mouse vascular endothelium. In vitro studies of lymphatic, large blood vessel and microvascular endothelial cells. *Blood Vessels*, 1987. 24(1-2): p. 11-23.
74. Crackower, M.A., et al., Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, 2002. 417(6891): p. 822-8.
75. Danilczyk, U. and J.M. Penninger, Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res*, 2006. 98(4): p. 463-71.
76. Attina, T., et al., Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart*, 2005. 91(6): p. 825-31.
77. Luscher, T.F. and R.R. Wenzel, Endothelin and endothelin antagonists: pharmacology and clinical implications. *Agents Actions Suppl*, 1995. 45: p. 237-53.
78. Simonson, M.S. and M.J. Dunn, Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J*, 1990. 4(12): p. 2989-3000.
79. Haldane, J., The Relation of the Action of Carbonic Oxide to Oxygen Tension. *J Physiol*, 1895. 18(3): p. 201-17.
80. Sjostrand, T., The formation of carbon monoxide by the decomposition of haemoglobin in vivo. *Acta Physiol Scand*, 1952. 26(4): p. 338-44.
81. Karuzina, II, et al., Heme and apoprotein modification of cytochrome P450 2B4 during its oxidative inactivation in monooxygenase reconstituted system. *Free Radic Biol Med*, 1999. 26(5-6): p. 620-32.
82. Ryter, S.W. and L.E. Otterbein, Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays*, 2004. 26(3): p. 270-80.

83. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem*, 1969. 244(23): p. 6388-94.
84. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1968. 61(2): p. 748-55.
85. Maines, M.D., G.M. Trakshel, and R.K. Kutty, Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem*, 1986. 261(1): p. 411-9.
86. McCoubrey, W.K., Jr., T.J. Huang, and M.D. Maines, Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem*, 1997. 247(2): p. 725-32.
87. Ryter, S.W. and R.M. Tyrrell, The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*, 2000. 28(2): p. 289-309.
88. Yoshida, T. and C.T. Migita, Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *J Inorg Biochem*, 2000. 82(1-4): p. 33-41.
89. Kikuchi, G., T. Yoshida, and M. Noguchi, Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 338(1): p. 558-67.
90. Leffler, C.W., H. Parfenova, and J.H. Jaggar, Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. 301(1): p. H1-H11.
91. Chen, Y.H., S.F. Yet, and M.A. Perrella, Role of heme oxygenase-1 in the regulation of blood pressure and cardiac function. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. 228(5): p. 447-53.
92. Nguyen, T., P.J. Sherratt, and C.B. Pickett, Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003. 43: p. 233-60.
93. Lavrovsky, Y., M.L. Schwartzman, and N.G. Abraham, Novel regulatory sites of the human heme oxygenase-1 promoter region. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. 196(1): p. 336-41.
94. Kronke, G., et al., Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem*, 2003. 278(51): p. 51006-14.
95. Abraham, N.G., et al., Differential effect of cobalt protoporphyrin on distributions of heme oxygenase in renal structure and on blood pressure in SHR. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2002. 48(8): p. 895-902.

96. Dwyer, B.E., R.N. Nishimura, and S.Y. Lu, Differential expression of heme oxygenase-1 in cultured cortical neurons and astrocytes determined by the aid of a new heme oxygenase antibody. Response to oxidative stress. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995. 30(1): p. 37-47.
97. Foresti, R., et al., Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J*, 1999. 339 (Pt 3): p. 729-36.
98. Maines, M.D., Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J*, 1988. 2(10): p. 2557-68.
99. Maines, M.D., The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2000. 46(3): p. 573-85.
100. Boehning, D., et al., Heme oxygenase-2 is activated by calcium-calmodulin. *J Biol Chem*, 2004. 279(30): p. 30927-30.
101. Leffler, C.W., et al., Nitric oxide increases carbon monoxide production by piglet cerebral microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289(4): p. H1442-7.
102. Leffler, C.W., et al., Mechanism of glutamate stimulation of CO production in cerebral microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(1): p. H74-80.
103. Ding, Y., W.K. McCoubrey, Jr., and M.D. Maines, Interaction of heme oxygenase-2 with nitric oxide donors. Is the oxygenase an intracellular 'sink' for NO? *Eur J Biochem*, 1999. 264(3): p. 854-61.
104. Maulik, N., et al., Nitric oxide--a retrograde messenger for carbon monoxide signaling in ischemic heart. *Mol Cell Biochem*, 1996. 157(1-2): p. 75-86.
105. Morley, P., et al., Evidence that functional glutamate receptors are not expressed on rat or human cerebromicrovascular endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998. 18(4): p. 396-406.
106. Leffler, C.W., et al., Regulation of CO production in cerebral microvessels of newborn pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(1): p. H292-7.
107. Kikuchi, G. and N. Hayashi, Regulation by heme of synthesis and intracellular translocation of delta-aminolevulinate synthase in the liver. *Mol Cell Biochem*, 1981. 37(1): p. 27-41.
108. May, B.K., et al., Molecular regulation of 5-aminolevulinate synthase. Diseases related to heme biosynthesis. *Mol Biol Med*, 1990. 7(5): p. 405-21.
109. Basuroy, S., et al., Nox4 NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, via endogenous carbon monoxide, promote survival of brain endothelial cells during TNF-alpha-induced apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011. 300(2): p. C256-65.

110. Yi, L., et al., Heme regulatory motifs in heme oxygenase-2 form a thiol/disulfide redox switch that responds to the cellular redox state. *J Biol Chem*, 2009. 284(31): p. 20556-61.
111. Otterbein, L.E., et al., Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*, 2000. 6(4): p. 422-8.
112. Pae, H.O., et al., Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol*, 2004. 172(8): p. 4744-51.
113. Brouard, S., et al., Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med*, 2000. 192(7): p. 1015-26.
114. Petrache, I., et al., Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. 278(2): p. L312-9.
115. Zhang, X., et al., Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury. *J Biol Chem*, 2003. 278(24): p. 22061-70.
116. Brouard, S., et al., Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 2002. 277(20): p. 17950-61.
117. Morita, T. and S. Kourembanas, Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest*, 1995. 96(6): p. 2676-82.
118. Morita, T., et al., Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1997. 272(52): p. 32804-9.
119. Otterbein, L.E., et al., Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med*, 2003. 9(2): p. 183-90.
120. Song, R., et al., Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. 27(5): p. 603-10.
121. Taille, C., et al., Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle. *J Biol Chem*, 2005. 280(27): p. 25350-60.

122. Alkadhi, K.A., et al., Retrograde carbon monoxide is required for induction of long-term potentiation in rat superior cervical ganglion. *J Neurosci*, 2001. 21(10): p. 3515-20.
123. Maines, M.D., The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997. 37: p. 517-54.
124. Ndisang, J.F., H.E. Tabien, and R. Wang, Carbon monoxide and hypertension. *J Hypertens*, 2004. 22(6): p. 1057-74.
125. Hou, S., et al., The RCK1 high-affinity Ca²⁺ sensor confers carbon monoxide sensitivity to Slo1 BK channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(10): p. 4039-43.
126. Wang, R. and L. Wu, The chemical modification of KCa channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1997. 272(13): p. 8222-6.
127. Yi, L., J.T. Morgan, and S.W. Ragsdale, Identification of a thiol/disulfide redox switch in the human BK channel that controls its affinity for heme and CO. *J Biol Chem*, 2010. 285(26): p. 20117-27.
128. Telezhkin, V., et al., Cysteine residue 911 in C-terminal tail of human BK(Ca)alpha channel subunit is crucial for its activation by carbon monoxide. *Pflugers Arch*, 2011. 461(6): p. 665-75.
129. Jaggar, J.H., et al., Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ Res*, 2005. 97(8): p. 805-12.
130. Balla, G., et al., Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest*, 1991. 64(5): p. 648-55.
131. Horrigan, F.T., S.H. Heinemann, and T. Hoshi, Heme regulates allosteric activation of the Slo1 BK channel. *J Gen Physiol*, 2005. 126(1): p. 7-21.
132. Jaggar, J.H., et al., Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca²⁺ sparks to Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ Res*, 2002. 91(7): p. 610-7.
133. Xi, Q., et al., Carbon monoxide activates KCa channels in newborn arteriole smooth muscle cells by increasing apparent Ca²⁺ sensitivity of alpha-subunits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 286(2): p. H610-8.
134. Williams, S.E., et al., Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science*, 2004. 306(5704): p. 2093-7.
135. Perez, G.J., A.D. Bonev, and M.T. Nelson, Micromolar Ca(2+) from sparks activates Ca(2+)-sensitive K(+) channels in rat cerebral artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. 281(6): p. C1769-75.

136. Zhao, G., et al., Type 1 IP₃ receptors activate BKCa channels via local molecular coupling in arterial smooth muscle cells. *J Gen Physiol*, 2010. 136(3): p. 283-91.
137. Jin, H.F., et al., Interaction between hydrogen sulfide/cystathionine gamma-lyase and carbon monoxide/heme oxygenase pathways in aortic smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2006. 27(12): p. 1561-6.
138. Hosein, S., et al., An extracellular source of heme can induce a significant heme oxygenase mediated relaxation in the rat aorta. *Can J Physiol Pharmacol*, 2002. 80(8): p. 761-5.
139. Marks, G.S., et al., Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends Pharmacol Sci*, 1991. 12(5): p. 185-8.
140. Kim, H.P., et al., Caveolin-1 expression by means of p38beta mitogen-activated protein kinase mediates the antiproliferative effect of carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(32): p. 11319-24.
141. Kimura, H., Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Mol Neurobiol*, 2002. 26(1): p. 13-9.
142. Koehler, R.C. and R.J. Traystman, Cerebrovascular effects of carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal*, 2002. 4(2): p. 279-90.
143. Abraham, N.G., et al., Modulation of cGMP by human HO-1 retrovirus gene transfer in pulmonary microvessel endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. 283(5): p. L1117-24.
144. Sammut, I.A., et al., Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *Br J Pharmacol*, 1998. 125(7): p. 1437-44.
145. Ren, Y., et al., Mechanisms of carbon monoxide attenuation of tubuloglomerular feedback. *Hypertension*, 2012. 59(6): p. 1139-44.
146. Kaide, J.I., et al., Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors. *J Clin Invest*, 2001. 107(9): p. 1163-71.
147. Li, A., et al., Astrocyte-derived CO is a diffusible messenger that mediates glutamate-induced cerebral arteriolar dilation by activating smooth muscle Cell KCa channels. *Circ Res*, 2008. 102(2): p. 234-41.
148. Naik, J.S. and B.R. Walker, Heme oxygenase-mediated vasodilation involves vascular smooth muscle cell hyperpolarization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(1): p. H220-8.

149. Ushiyama, M., T. Morita, and S. Katayama, Carbon monoxide regulates blood pressure cooperatively with nitric oxide in hypertensive rats. *Heart Vessels*, 2002. 16(5): p. 189-95.
150. Seki, T., et al., Roles of heme oxygenase/carbon monoxide system in genetically hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 241(2): p. 574-8.
151. Seki, T., et al., Induction of heme oxygenase produces load-independent cardioprotective effects in hypertensive rats. *Life Sci*, 1999. 65(10): p. 1077-86.
152. Abraham, N.G. and A. Kappas, Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*, 2008. 60(1): p. 79-127.
153. Naik, J.S., T.L. O'Donoghue, and B.R. Walker, Endogenous carbon monoxide is an endothelial-derived vasodilator factor in the mesenteric circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 284(3): p. H838-45.
154. Botros, F.T. and L.G. Navar, Interaction between endogenously produced carbon monoxide and nitric oxide in regulation of renal afferent arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 291(6): p. H2772-8.
155. Ryan, M.J., et al., Renal vascular responses to CORM-A1 in the mouse. *Pharmacol Res*, 2006. 54(1): p. 24-9.
156. Kaide, J., et al., Vascular CO counterbalances the sensitizing influence of 20-HETE on agonist-induced vasoconstriction. *Hypertension*, 2004. 44(2): p. 210-6.
157. Thomas, G.D. and S.S. Segal, Neural control of muscle blood flow during exercise. *J Appl Physiol*, 2004. 97(2): p. 731-8.
158. Green, D.J., et al., Control of skeletal muscle blood flow during dynamic exercise: contribution of endothelium-derived nitric oxide. *Sports Med*, 1996. 21(2): p. 119-46.
159. Falloon, B.J., et al., Comparison of small artery sensitivity and morphology in pressurized and wire-mounted preparations. *Am J Physiol*, 1995. 268(2 Pt 2): p. H670-8.
160. Schiffrin, E.L. and D. Hayoz, How to assess vascular remodelling in small and medium-sized muscular arteries in humans. *J Hypertens*, 1997. 15(6): p. 571-84.
161. Brian, J.E., Jr., D.D. Heistad, and F.M. Faraci, Effect of carbon monoxide on rabbit cerebral arteries. *Stroke*, 1994. 25(3): p. 639-43; discussion 643-4.

162. Longo, M., et al., Effect of nitric oxide and carbon monoxide on uterine contractility during human and rat pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1999. 181(4): p. 981-8.
163. Bolognesi, M., et al., Carbon monoxide-mediated activation of large-conductance calcium-activated potassium channels contributes to mesenteric vasodilatation in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. 321(1): p. 187-94.
164. Botros, F.T., L. Dobrowolski, and L.G. Navar, Renal heme oxygenase-1 induction with hemin augments renal hemodynamics, renal autoregulation, and excretory function. *Int J Hypertens*, 2012. 2012: p. 189512.
165. Wiesel, P., et al., Exacerbation of chronic renovascular hypertension and acute renal failure in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circ Res*, 2001. 88(10): p. 1088-94.
166. Komuro, T., et al., The vasorelaxation of cerebral arteries by carbon monoxide. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001. 226(9): p. 860-5.
167. Leffler, C.W., et al., Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation. *J Appl Physiol*, 2006. 100(3): p. 1065-76.
168. Holt, D.C., et al., Age and species dependence of pial arteriolar responses to topical carbon monoxide in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2007. 232(11): p. 1465-9.
169. Naik, J.S. and B.R. Walker, Homogeneous segmental profile of carbon monoxide-mediated pulmonary vasodilation in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. 281(6): p. L1436-43.
170. Johnson, F.K. and R.A. Johnson, Carbon monoxide promotes endothelium-dependent constriction of isolated gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. 285(3): p. R536-41.
171. Samora, J.B., et al., Growth-dependent changes in the contribution of carbon monoxide to arteriolar function. *J Vasc Res*, 2010. 47(1): p. 23-34.
172. Kozma, F., et al., Contribution of endogenous carbon monoxide to regulation of diameter in resistance vessels. *Am J Physiol*, 1999. 276(4 Pt 2): p. R1087-94.
173. Stec, D.E., H.A. Drummond, and T. Vera, Role of carbon monoxide in blood pressure regulation. *Hypertension*, 2008. 51(3): p. 597-604.
174. Stocker, R. and M.A. Perrella, Heme oxygenase-1: a novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation*, 2006. 114(20): p. 2178-89.

- 175.** Ishikawa, K., et al., Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J Clin Invest*, 1997. 100(5): p. 1209-16.
- 176.** Siow, R.C., H. Sato, and G.E. Mann, Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc Res*, 1999. 41(2): p. 385-94.
- 177.** Ryter, S.W. and A.M. Choi, Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. 41(3): p. 251-60.

ÖZGEÇMİŞ

22.04.1980 tarihinde Muğla-Marmaris'te dünyaya gelen Günnur KOÇER, ilk ve orta öğretimini Marmaris'te tamamladı. Marmaris Sabancı Lisesinden 1998 yılında mezun oldu ve aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde üniversite öğrenimine başladı. 2002 yılında lisans diploması almaya hak kazandı. 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladı. 2006 yılında yüksek lisans programını bitirerek akabinde Fizyoloji Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir.

EKLER

LABORATORY STUDY

The Effect of Exercise Training on the Responsiveness of Renal Resistance Arteries in Rats

Günnur Koçer¹, Oktay Kuru², Filiz Gündüz¹, Zeliha Bayram³, Sadi Özdem³, Duygu Aksoy⁴ and Ümit Kemal Şentürk¹

¹Department of Physiology, Akdeniz University, Antalya, Turkey; ²School of Health Sciences, Mugla University, Mugla, Turkey; ³Department of Pharmacology, Akdeniz University, Antalya, Turkey; ⁴School of Physical Education and Sports, Akdeniz University, Antalya, Turkey

Abstract

Blood flow to several tissues changes during an acute bout of exercise. The kidney is one of the organs that are most affected by exercise-induced blood redistribution. The aim of the present study was to investigate possible exercise-induced vascular reactivity changes in renal resistance arteries in rats. Renal resistance arteries were isolated from rats that underwent 8 weeks of swimming and sedentary control rats, and the arteries were evaluated using wire myography. Similar dilation responses to acetylcholine, bradykinin, adenosine, isoproterenol, and sodium nitroprusside were observed in both groups. The vasoconstrictive agents vasopressin, endothelin-1, potassium chloride, and thromboxane A₂ also induced similar responses in both groups; however, the trained group had an increased constrictive response to norepinephrine compared to the control rats. The results of our study show that renal resistance arteries of trained rats behave differently than conduit-type renal arteries and exhibit an increased contractile response to sympathetic agonists. This finding provides supporting evidence that renal blood flow markedly decreases during exercise in trained individuals.

Keywords: Exercise, resistance arteries, kidney, rats

INTRODUCTION

The adaptation processes that are induced by regular physical activity occur in various tissues, including blood vessels. During exercise, the release of mainly nitric oxide and other relaxing compounds that induce vascular resistance is decreased, and the response of vascular smooth muscle cells to constricting agents declines in resistance arteries in skeletal muscle and the myocardium, both of which are active during physical training.^{1–4} However, relatively few studies have focused on the mechanisms that regulate blood flow in inactive tissues during exercise. Although the kidney is an important organ for maintaining homeostasis and is easily affected in many cardiovascular diseases, very few studies have investigated the effect of training on renal blood flow.

Previous studies on renal blood flow in trained animals are contradictory: some studies have reported that

renal blood flow was decreased to a greater extent in trained animals compared to sedentary animals,⁵ whereas other reports showed no difference^{6,7}; however, despite these findings, it is generally accepted that renal blood flow is decreased to a lesser extent in trained animals compared to sedentary animals that are subjected to exercise of identical intensity.^{8–10} Two principal factors are attributed to the differential response of trained animals. First, sympathetic discharge to the kidneys is decreased during bouts of exercise.¹¹ Renal vasoconstriction due to sympathetic discharge occurs during the first few seconds of exercise, whereas after prolonged exercise the production of local factors prevails and leads to an increase in vascular tonus by affecting the endothelial layer or the smooth muscles in renal arteries.¹² Second, the response to norepinephrine (NE) in renal vessels is attenuated.^{10,13} The role of physical training in the differentiation of renal vascular responses to local vasoconstrictive factors was

Address correspondence to Ümit Kemal Şentürk, Department of Physiology, Akdeniz University, Kampus, 07070 Antalya, Turkey.
Tel.: +90 242 2274483; Fax: +90 242 2274483; E-mail: uksenturk@akdeniz.edu.tr

Received 17 December 2010; Revised 6 April 2011; Accepted 26 April 2011

investigated in only one study in which the main renal artery obtained from exercise-trained pigs had a decreased contractile response to NE.¹³ However, it is well known that local tissue perfusion is primarily controlled by resistance rather than conduit-type arteries. Therefore, determining possible exercise-training-induced alterations in the reactivity of renal small arteries is particularly important. In addition, it is also not clear whether regular physical activity affects the responses of renal resistance arteries to various local vasoactive agents.

The aim of the present study was to evaluate whether the putative alterations in both the relaxant and contractile responses of renal resistance arteries may be involved in the vasoregulatory processes that occur during exercise in trained rats. We hypothesized that the vasoconstrictive effect of local mediators in decreasing renal blood flow would be attenuated in trained animals.

MATERIALS AND METHODS

Forty adult female Wistar rats (8 weeks of age) weighing 200–220 g were used in present study. The animals were housed at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ in a 12/12 h light/dark cycle and had unrestricted access to standard rat chow and drinking water. The rats were assigned randomly to two different groups: sedentary control ($n = 20$) and exercise training ($n = 20$). The animals in the training group underwent sessions of swimming exercise (60 min/day, 5 days/week for 6 weeks) in a glass tank that measured 100×50 cm (50 cm depth) and was filled with tap water ($32\text{--}34^\circ\text{C}$). The duration of the first swimming session was 10 min, and this was increased by 10 min daily until a total of 60 min duration was reached. The experimental protocol was approved by the Animal Care and Usage Committee of Akdeniz University and followed the guidelines for using animals in experimental research.

The animals were sacrificed under ether anesthesia by exsanguination from the abdominal aorta 2 days after the last exercise bout in the training group. The kidneys were removed and transferred to a dissecting dish filled with ice-cold physiological saline solution (PSS) containing the following (in mM): 110 NaCl, 5 KCl, 24 NaHCO₃, 1 KH₂PO₄, 1 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 0.02 EDTA, and 10 glucose. The decapsulated kidneys were cut longitudinally into two sections. The veins and arteries were carefully dissected under adequate magnification using a dissecting microscope (OLYMPUS-SZ61, Tokyo, Japan). Sections of the arcuate artery were dissected, and segments of up to 2 mm in length were isolated from the third branch and cleared of connective tissue. The vessel segments (200–250 μm in diameter) were then mounted on wire myography equipment (EMKA Technologies, Paris, France). Two fine tungsten wires (25 μm in diameter) were placed through the lumen of the vessel segments. While taking care to avoid damage to the inner surface, the rings were then horizontally mounted in organ bath

chambers containing 10 mL of PSS solution according to the manufacturer's instructions. One wire was anchored to the equipment's removable mounting jaw and the other wire was connected to an isometric force transducer (ELG-S270B, Entran Sensors and Electronics, Toulouse, France), thereby allowing the wires to be fixed in two steps. The bath medium was bubbled with a mixture of CO₂ (5%) and O₂ (95%) and was maintained at 37°C (pH 7.4). The optimal resting tension (90 mmHg) of each ring was determined by constructing a passive diameter–tension curve in which the vessel's length was kept constant using a computer program (Normalize v1.0, EMKA Technologies). The preparations were allowed to equilibrate under optimal resting tension for 60 min before the start of the experiment. During this resting period, the bath solution was changed every 15 min. After equilibration, tissue viability was confirmed by contraction in response to NE (10^{-7} M) in PSS containing 20 mM K⁺ solutions. Several washes were performed to remove the constricting agents, and the preparations were allowed to stabilize for 30 min. Endothelial integrity was then assessed by pre-contracting the tissues with NE (10^{-6} M) before recording the degree of relaxation elicited with acetylcholine (ACh, 10^{-6} M). Tissue that exhibited relaxation that was 80% greater than its pre-constriction value was considered to contain a functional endothelium. After an additional 30 min period that included a wash every 15 min, the contractility of the arteries in high K⁺ concentration (80 mM) was measured. In bath solutions containing elevated K⁺ levels, the additional K⁺ was replaced with equivalent amounts of Na⁺ to obtain a certain K⁺ concentration.

All preparations underwent an identical initial procedure and were then assigned to two different protocols in which the effects of relaxing and constricting agents were separately examined.

Relaxation Protocol

Vascular preparations were pre-contracted with a single submaximal concentration of NE (10^{-6} M). When the contractile response to the agonist was stable, increasing concentrations of ACh (10^{-9} – 3×10^{-5} M) were applied in a cumulative fashion. The following steps were performed with 30 min washing and re-equilibration intervals between applications of the various agents. After pre-constriction with NE (10^{-6} M), the following relaxing agents were administered sequentially: adenosine (10^{-9} – 3×10^{-5} M), bradykinin (10^{-15} – 3×10^{-8} M), sodium nitroprusside (10^{-9} – 3×10^{-5} M), and isoproterenol (10^{-9} – 3×10^{-5} M).

Contraction Protocol

Concentration–response curves were generated by sequentially applying the following vasoconstrictive agents (with 30 min washing and re-equilibration steps between each application): NE (10^{-8} – 3×10^{-5} M), thromboxane A₂ (10^{-9} – 10^{-6} M), KCl (20, 40, and 80

mM), endothelin-1 (10^{-11} – 10^{-8} M), and vasopressin (10^{-11} – 3×10^{-8} M).

The myograph recordings were analyzed using a computer program (IOX-Datanalyst 2.0.0.6, EMKA Technologies). The NE-induced contraction plateau was considered to be 100%, and the relaxation responses were calculated as percentages of this plateau. The contraction responses are presented numerically in grams and indicate the tension exerted by the vessel segments.

The results are presented as mean \pm SE. The data obtained for the different concentrations of a given relaxing or contracting agent were compared by an analysis of variance for repeated measures (repeated measures ANOVA). Maximal responses observed in the concentration–response curves were analyzed with the Mann–Whitney *U*-test to evaluate the difference between the two experimental groups. Differences with a *p*-value of <0.05 were considered significant.

RESULTS

The body weight between the groups did not differ at the end of the study. The dose–response curves for the various relaxing agents are presented in Figure 1. The curve patterns for the relaxing agents were not statistically different between the sedentary control and exercised groups. The maximum relaxation responses were also similar in these two groups (Table 1).

The dose–response curves obtained with the vasoconstrictor agents are presented in Figure 2. NE was the only agent that generated a significantly different response ($p < 0.01$) between the experimental and control groups. The maximum response to NE in the exercised group was significantly greater than that in the control group ($p < 0.05$). The concentration–response patterns and maximum contractile responses to the other vasoconstrictive agents tested (thromboxane A_2 , KCl, endothelin-1, and vasopressin) were not statistically different between the control and exercised groups (Table 2).

DISCUSSION

Metabolic changes due to regular physical activity have been the subject of numerous detailed studies,^{5–8} many of which investigated the underlying mechanisms that contribute to increased perfusion of active tissues during exercise, including skeletal muscle and myocardium. This process, referred to as “blood redistribution,” is required to supply the increased oxygen that is demanded by active tissues and is more effective in exercise-trained subjects than sedentary ones. However, the decline in blood supply to several tissues, including the kidney, also participates in the blood redistribution process. Although several investigators have suggested that the decrease in renal blood flow

during exercise occurs to a lesser extent in trained subjects than in sedentary ones,^{8–10} few studies have focused on the possible mechanisms that might contribute to this phenomenon. In the present study, we tested the responses of renal resistance arteries to various vasoactive substances in trained and sedentary rats to reveal possible exercise-training-induced alterations in renal vascular reactivity. Increased vasoconstrictive responsiveness to NE in the trained group indicates the necessity for re-evaluating the conclusions that suggest a lesser decrease in renal blood flow in trained animals.

Blood flow redistribution during a bout of exercise is explained by training-induced adaptations in cardiac output and vascular reactivity.³ Several investigators have reported that vascular alterations in coronary, skeletal muscle, or intestinal vasculature can be induced by training.^{14–18} It has been proposed that this training-related vascular adaptation is a complex process that is strongly dependent on the size and tissue location of the vessel. In other words, exercise training may trigger different adaptation mediators in different tissues that contain vessels of different sizes.^{19,20} However, vascular adaptation to exercise training also occurs in the splanchnic organs and the kidney, in which blood flow decreases during a bout of exercise. Lash et al.¹⁶ demonstrated that the intestinal vasculature exhibits an enhanced myogenic but suppressed adrenergic constrictor response in trained animals. In contrast, McAllister et al.¹³ reported decreased constrictive responses in conduit renal arteries that were treated by cumulative doses of NE in trained pigs. However, the data obtained in conduit-type arteries cannot be extrapolated to the smaller resistance arteries in terms of regulating local tissue perfusion. It is also possible that exercise training alters the vascular responses of resistance arteries to relaxing agents.

We found no statistically significant differences in the dilation responses of renal resistance arteries to ACh or bradykinin between trained and sedentary rats. Moreover, the relaxation responses to sodium nitroprusside and isoproterenol (which are vasodilator agents with direct effects on vascular smooth muscle cells) did not differ between the trained and sedentary groups. Furthermore, high extracellular K^+ concentrations (which induce vasoconstriction by membrane depolarization without involving specific receptors or post-receptor mechanisms) produced similar contractile responses in the two groups. Taken together, these results indicate that the contractile elements in vascular smooth muscle cells of renal resistance arteries were not affected in the trained rats. Our findings in rat renal resistance arteries are consistent with previous reports by other groups who studied conduit-type renal arteries from trained pigs.¹³ Exercise training did not alter the responsiveness of renal resistance arteries to endothelium-derived vasodilatory agents at either the receptor or post-receptor level.

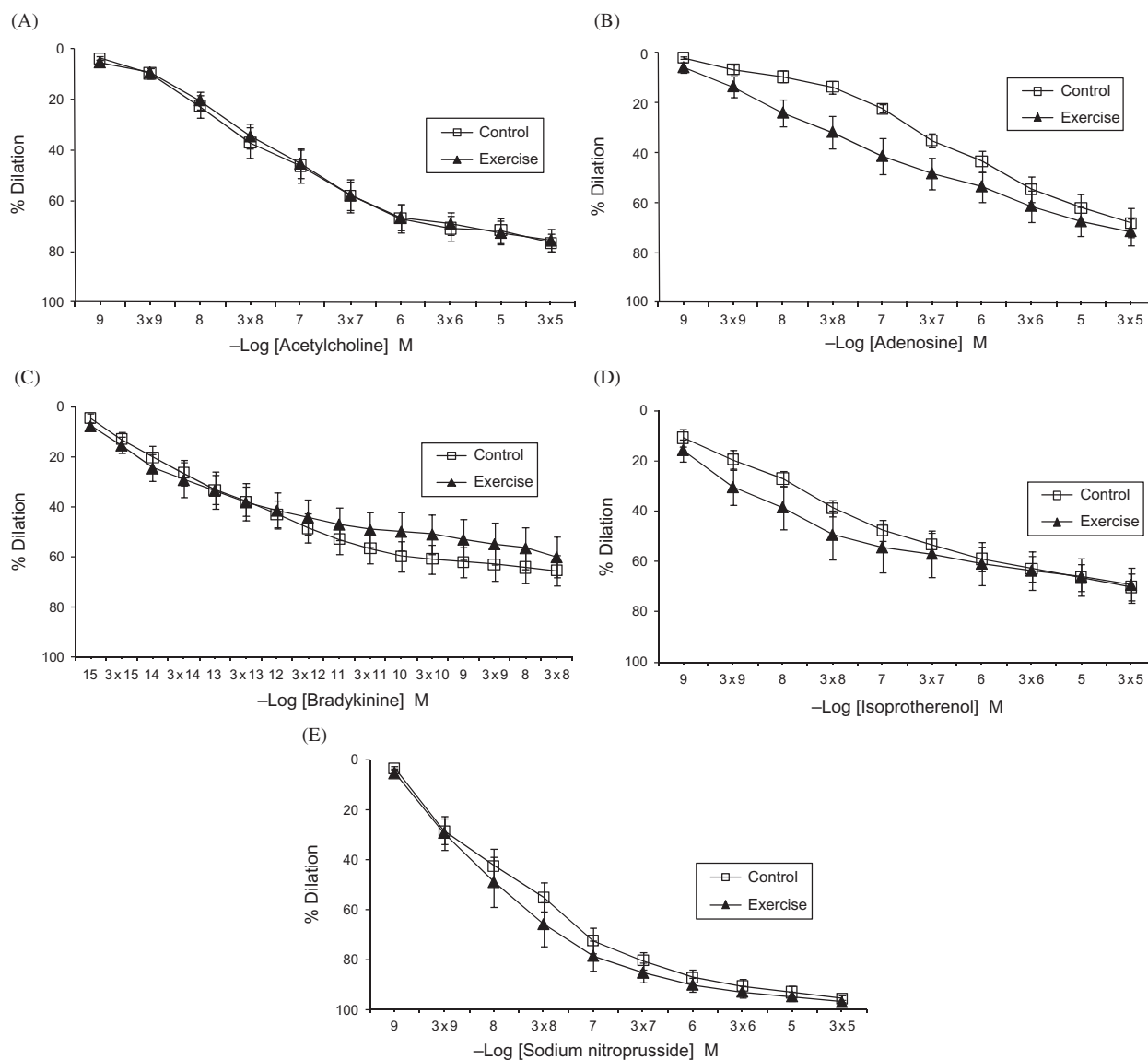


Figure 1. Cumulative concentration–response curves to acetylcholine (A), adenosine (B), bradykinin (C), isoproterenol (D), and sodium nitroprusside (E) in renal resistance arteries from experimental groups.

Note: Values are means \pm SE.

Table 1. Maximal dilation response (E_{max}) values to vasodilator agents in isolated renal resistance arteries in experimental rats.

Agents (%)	Control	Exercise
Acetylcholine	76.5 \pm 4.48	75.5 \pm 4.33
Adenosine	68.2 \pm 5.84	71.6 \pm 5.43
Bradykinin	65.6 \pm 8.0	60.2 \pm 6.23
Sodium nitroprusside	95.7 \pm 1.37	97.2 \pm 0.94
Isoproterenol	70.1 \pm 5.5	69.4 \pm 6.8

Note: Values are means \pm SE.

The dose–response curves of vasoconstrictive mediators were evaluated in a subsequent set of protocols in which NE produced statistically stronger contractions in renal vessels from trained rats compared with sedentary controls. In addition, the maximal contraction responses to NE were also significantly higher in

the trained rats compared to control group. In contrast, McAllister et al.¹³ reported decreased contractile responses in renal arteries of trained pigs compared to control pigs. Although the reason for the contradictory findings is unclear, differences in the species studied, the duration of physical training, and, in particular, the vessel segment studied might all play a role in the observed differences. To our knowledge, the present study is the first to investigate exercise-training-induced alterations in the reactivity of renal resistance arteries from trained animals.

There are several clues in the literature that might explain the increased NE responsiveness of resistance arteries from trained rats. Vascular alpha-adrenergic receptors undergo important changes in their number and/or their ligand affinity in response to altered levels of agonist stimulation (i.e., circulating levels of

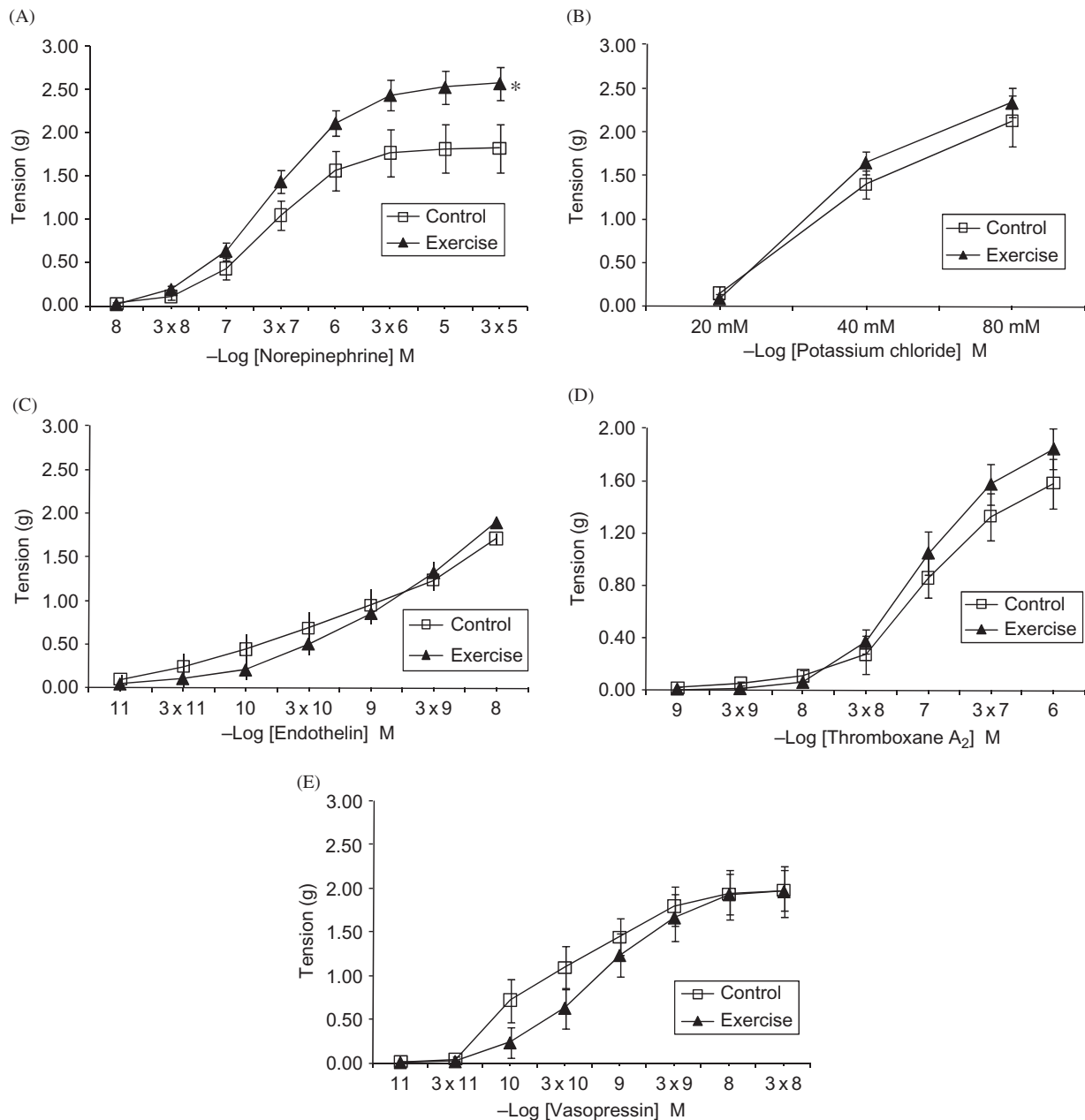


Figure 2. Cumulative concentration–response curves to norepinephrine (A), potassium chloride (B), endothelin (C), thromboxane A_2 (D), and vasopressin (E) in renal resistance arteries from experimental groups.

Notes: Values are means \pm SE.

*Denotes $p < 0.01$, difference from control group.

noradrenaline).²¹ It is also well known that decreased catecholamine levels result in increased vascular sensitivity to alpha-adrenergic agonists by enhancing both receptor numbers and Ca^{2+} efflux.²² The intensity of sympathetic stimuli and the levels of circulating adrenergic hormones are decreased by regular physical activity as compared to sedentary conditions.¹⁰ Therefore, it might be suggested that the increased contractile responses of renal resistance arteries in trained rats that were observed in the present study might be due to an upregulation of adrenergic receptors and/or increased sensitivity of the post-receptor signaling pathway that

is caused by a reduction in both local (through sympathetic nerves) and circulating levels of NE in these animals.

Because regular physical exercise has been reported to reduce the activity and expression (at both the mRNA and protein levels) of endothelial nitric oxide synthase, which results in a decrease in stable NO metabolites (e.g., nitrites/nitrates), an alteration in NO production might also contribute to the observed reduction in the contractile response of resistance arteries to NE in trained rats.²³ Moreover, Maeda et al.²⁴ reported that elevated endothelin-1 levels are

Table 2. Maximal constriction response (Emax) values to vasodilator agents in isolated renal resistance arteries in experimental rats.

Agents (g)	Control	Exercise
Norepinephrine	1.82 ± 0.28	2.56 ± 0.19*
Thromboxane A ₂	1.58 ± 0.19	1.84 ± 0.15
Potassium chloride	2.13 ± 0.29	2.33 ± 0.17
Endothelin	1.71 ± 0.07	1.89 ± 0.06
Vasopressin	1.97 ± 0.23	1.96 ± 0.29

Notes: Values are means ± SE.

*Denotes $p < 0.05$, difference from control group.

responsible for renal NOS downregulation in trained rats.

Our results demonstrate that the constriction responses of renal resistance arteries to NE were stronger in trained animals compared to sedentary animals, whereas the dilation responses did not differ between these two groups. This assertion contradicts the generally accepted belief that renal blood flow decreases to a lesser extent in trained animals.^{8–10} These findings also necessitate the re-evaluation of how kidney blood flow changes during exercise in trained animals and underscore the need for further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Akdeniz University Research Projects Unit (Project Number 2004.01.0200.004).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- [1] Chen HI, Chiang IP. Chronic exercise decrease adrenergic agonist-induced vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1996;271:H977–H983.
- [2] Gren DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor D. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol.* 2004;561(pt. 1):1–25.
- [3] Lash JM. Training-induced alteration in contractile function and excitation–contraction coupling in vascular smooth muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30(1):60–66.
- [4] Joyner MJ, Casey DP. The catecholamines strike back. What NO does not do. *Circ J.* 2009;73(10):1783–1792.
- [5] Musch TI, Haidet GC, Ordway GA, Longhurst JC, Mitchell JH. Training effects on regional blood flow response to maximal exercise in foxhounds. *J Appl Physiol.* 1987;62(4):1724–1732.
- [6] Clausen JP. Effect of physical training on cardiovascular adjustments to exercise in man. *Physiol Rev.* 1977;57(4):779–815.

- [7] Musch TI, Terrell JA, Hilty MR. Effect of high-intensity sprint training on skeletal muscle blood flow in rats. *J Appl Physiol.* 1991;71(4):1387–1395.
- [8] Armstrong RB, Laughlin MH. Exercise blood flow patterns within and among rat muscles after training. *Am J Physiol.* 1984;246:H59–H68.
- [9] DiCarlo SE, Stahl LK, Bishop V. Daily exercise attenuates the sympathetic nerve response to exercise by enhancing cardiac afferents. *Am J Physiol.* 1997;273:H1606–H1610.
- [10] McAllister RM. Adaptations in control of blood flow with training: Splanchnic and renal blood flows. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30(3):375–381.
- [11] DiCarlo SE, Bishop VS. Regional vascular resistance during exercise: Role of cardiac afferents and exercise training. *Am J Physiol.* 1990;258:H842–H847.
- [12] Mueller PJ, O'Hagan KP, Skogg KA, Buckwalter JB, Clifford PS. Renal hemodynamic responses to dynamic exercise in rabbits. *J Appl Physiol.* 1998;85(5):1605–1614.
- [13] McAllister RM, Kimani JK, Webster JL, Parker JL, Laughlin MH. Effect of exercise training on responses of peripheral and visceral arteries in swine. *J Appl Physiol.* 1996;80(1):216–225.
- [14] Laughlin MH. Endothelium-mediated control of coronary vascular tone after chronic exercise training. *Med Sci Sports Exerc.* 1995;27:1135–1144.
- [15] Koller A, Huang A, Sun D, Kaley G. Exercise training augments flow-dependent dilation in rat skeletal muscle arterioles: Role of endothelial nitric oxide and prostaglandins. *Circ Res.* 1995;76:544–550.
- [16] Lash JM, Reilly T, Thomas M, Bohlen HG. Adrenergic and pressure-dependent vascular regulation in sedentary and trained rats. *Am J Physiol.* 1993;265:H1064–H1073.
- [17] Chiba Y, Maehara K, Yaoita H, Yoshihisa A, Izumida J, Maruyama Y. Vasoconstrictive response in the vascular beds of the non-exercising forearm during leg exercise in patients with mild chronic heart failure. *Circ J.* 2007;71(6):922–928.
- [18] Fujita M, Sasayama S. Coronary collateral growth and its therapeutic application to coronary artery disease. *Circ J.* 2010;74(7):1283–1289.
- [19] Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res.* 1994;74:349–353.
- [20] Parker JL, Oltman CL, Muller JM, Myers PR, Adams HR, Laughlin MH. Effects of exercise training on regulation of tone in coronary arteries and arterioles. *Med Sci Sports Exerc.* 1994;26:1252–1261.
- [21] Colucci WS, Gimbrone MA, Alexander RW. Regulation of the postsynaptic α -adrenegic receptor in rat mesenteric artery. *Circ Res.* 1981;48:104–111.
- [22] Colucci WS, Alexander RW. Norepinephrine-induced alteration in coupling of α_1 -adrenegic receptor occupancy to calcium efflux in rabbit aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:1743–1746.
- [23] Miyauchi T, Maeda S, Iemitsu M, et al. Exercise causes a tissue-specific change of NO production in the kidney and lung. *J Appl Physiol.* 2003;94:60–68.
- [24] Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, et al. Endothelin receptor antagonist reverses decrease NO system in the kidney in vivo during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286:E609–E614.