

SELÇUK TAKIR

ELÇUK TAKIR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2006

DOKTORA TEZİ

2006

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**İZOLE SIĞIR RETİNAL ARTERLERİNDE, RETİNAL
GEVŞETİCİ FAKTÖRÜN (RRF) ETKİSİNİN VE
KALSİYUM İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

SELÇUK TAKIR

**DANIŞMAN
DOÇ. DR SÖNMEZ UYDEŞ DOĞAN**

**İ.Ü. ECZACILIK FAKÜLTESİ FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI**

İSTANBUL-2006

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora. Tezi olarak kabul edilmiştir.

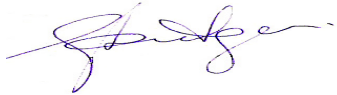
/ /

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Farmakoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı: İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji
Tez Sahibi : Selçuk Takır
Tez Başlığı : İzole Sığır Retinal Arterlerinde, Retinal Gevşetici Faktörün (RRF) Etkisinin ve Kalsiyum ile İlişkinin İncelenmesi
Sınav Yeri : İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji
Sınav Tarihi : 16.08.2006

Tez Sınav Jürisi

1. “Prof.Dr. Gül Ayanoğlu Dülger”, Marmara Üniv., Eczacılık Fak., Farmakoloji ABD.



2. “Prof.Dr. Osman Özdemir”, İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Farmakoloji ABD. “Tez İzleme Komitesi Üyesi”



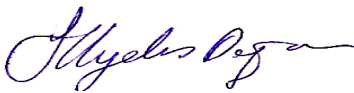
3. “Prof.Dr. Meral Keyer Uysal”, Marmara Üniv., Eczacılık Fak., Farmakoloji ABD. “Tez İzleme Komitesi Üyesi”



4. “Prof. Dr. Gül Baktır”, İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Farmakoloji ABD.




5. “Doç.Dr. Sönmez Uydeş Doğan”, İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Farmakoloji ABD. “Tez Danışmanı/Tez İzleme Komitesi Üyesi”



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Selçuk Takır

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

*Tez çalışmalarım boyunca desteğini ve ilgisini her zaman yanımda hissettiğim
değerli hocam*

Prof. Dr. Osman ÖZDEMİR'e

*Tez çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, tezimi dikkatle inceleyip
en iyi şekilde hazırlanması için yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam,*

Doç. Dr. Sönmez Uydeş Doğan'a

*Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bilimsel ve manevi destekleriyle hep
yanımda olan değerli hocam,*

Prof. Dr. Gül Baktır'a

Sevgilerini ve dostluklarını benimle paylaşan arkadaşlarım

*Alper Okyar'a, Gökçe Topal'a, Deniz Kaleli'ye, F. İlkey Alp'e, Zeliha Pala'ya,
Uğur Aksu'ya, Nihan Çarçak'a, Özge Uyanık'a*

*Deneylerimde kullandığım preparatların temininde yardımcı olan Çoşkun Et ve
Et Mamülleri A.Ş. ve Çekmece Et ve Et Ürünleri Ticaret ve Sanayi A.Ş.*

sorumlu müdürleri ve çalışanlarına,

*Deneylerimde kullandığım preparatların temininde vermiş oldukları maddi ve
manevi destekleri için*

*İstanbul Ecza Kooperatifi Birliğine, yönetim kurulu üyelerine ve tüm kooperatif
çalışanlarına,*

Sevgilerini daima içimde hissettiğim sevgili anneme, babama ve kardeşlerime,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	17
2. GENEL BİLGİLER	20
2.1. Görme Organı (Göz).....	20
2.2. Retina	20
2.2.1. Retina ile İlişkili Hastalıklar	21
2.2.1.1. Vasküler Retinopati.....	21
2.2.1.2. Merkezi Retinal Arter ve Ven Tıkanması	22
2.2.1.3. Diyabetik Retinopati	22
2.2.1.4. Yaş Bağımlı Maküler Dejenerasyon	22
2.2.1.5. Retina Dekolmanı.....	23
2.2.1.6. Retinitis Pigmentoza	23
2.2.1.7. Glokom.....	23
2.2.2. Retinanın Kanlanması	24
2.3. Retinal Arter.....	24
2.3.1. Retinal Arterin Endotel ve Düz Kas Fonksiyonu.....	25
2.3.2. Retinal Arterin Tonüsünün Düzenlenmesi.....	26
2.4. Retina Kaynaklı Gevşetici Faktör (RRF).....	28
2.5. Potasyum Kanalları	30
2.5.1. Voltaj Bağımlı Potasyum Kanalları (K^+_v).....	31
2.5.2. Kalsiyum ile Aktive Potasyum Kanalları ($K^+_{Ca^{++}}$).....	31
2.5.3. İç Akım (Inwardly Rectifier) Potasyum Kanalları (K^+_{ir})	33

2.5.4. ATP Duyarlı Potasyum Kanalları (K^+_{ATP})	33
2.6. Kalsiyum Kanalları	34
2.6.1. Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları	35
2.6.1.1. L-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları	36
2.6.1.2. T-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları	36
2.6.1.3. N-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları.....	37
2.6.1.4. P- Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları	37
2.6.1.5. R ve Q-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları	37
2.6.2. Reseptör Aracılı Kalsiyum Kanalları	38
2.6.3. Sodyum / Kalsiyum İyon Değişiricisi.....	39
2.6.4. Plazmalemmal KalsiyumATP _{az}	40
2.6.5. Sarkoplazmik / Endoplazmik Retikulum KalsiyumATP _{az} (SERCA)	40
2.6.6. Sarkoplazmik / Endoplazmik Retikulumda Bulunan Kalsiyum Kanalları	41
2.6.7. Mitokondri İçinde Kalsiyum Depolanması.....	42
2.6.8. Nükleus İçinde Kalsiyum Depolanması.....	43
2.7. Kalsiyum Duyarlılaşması.....	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri.....	47
3.2. Araç ve Gereçler	47
3.3. Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları	48
3.4. İzole Sığır Retinal Arterinin Hazırlanması	49
3.5. Yöntem.....	50
3.5.1. Retinal Arterin Standardizasyonu ve Reaktivitesinin Belirlenmesi.....	50
3.5.2. Retinanın Etkisinin İncelenmesi	51
3.5.3. Retinaya Bağlı Gevşetici Etkinin Mekanizmasının İncelenmesi	52
3.6. Normalizasyon	55
3.7. İstatistiksel Analiz.....	59
4. BULGULAR.....	60
4.1. İzole Sığır Retinal Arterlerinin Reaktivitesinin İncelenmesi	60
4.1.1. Kastırıcı Ajanların İzole Sığır Retinal Arterleri Üzerine Etkileri	60
4.2. İzole Sığır Retinal Arterlerinin Endotel ve Düz Kas Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi	62
4.2.1. Asetilkolinin Etkisi	62

4.2.2. Sodyum Nitroprusiyatın Etkisi.....	62
4.3. Retinanın Etkisinin İncelenmesi	65
4.3.1. Çeşitli Spazmojen Ajanlar ile Prekontrakte Edilmiş Retinal Arterler Üzerine Retina Dokusunun Yerleştirilmesi	65
4.3.2. Retinaya Bağlı Gevşetici Etkinin Oluşma Süresi	70
4.3.3. Retinaya Bağlı Gevşetici Etkinin Tekrarlanabilirliği.....	72
4.4. Koroidin Etkisinin İncelenmesi	75
4.4.1. Çeşitli Spazmojen Ajanlar ile Prekontrakte Edilen İzole Sığır Retinal Arterleri Üzerine Koroid Dokusunun Yerleştirilmesi	75
4.5. Retinata Bağlı Gevşetici Etkinin Mekanizmasının İncelenmesi.....	78
4.5.1. Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktörlerin Rolünün İncelenmesi.....	78
4.5.1.1. Siklooksijenaz İnhibitörü İndometazin Etkisi.....	78
4.5.1.2. Nitrik Oksit Sentetaz İnhibitörü L-NOARG' ın Etkisi	78
4.5.1.3. Guanilat Siklaz İnhibitörü ODQ' nun Etkisi.....	79
4.5.1.4. Deendotelize Edilmiş İzole Sığır Retinal Arterlerinde Retinanın Etkisi.....	79
4.5.2. Potasyum Kanallarının Rolünün İncelenmesi.....	85
4.5.2.1. K^+ _{ATP} Kanalı İnhibitörü Glibenklamidin Etkisi	85
4.5.2.2. K^+ _{Ca++} Kanalı İnhibitörü Tetraetilamonyumun Etkisi	85
4.5.2.2.i. BK^+ _{Ca++} Kanalı İnhibitörü Karibdotoksinin Etkisi.....	86
4.5.2.2.ii. SK^+ _{Ca++} Kanalı İnhibitörü Apaminin Etkisi	86
4.5.2.2.iii. BK^+ _{Ca++} Kanalı İnhibitörü Karibdotoksin ve SK^+ _{Ca++} Kanalı İnhibitörü Apamin Kombinasyonunun Etkisi	87
4.5.3. Kalsiyum Kanallarının Rolünün İncelenmesi	94
4.5.3.1. L-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanallarının Etkisi.....	94
4.5.3.1.i. L-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanal Agonisti Bay k 8644'ün Etkisi ..	94
4.5.3.1.ii. L-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalı İnhibitörü Nifedipinin Etkisi	94
4.5.3.2. SERCA İnhibitörü Siklopiyazonik Asidin Etkisi.....	95
4.5.4. Kalsiyuma Karşı Duyarlılığın İncelenmesi.....	95
4.5.5. Ekstraselüler Kalsiyumun Uzaklaştırılmasının Etkisi.....	96
4.6. Düşük Prekontraksiyon Düzeyinde Retinaya Bağlı Gevşetici Etkinin İncelenmesi	106
4.7. Rho Kinaz Yolağının Rolünün İncelenmesi	109

4.7.1. PGF _{2α} ile Prekontrakte Edilen İzole Sığır Retinal Arterlerinde Rho Kinaz İnhibitörü Y27632'nin Etkisi	109
4.7.2. KCl ile Prekontrakte Edilen İzole Sığır Retinal Arterlerinde Rho Kinaz İnhibitörü Y27632'nin Etkisi	109
5. TARTIŞMA	113
KAYNAKLAR	123
ÖZGEÇMİŞ	132

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Çeşitli spazmojen ajanların izole sığır retinal arterlerinde elde edilen E_{maks} ve pD_2 değerleri.	61
Tablo 2: Çeşitli spazmojen ajanlarla benzer düzeyde prekontrakte edilen izole sığır retinal arterler üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi ile elde edilen gevşeme yanıtları.	69
Tablo 3: İzole sığır retinal arterlerinin uzunlukları, iç çapları ve çeşitli spazmojen ajanlarla oluşturulan prekontraksiyon düzeyleri.	69
Tablo 4: Çeşitli spazmojen ajanlarla benzer düzeyde prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi ile elde edilen gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.	71
Tablo 5: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun ilk ve ikinci uygulama olarak yerleştirilmesi sonucu elde edilen gevşeme yanıtları ve prekontraksiyon düzeyleri.	74
Tablo 6: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun ilk ve ikinci uygulama olarak yerleştirilmesi sonucu elde edilen gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.	74
Tablo 7: Çeşitli spazmojen ajanlarla prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde koroid dokusunun etkisi.	77
Tablo 8: Deendotelize veya çeşitli inhibitörler ile inkübe edilen izole sığır retinal arterlerinin uzunlukları, iç çapları ve $PGF_{2\alpha}$ ile elde edilen prekontraksiyon düzeyleri.	82
Tablo 9: Deendotelize veya çeşitli inhibitörler ile inkübe edilen izole sığır retinal arterlerinde retina dokusuna bağlı olarak oluşan gevşeme yanıtları.	83
Tablo 10: Deendotelize veya çeşitli inhibitörler ile inkübe edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.	84
Tablo 11: K^+_{ATP} veya $K^+_{Ca^{++}}$ kanallarının inhibitörleri ile inkübe edilen izole sığır retinal arterlerinin uzunlukları, iç çapları ve prekontraksiyon düzeyleri.	91
Tablo 12: K^+_{ATP} veya $K^+_{Ca^{++}}$ kanallarının inhibitörleri varlığında retinaya bağlı gevşeme yanıtları.	92
Tablo 13: K^+_{ATP} veya $K^+_{Ca^{++}}$ kanallarının inhibitörleri varlığında retinaya bağlı gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.	93

Tablo 14: L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal antagonisti nifedipin (Nif. $10^{-6}M$) veya SERCA inhibitörü CPA ($10^{-6}M$) ile inkübe edilen izole sığır retinal arterlerinin uzunlukları, iç çapları ve prekontraksiyon düzeyleri.....	103
Tablo 15: Kalsiyumlu $[Ca^{++}(+)]$ ve kalsiyumsuz $[Ca^{++}(-)]$ ortamlarda $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinin uzunlukları, iç çapları ve prekontraksiyon düzeyleri.....	103
Tablo 16: L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal antagonisti nifedipin (Nif. $10^{-6}M$) veya SERCA inhibitörü CPA ($10^{-6}M$) varlığında retinaya bağlı gevşeme yanıtları.	104
Tablo 17: L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal antagonisti nifedipin (Nif. $10^{-6}M$) veya SERCA inhibitörü CPA ($10^{-6}M$) varlığında retinaya bağlı gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.	104
Tablo 18: Kalsiyumlu $[Ca^{++}(+)]$ ve kalsiyumsuz $[Ca^{++}(-)]$ ortamlarda $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı gevşeme yanıtları....	105
Tablo 19: Kalsiyumlu $[Ca^{++}(+)]$ ve kalsiyumsuz $[Ca^{++}(-)]$ ortamlarda $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.....	105
Tablo 20: İzole sığır retinal arterlerinin normal ($PGF_{2\alpha}$; $3 \times 10^{-5}M$) ve düşük ($PGF_{2\alpha}$; $3 \times 10^{-6}M$) prekontraksiyon düzeylerinde elde edilen retinaya bağlı gevşeme yanıtları.	108
Tablo 21: İzole sığır retinal arterlerinin normal ($PGF_{2\alpha}$; $3 \times 10^{-5}M$) ve düşük ($PGF_{2\alpha}$; $3 \times 10^{-6}M$) prekontraksiyon düzeylerinde elde edilen retinaya bağlı gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.....	108
Tablo 22: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ve KCl (120mM) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinin uzunlukları, iç çapları ve prekontraksiyon düzeyleri.	112
Tablo 23: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ve KCl (120 mM) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde rho kinaz inhibitörü Y27632'nin oluşturduğu maksimum gevşeme yanıtı (E_{maks}) ve pD_2 değerleri.	112

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Düz kasın kasılması ve kalsiyum duyarlılaşması ile ilişkili mekanizmaların şematik gösterimi.	46
Şekil 2: Sığır retinal arteri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesinin şematik gösterimi (kaynak:26).	51
Şekil 3: İç çevrenin hesaplanmasının şematik gösterimi (A) ve normalizasyon işlemi (B) (sığır retinal arteri, orijinal trase).	56
Şekil 4: Çeşitli spazmojen ajanların izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri.....	61
Şekil 5: Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak (A) asetilkolin (Ach; 10^{-8} - $10^{-4}M$) ve (B) sodyum nitroprusiyat (SNP; 10^{-8} - $10^{-4}M$) uygulanması ve ardından damarlar üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi ile elde edilen gevşeme yanıtları (orijinal trase).	63
Şekil 6: Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak (A) asetilkolin (Ach; 10^{-8} - $10^{-4}M$) ve (B) sodyum nitroprusiyat (SNP; 10^{-8} - $10^{-4}M$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri.	64
Şekil 7: (A) NAK [NA ($10^{-4}M$) + KCl (30mM)], (B) $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$), (C) U46619 ($3 \times 10^{-7}M$), (D) ET-1 ($10^{-8}M$), (E) KCl (120mM) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi ile elde edilen gevşeme yanıtları (orijinal trase).	67
Şekil 8: Çeşitli spazmojen ajanlarla benzer düzeyde prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerinde retina dokusunun yerleştirilmesi ile elde edilen gevşeme yanıtları.	68
Şekil 9: Çeşitli spazmojen ajanlarla benzer düzeyde prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi ile elde edilen gevşeme yanıtlarının oluşma süresi.	70
Şekil 10: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesine bağlı oluşan gevşetici etkinin tekrarlanabilirliğinin incelenmesi.	73

Şekil 11: PGF _{2α} (3x10 ⁻⁵ M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusu yerleştirilmesine bağlı oluşan gevşetici etkinin tekrarlanabilirliğinin zaman açısından incelenmesi.....	73
Şekil 12: (A) NAK [NA (10 ⁻⁴ M)+ KCl (30mM)], (B) PGF _{2α} (3x10 ⁻⁵ M), (C) U46619 (3x10 ⁻⁷ M), (D) ET-1 (10 ⁻⁸ M), (E) KCl (120mM) prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine koroid dokusunun yerleştirilmesinin etkisi (orijinal trase).....	76
Şekil 13: Çeşitli spazmojen ajanlarla prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine koroid dokusunun yerleştirilmesinin etkisi.....	77
Şekil 14: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında siklooksijenaz inhibitörü indometazinin (10 ⁻⁵ M) etkisi.....	80
Şekil 15: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında NO sentaz inhibitörü L-NOARG' in (10 ⁻⁴ M) etkisi.....	80
Şekil 16: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında guanilat siklaz inhibitörü ODQ' nun (10 ⁻⁵ M) etkisi.....	81
Şekil 17: Deendotelize edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtları.....	81
Şekil 18: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında K ⁺ _{ATP} kanalı inhibitörü glibenklamidin (10 ⁻⁵ M) etkisi.....	88
Şekil 19: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında K ⁺ _{Ca++} kanalı inhibitörü TEA' nin (10 ⁻² M) etkisi.....	88
Şekil 20: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında BK ⁺ _{Ca++} kanalı inhibitörü CTX' in (10 ⁻⁷ M) etkisi.....	89
Şekil 21: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında SK ⁺ _{Ca++} kanalı inhibitörü apaminin (5x10 ⁻⁷ M) etkisi.....	89
Şekil 22: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında CTX (10 ⁻⁷ M) ve apamin (5x10 ⁻⁷ M) kombinasyonunun etkisi.....	90
Şekil 23: İzole sığır retinal arterlerinde L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal agonisti Bay k 8644'ün konsantrasyon-yanıt eğrisi.....	97
Şekil 24: L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal agonisti Bay k 8644 (10 ⁻⁶ M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinanın gevşetici etkisinin orijinal trase (A) ve bar grafik (B) olarak gösterimi.....	98
Şekil 25: Retinaya bağlı olarak görülen gevşetici etkide L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalı inhibitörü nifedipinin (10 ⁻⁷ M) etkisi.....	99

Şekil 26: İzole sığır retinal arterlerinde SERCA inhibitörü CPA' nın (10^{-8} - 10^{-6} M) etkisi (orijinal trase).....	100
Şekil 27: Retinaya bağlı olarak görülen gevşetici etkide SERCA inhibitörü CPA' nın (10^{-6} M) etkisi.	100
Şekil 28: Kalsiyumsuz ortamda üzerine retina dokusu yerleştirilmemiş (A) ve yerleştirilmiş (B) izole sığır retinal arterlerinde CaCl_2 'nin (10^{-7} - 10^{-2} M) konsantrasyon-yanıt ilişkisi (orijinal trase).	101
Şekil 29: Kalsiyumsuz ortamda üzerine retina dokusu yerleştirilmemiş (■) ve yerleştirilmiş (▲) izole sığır retinal arterlerinde CaCl_2 'ün (10^{-7} - 10^{-2} M) konsantrasyon-yanıt eğrileri.	102
Şekil 30: Kalsiyumlu [$\text{Ca}^{++}(+)$] ve kalsiyumsuz [$\text{Ca}^{++}(-)$] ortamda $\text{PGF}_{2\alpha}$ (sırasıyla; 3×10^{-6} M ve 3×10^{-5} M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinanın gevşetici etkisi.....	102
Şekil 31: Düşük prekontraksiyon düzeyinde retinanın gevşetici etkisi.	107
Şekil 32: Düşük prekontraksiyon düzeyinin retinaya bağlı oluşan gevşetici etkinin oluşma sürelerine etkisi.	107
Şekil 33: (A) $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ve (B) KCl (120 mM) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde rho kinaz inhibitörü Y27632'nin (10^{-8} - 10^{-4} M) ve retinanın gevşetici etkisi (orijinal trase).	110
Şekil 34: $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ve KCl (120 mM) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde rho kinaz inhibitörü Y27632'nin (10^{-8} - 10^{-4} M) konsantrasyon-yanıt eğrisi.	111

ÖZET

Takır Selçuk (2006). “**İzole Sığır Retinal Arterlerinde, Retinal Gevşetici Faktörün (RRF) Etkisinin ve Kalsiyum ile İlişkisinin İncelenmesi**”. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Retinal arterlerin tonüsü retina ve/veya endotel tabakası tarafından lokal olarak düzenlenmektedir. Retinadan yeni bir gevşetici faktörün (RRF) serbestlendiği ve retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde rolünün olabileceği ileri sürülmüştür. Çalışmamızda yapısı ve etki mekanizması henüz aydınlatılamamış olan bu faktörün izole sığır retinal arterlerindeki etkisini ve muhtemel etki mekanizmasını incelemeyi amaçladık.

Myograf sistemine yerleştirilen retinal arterlerin çeşitli spazmojen ajanlara karşı reaktivitesi, endotel fonksiyonu ve düz kas gevşeme kapasitelerinin belirlenmesinin ardından spazmojen ajanlarla prekontrakte edilen retinal arterler üzerinde retinanın etkisi incelenmiştir. Ardından retinanın etkisinde, endotel kaynaklı gevşetici faktörlerin, ATP ve kalsiyum duyarlı potasyum kanallarının, voltaj-bağımlı kalsiyum kanallarının (VOC), sarkoplazmik retikulum kalsiyumATPaz pompasının (SERCA), ekstraselüler kalsiyumun, kalsiyuma karşı duyarlılığın ve kalsiyum duyarlılaşması ile ilgili mekanizmaların rolü araştırılmıştır.

Prekontrakte retinal arterler üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi akut başlayan ve genellikle bifazik karakter gösteren bir gevşeme yanıtı oluşturmuştur. Retinal arterlerin ve retina dokusunun, nitrik oksit sentaz, guanilat siklaz ve siklooksijenaz enzimlerinin, ATP ve kalsiyum duyarlı potasyum kanallarının, VOC ya da SERCA'nın inhibitörleriyle inkübasyonu, retinanın gevşetici etkisinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Retina kaynaklı gevşetici etki, ekstraselüler kalsiyum yokluğunda değişmemiş bununla birlikte retinal arterlerin kalsiyuma karşı duyarlılığını azaltmıştır. Ayrıca, rho-kinaz yolağının spesifik inhibitörü Y27632'nin, prekontrakte edilen retinal arterler üzerinde retina dokusuna benzer gevşemelere neden olduğu belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz bulgular, retinanın gevşetici etkisinde endotel kaynaklı vazodilatörlerin, ATP ve kalsiyum duyarlı potasyum kanallarının, VOC'un, SERCA pompasının veya ekstraselüler kalsiyumun rolünün olmadığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, retinanın gevşetici etkisinde kontraktıl proteinlerin kalsiyuma duyarlılığının azaltılması ve/veya rho-kinazın inhibisyonu ile ilişkili mekanizmaların rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Retinal gevşetici faktör, izole sığır retinal arteri, potasyum kanalları, kalsiyum kanalları, rho-kinaz.

ABSTRACT

Takır Selçuk (2006). “**Investigation of the Effect of Retinal Relaxing Factor (RRF) in Isolated Bovine Retinal Arteries and It’s Relationship With Calcium**”. Istanbul University, Institute of Health Science, Faculty of Pharmacy Department of Pharmacology. Doctorate Thesis Project. Istanbul.

Retinal arterial tone is regulated locally by retina and/or endothelium. A new relaxing factor released from retina, is suggested to play a role in the maintenance of retinal arterial tone. Here, we aimed to evaluate the effect and mechanism of this unidentified retinal factor on isolated bovine retinal arteries.

After the evaluation of vascular reactivity to various spasmogens as well as endothelial and smooth muscle relaxant capacities, retinal arteries fixed to a myograph system. The effect of retina was tested on precontracted arteries. Thereafter, the role of endothelium, ATP and calcium sensitive potassium channels, voltage-operated calcium channels (VOC), sarcoplasmic reticulum calciumATPase (SERCA), extracellular calcium, sensitivity to calcium and mechanisms related to calcium sensitization were investigated in the effect of retina.

Putting a piece of retinal tissue in close proximity to the precontracted retinal arteries produced acute and biphasic relaxation. Incubation of retinal arteries and retinal tissue with nitric oxide synthase, guanylate cyclase, cyclooxygenase, ATP and calcium sensitive potassium channels, VOC or SERCA inhibitors did not alter relaxant effect of retina. Retina derived relaxations did not change in calcium free medium however, decreased sensitivity of retinal arteries to calcium. Rho-kinase inhibitor Y27632, produced relaxations on precontracted retinal arteries similar to retina.

Our results showed that relaxant effect of retina is unrelated to endothelium, ATP and calcium sensitive potassium channels, VOC, SERCA pump or extracellular calcium. Mechanisms related to a decrease in the sensitivity of the contractile proteins to calcium and/or inhibition of rho-kinase may have a role in this relaxant effect.

Key Words: Retinal relaxing factor, isolated bovine retinal artery, potassium channels, calcium channels, rho-kinase.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Retinanın yapısını oluşturan hücrelerden veya retinal arterlerin endotel tabakasından çok sayıda endojen vazodilatör madde serbestlenmektedir. Retinadan serbestlenen bu maddeler, retinanın hücreler arası iletişiminin ve görme işlevinin sağlanmasına yardımcı olmanın yanı sıra retinal ve koroidal kan damarlarının tonüsünün düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. 1998 yılında Delaey ve Van de Voorde tarafından yapılan bir çalışmada retinadan kaynaklanan yeni bir gevşetici faktörün varlığı ortaya konulmuştur. İzole sığır retinal arterlerinde yapılan bu çalışmada, retinal dokudan tamamen temizlenmemiş retinal damarlarda prostaglandin $F_{2\alpha}$, tromboksan A_2 analogu U46619, serotonin ve endotelin-1 ile elde edilen kasılma yanıtlarının, retinadan tamamen temizlenmiş damarlarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile kastırılmış izole sığır retinal arterlerinin üzerine bir parça retina dokusunun yerleştirilmesinin retinal arterlerde gevşemeye neden olduğu gözlenmiş ve bu etkinin retinadan serbestlenen gevşetici bir faktör (retina kaynaklı gevşetici faktör; RRF) aracılığıyla gerçekleştiği öne sürülmüştür. Retina yerine bir parça koroid dokusunun yerleştirilmesinin ise retinal arterlerde benzer düzeyde bir gevşemeye neden olmadığı, bu nedenle retinaya bağlı gevşeme yanıtının mekanik bir etki sonucu oluşmadığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, RRF'in türe özgü olmadığı ve gevşetici etkisinin retinal arterle sınırlı kalmayıp farklı damarlar hatta damar dışı düz kaslarda da olduğu gösterilmiştir. RRF'in retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde rol oynayabileceği öne sürülmüş ve bu gevşetici faktörün bilinen endojen vazodilatör maddelerden (nitrik oksit, prostasiklin, adrenomedullin, kalsitonin gen ilişkili peptid vb) farklı, polipeptit veya protein yapısında olmayan, hidrofilik özellikte ve ısıya dayanıklı, stabil bir faktör olduğu bildirilmiştir. Ayrıca RRF'e ait yanıtların ortam pH'sındaki değişikliklerden etkilenmediği ancak akut hipokside potansiyalize olduğu gösterilmiştir. Etki mekanizmasına yönelik olarak yapılan çalışmalarda, RRF'in gevşetici etkisinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla birlikte plazmalemmal kalsiyumATP_{az} pompasının aktivasyonunun gevşetici etkiye kısmen aracılık ettiği öne sürülmüştür.

Retina ile ilişkili bazı göz hastalıklarında veya diyabet, hipertansiyon gibi gözü etkileyebilecek çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda retinal arterin tonüsünün bozulduğu bilinmektedir. Diyabetik retinopati, retinal arter oklüzyonu gibi retina hastalıklarına bağlı olarak gelişen tam veya kısmi görme kaybının patofizyolojisinde lokal etkili vazodilatör maddelerin etkinliğinin azaldığı öngörülmektedir. Retinada sentezlenmesi ve/veya serbestlenmesi azalan RRF, retinal kan akışını değiştirerek retinanın kanlanması ve retinal hücrelerin işlevlerinin bozulmasına neden olabilir. Bu nedenle, retinadan serbestlendiği ve retinal arterlerin tonüsünü düzenlediği düşünülen bu yeni faktörün yapısının, retinal arterdeki etkinliğinin ve etki mekanizmasının ortaya konulması önemlidir. Ancak, retinal gevşetici faktör ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır. Çalışmamızda yapısı henüz aydınlatılmamış ve üzerinde yeterince araştırma yapılmamış olan bu faktörün etkisini ve olası etki mekanizmasını sığır retinal arteri ve retina dokusu kullanarak incelemeyi amaçladık.

Bu amaçla öncelikle, izole sığır retinal arterlerinde çeşitli konstriktör ajanların (noradrenalin, tromboksan A_2 analogu U46619, endotelin-1 ve prostaglandin $F_{2\alpha}$) kümülatif doz-cevap eğrileri elde edilmiş ve arterlerin bu kastırıcı ajanlara karşı cevaplılığı belirlenmiştir. Ayrıca, retinal arterlerin endotel fonksiyonu ve düz kas gevşeme kapasiteleri değerlendirilmiştir. Daha sonra, kastırıcı ajanlarla benzer düzeyde prekontrakte edilen retinal arterlerin üzerine bir parça sığır retina dokusu yerleştirilerek retinanın etkisi incelenmiştir. Retina kaynaklı etkinin mekanik bir etki sonucu oluşup oluşmadığı, prekontrakte damarlar üzerine retina ile benzer büyüklükte koroid dokusu yerleştirilerek test edilmiştir.

Retinal arterde retinaya bağlı gevşeme yanıtının ortaya konulmasının ardından, prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde gevşetici etkinin mekanizmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. İlk olarak, elde edilen retina kaynaklı gevşetici etkinin endotel kaynaklı gevşetici faktörler olan nitrik oksit ve siklooksijenaz yolağı ürünü prostasiklin ile ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır. Bu deneylere paralel olarak, endotel tabakası mekanik olarak uzaklaştırılmış retinal arterlerde retinanın etkisi incelenmiştir. Daha sonra retinaya kaynaklı gevşetici etkide ATP duyarlı potasyum ve kalsiyum bağımlı potasyum

kanallarının, L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının, sarkoplazmik/endoplazmik retikulumda bulunan kalsiyumATP_{az} pompasının, ekstraselüler kalsiyumunun ve düz kasın kalsiyuma karşı duyarlılığının rolü incelenmiştir. Çalışmamızda ayrıca, retina kaynaklı gevşetici etkinin kalsiyum duyarlılaşması ile ilgili mekanizmalardan birisi olan rho-kinaz yolağı ile ilişkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla, prekontrakte edilen retinal arterler üzerinde rho-kinaz inhibitörü Y27632'nin etkisi incelenmiş ve elde edilen yanıtlar retina kaynaklı yanıtlar ile karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Görme Organı (Göz)

Görme organı (göz), başın sağ ve solunda yer alan iki göz çukuruna (orbita) yerleşmiş olup, dış dünya ile görsel bir bütünleşme sağlamamıza yardımcı olur. Anatomik olarak göz, her biri yaklaşık 24-25mm çapında ve 6.5mm^3 hacminde asimetrik bir küre görünümüne sahip biyokameradır. Göze dıştan bakıldığında ortada siyah renkli göz bebeği, hemen etrafında renkli kısım iris ve onları çevreleyen beyaz renkli sklera tabakası görülmektedir (1,2).

Göz küresinin duvar yapısı dıştan içe doğru anatomik olarak fibröz, vasküler ve sensoriyal olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Fibröz tabaka (tunica fibrosa), sklera ve korneadan oluşurken, vasküler tabaka, koroida, korpus siliyare ve iristen, sensoriyal tabaka ise retina tabakasından oluşur (1).

2.2. Retina

Retina, göz küresinin içinde arka kısım boyunca yerleşmiş çeşitli hücre katmanlarından ve birçok reseptörlerden oluşan yaklaşık 0.5mm kalınlığında bir tabakadır (1,2). Retinanın merkezini fovea oluşturur ve görmede keskinliği sağlayan bölgedir. Foveanın biraz uzağında beyaz görünümlü, yuvarlak şekilli, merkezinde optik sinirler ve ana retinal kan damarları bulunan bir bölge bulunmaktadır. Burası kör nokta olarak tanımlanır ve optik sinirin (nervus opticus) gözü terk ettiği bölgedir. Optik sinir, gangliyon hücrelerinin aksonlarını içerir ve beyine kadar ulaşır.

Retinanın diklemesine bir kesiti alındığında basitçe içten dışa doğru şu katmanlardan oluştuğu görülür (3);

- Pigment epitelyum
- Fotoreseptörler (çomak ve koni hücreleri)

- İç sınırlayıcı membran
- Müller hücreleri
- Yatay (horizontal) hücreler
- Bipolar hücreler
- Amakrin hücreleri
- Gangliyon hücreleri
- Sinir uçları tabakası
- Dış sınırlayıcı membran

2.2.1. Retina ile İlişkili Hastalıklar

Retina hastalıkları arasında en sık karşılaşılanları, vasküler retinopatiler, merkezi retinal arter ve ven tıkanmaları, diyabetik retinopati, yaş bağımlı maküler dejenerasyon, retina dekolmanı, retinitis pigmentosa ve glokom yer almaktadır (3,4). Bu hastalıklar retinanın kanlanması, yapısının veya bütünlüğünün bozulmasına yol açarak kısmi veya tam görme kaybına neden olmaktadır.

2.2.1.1. Vasküler Retinopati

Oküler veya sistemik hastalıklara bağlı olarak görülen retina kanaması, iskemisi veya enfarktüsü olarak da tanımlanabilir. Aterosklerotik veya hipertansif retinopati olarak iki yaygın şekli bulunmaktadır. Aterosklerotik retinopati, retinal arterlerin yaygın ateroskleroza ile karakterize olup, retinal arter ve arteriyollerin duvarlarının kalınlaşması durumudur. Hipertansif retinopati ise fundusta erken evrede lokal veya yaygın arteriyoller daralmaları ile karakterize ve esansiyel hipertansiyona veya gebelik toksemisine bağlı olarak görülen bir retina hastalığıdır. Tedavisi primer hastalığın kontrol altına alınması ile yapılmaktadır (3-5).

2.2.1.2. Merkezi Retinal Arter ve Ven Tıkanması

Merkezi retinal arter tıkanması ani ve ağrısız olarak gelişip, tek taraflı görme kaybına yol açmaktadır. Tıkanmaya emboli veya aterosklerotik plaklar neden olmaktadır. Göz küresi ışığa karşı zayıf reaksiyon göstermektedir. Merkezi retinal ven tıkanması ise daha çok yaşlılarda görülmektedir. Glokom, diyabet, kan viskozitesinin artması gibi sebepler ven tıkanıklığına yatkınlık oluşturmaktadır (6-8). Merkezi retinal ven tıkanıklığında, arter tıkanıklığına göre daha yavaş gelişen ve ağrısız görme kaybı oluşmaktadır. Hastalığın kesin tedavisi yoktur. Merkezi retinal arter tıkanıklığında parmakla göz kapakları üzerine masaj yapılarak göz içi basıncının düşürülmeye çalışılması ve embolinin yerinden oynatılarak arterin, daha küçük bir dalına doğru gitmesinin sağlanması, retinanın sirkülasyon bozukluğunun daha küçük kalmasına yardımcı olabilir (3,4).

2.2.1.3. Diyabetik Retinopati

Diyabetik retinopati, diyabetin yan etkileri olarak ortaya çıkmakta ve körlüğe yol açabilmektedir (3,4,9). Non-proliferatif ve proliferatif olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır (3,9). Non-proliferatif tipinde, artmış vasküler geçirgenlik, mikro anevrizmalar ve ödem görülmektedir. Proliferatif tipinde ise, yeni damar oluşumu ve ileri evrede retinanın pigment epitelyumdan ayrılması söz konusudur. Kesin primer tedavisi yoktur. Tedavi, diyabetin kontrol altına alınması ve düzenli göz kontrolü ile olmaktadır (3,4).

2.2.1.4. Yaş Bağımlı Maküler Dejenerasyon

Makülanın atrofi ve dejenerasyonudur. Yaşlanma ile birlikte görülen en yaygın retinal problemlerden birisidir. Körlüğe neden olabilir. Atrofik ve eksudatif maküla dejenerasyonu şeklinde iki tipi bulunmaktadır. Atrofik tipinde maküler bölgede pigment değişiklikleri mevcuttur. Hemoraji ve ödem görülmemektedir.

Eksudatif tipinde ise subretinal veya intraretinal hemorajiler ve eksudatif oluşumlar söz konusudur (3,4).

2.2.1.5. Retina Dekolmanı

Retina dekolmanı, nöral retinanın altındaki pigment epitelyumdan ayrılması durumudur. Hastalığın ilk evrelerinde dekolman lokal olsa da, tedavi edilmezse tüm retina dekole olabilir. Genellikle ileri derecede miyoplarda, katarakt cerrahisi veya oküler travma sonrasında ortaya çıkmaktadır. Retinada yırtık mevcuttur (3,4).

2.2.1.6. Retinitis Pigmentoza

Retinitis pigmentoza, esas olarak kalıtsal bir hastalık olup retinanın çomak hücrelerini etkilemektedir. Oftalmoskopik incelemede retinada siyah pigmentlenmeler görülmektedir. Retina damarları incelmekte ve zamanla görme kaybı gelişmektedir (3,4).

2.2.1.7. Glokom

Glokom, göz içi basıncının artmasına bağlı görme azalması olarak tanımlanmaktadır (3,4,10). Görme azalması hafif kayıptan tam körlüğe kadar gidebilmektedir. Primer ve sekonder olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Primer glokom da kendi içinde, akut veya kronik dar açılı ya da açık açılı glokom olarak ikiye ayrılmaktadır. Sekonder glokom ise uveit, göz içi tümörü vb hastalıklara bağlı olarak gelişmektedir. Göz içi basıncın artması vitröz basıncın da artmasına ve kan damarları ile optik sinirde basınç oluşmasına ve çeşitli vital hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Glokomun tedavisi göz içi basınç düşürülerek yapılmaktadır (3,4).

2.2.2. Retinanın Kanlanması

Retina çok sayıda reseptör ve sinir hücresi içermektedir. Retinanın kanlanması (mikrosirkülasyonu) bu reseptör ve hücrelerin fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için gerekli olan oksijen ihtiyacının karşılanması açısından önemlidir (11,12).

Retinanın oksijen ihtiyacı esas olarak koroidal ve retinal sirkülasyon aracılığıyla karşılanmaktadır. Retinal ve koroidal sirkülasyon hem anatomik hem de fonksiyonel olarak farklılıklar göstermektedir. Koroidal sirkülasyon hem sempatik hem de parasempatik sistem tarafından innerve edilirken retinal sirkülasyon otonomik innervasyona sahip değildir. Retinal sirkülasyon lokal vazoaaktif faktörler tarafından düzenlenmekte olup yüksek düzeyde oksijen içeren düşük akış hızına sahiptir. Bununla birlikte koroidal sirkülasyon ise düşük oksijen içeren yüksek akış hızına sahiptir (11).

Retinanın kanlanmasını sağlayan retinal damarlar, optik sinirin gözü terk ettiği bölgeden başlayarak tüm retina boyunca dağılım göstermektedir. Ancak retinal damarlar foveaya ulaşmamaktadır. Bu bölgenin oksijen ihtiyacı koroidal damarlar aracılığıyla karşılanmaktadır.

2.3. Retinal Arter

Merkezi retinal arter, merkezi retinal ven ile paralel seyrederek optik sinir ile birlikte göze girmekte ve retina boyunca dağılım göstermektedir (3). Merkezi retinal arter, retinanın iç katmanlarının kanlanmasını sağlamakla görevli olup, dış katmanlarına ulaşmamaktadır. Retinanın dış katmanları yaygın bir vasküler ağa sahip olan koroid tabakası tarafından beslenmektedir (11).

Merkezi retinal arter yapısı ve damarın büyüklüğü göz önüne alındığında “arter” olarak adlandırılrsa bile aslında bir “arteriyol” olup optik sinirle beraber göze

girdikten sonra anastomoz yapmaksızın dört ana dala ayrılmaktadır. Bunlar; inferior temporal, inferior makular, superior temporal ve superior makular retinal arteriollerdir (2). Oftalmoskop ile göze bakıldığında retinal arter parlak kırmızı, retinal ven ise koyu kırmızı renkte görünmektedir (3).

2.3.1. Retinal Arterin Endotel ve Düz Kas Fonksiyonu

Endotel tabakasından serbestlenen nitrik oksidin (NO) damar düz kas tonüsünü düzenlediği bilinmektedir. Asetilkolin, histamin, bradikinin gibi birçok endojen maddenin esasen endotel tabakasından NO serbestlenmesine neden olarak damar düz kasını gevşettiği, öte yandan sodyum nitroprusiyat ve papaverin gibi vazodilatör ajanların ise sırasıyla, NO açığa çıkararak ya da direkt düz kasa etki ederek gevşeme oluşturduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle asetilkolin (13,14), histamin (15), bradikinin (16), sodyum nitroprusiyat (13,14) ve papaverin (14,17) gibi çeşitli vazoaaktif maddeler, retinal damarların endotel fonksiyonunu veya düz kas gevşeme kapasitesini değerlendirmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır.

Retinal arterlerin endotel ve düz kas gevşeme kapasitelerini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerine kümülatif olarak asetilkolin veya sodyum nitroprusiyat uygulanmış ve her iki ajanın da retinal arterlerde konsantrasyon-bağımlı zayıf gevşemelere neden olduğu gösterilmiştir (13). Bir başka çalışmada, histaminin de retinal arterlerde asetilkolinle benzer düzeyde bir gevşeme yanıtı oluşturduğu bildirilmiştir (15). Trombin ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterlerinde yapılan bir çalışmada ise asetilkolin ve sodyum nitroprusiyatın gevşetici etkisinin retinal arterlerde düşük olduğu ancak direkt etki ile düz kasta gevşemeye neden olan papaverinin bu damarları tamamen gevşettiği gösterilmiştir (17). NO donörleri ile yapılan bir çalışmada NO açığa çıkaran bu ajanların izole sığır retinal arterlerinde zayıf bir gevşemeye neden olduğu ancak papaverinin bu damarları tamamen gevşettiği gösterilmiştir (14). NO ve sodyum nitroprusiyat gibi vazodilatörlerin gevşetici etkilerine hücre içinde yükselen siklik guanozin monofosfatın (sGMP) aracılık ettiği bilinmektedir. Bu bulgular doğrultusunda, sığır retinal arterlerin tonüsünün

düzenlenmesinde sGMP aracılı mekanizmaların etkisinin zayıf olduğu bildirilmektedir.

2.3.2. Retinal Arterin Tonüsünün Düzenlenmesi

Retinanın yapısını oluşturan hücrelerden veya retinal arterlerin endotel tabakasından çok sayıda endojen vazoaaktif madde serbestlenmektedir (12,18-21). Bu maddeler, retinanın hücreler arası iletişiminin ve görme işlevinin sağlanmasına yardımcı olmanın yanı sıra retinal ve koroidal kan damarlarının tonüsünün düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (11,12,19). Retinal damarların tonüsünü düzenleyen bu vazoaaktif maddeler temelde vazokonstriktör ve vazodilatör etkili maddeler olarak iki gruba ayrılmaktadır.

Endotelin-1 damarlarda kendisine ait ET_A ve ET_B reseptörlerine bağlanarak etki gösteren endotel kaynaklı vazokonstriktör bir maddedir (12,20). Tavşanlarda yapılan bir çalışmada gözün vitröz hümörüne enjekte edilen endotelin-1'in retinal arterleri kastırdığı gösterilmiştir (22). Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada ise, intravenöz endotelin-1 uygulanmasının, deneklerin retinal arterlerinde daralmaya neden olduğu ve bu daralmanın spesifik ET_A reseptör blokleri BQ-123 ile geriye döndüğü ortaya konmuştur (23). Ayrıca, Behçet hastalarında oküler endotelin-1 düzeylerinin arttığı ve bu artışın retinal arter ve ven daralmasına neden olduğu bildirilmektedir (24).

Arakidonik asit metabolizması ürünleri olan prostaglandin F_{2α}, ve tromboksan A₂'nin de retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (12). İzole sığır retinal arterleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda prostaglandin F_{2α} ve tromboksan A₂ analogu U46619'un kastırıcı etkileri gösterilmiştir (25,26). Bir çalışmada prostaglandin F_{2α} ve tromboksan A₂ analogu U46619'un retinal arterleri kastırıcı etkisi endotelin-1 ile karşılaştırılmış ve retinal arterlerin endotelin-1'e karşı daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (26).

Retinal damarlar her ne kadar otonom sinir sistemi tarafından innerve edilmese de dolaşımdaki katekolaminlerin ve serotoninin retinal arterleri kastırıcı etkilerinin olduğu ve retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde rolünün olabileceği ileri sürülmüştür (12). Bu görüşü destekleyici olarak, izole sığır retinal arterlerinde noradrenalin (17) ve serotoninin (17,26) kasılmaya neden olduğu gösterilmiştir.

Renin–anjyotensin sistemi birçok fizyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Yapılan radyoligand bağlanma çalışmalarında insan ve sığır retinal damarlarında anjyotensin için bağlanma bölgelerinin olduğu bildirilmiştir (12). Bununla birlikte, in vitro çalışmalarda anjyotensin II'nin insan posterior siliyer arterlerinde (27) kasılma oluşturmaya rağmen, sığır retinal arterlerinde (28) kastırıcı etkisinin olmadığı gösterilmiştir.

Retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde vazokonstriktör etkili faktörlerin yanısıra vazodilatör maddelerin de rolü bulunmaktadır (11,12,18,19). Retinadan ve/veya retinal arterlerin endotel tabakasından serbestlenen NO, düz kasta guanilat siklazı aktive ederek sGMP düzeylerini yükseltmekte ve retinal arterlerin gevşemesine neden olmaktadır. Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada intravenöz NO sentaz inhibitörü L-NMMA uygulanmasının deneklerin ortalama kan basıncını ve kalp atım sayısını arttırdığı, retinal arterlerde daralmaya neden olduğu gösterilmiş ve bu daralmanın retinal arterlerin endotel tabakasından serbestlenen NO'nun sentezinin inhibisyonu sonucu olduğu ileri sürülmüştür (29). Kedilerde yapılan bir başka çalışmada ise intravenöz olarak NO sentaz inhibitörü L-NAME'in uygulanmasının retinal arterlerde kasılmaya neden olduğu ve retinal kan akışını azalttığı gösterilmiştir (30). İn vitro çalışmalarda da asetilkolin, histamin gibi vazodilatör maddelerin protaglandin F_{2α} ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterlerinde gevşemeye neden olduğu ve bu gevşemenin NO aracılı olduğu ortaya konmuştur (13-15).

Endotelden serbestlenen bir başka gevşetici faktör ise prostasiklidir (19,25). Prostrasiklin, arakidonik asidin siklooksijenaz yolağı ürünü olup, damar düz kasında adenilat siklaz enzimini aktive etmekte ve siklik adenozin monofosfat (sAMP)

düzelelerini yükselterek gevşemeye neden olmaktadır. İnsan gözünde yapılan bir araştırmada lamina kribrozanın astrositlerinde siklooksijenaz-1 enziminin bulunduğu ve bu enzimin vazodilatör prostaglandinler ve diğer eikozanoidlerin sentezlenmesine ve serbestlenmesine neden olarak optik sinir hasarında koruyucu rol oynadığı bildirilmiştir (31). İn vitro bir çalışmada ise kümülatif olarak prostasiklin uygulanmasının prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen sığır retinal arterlerinde konsantrasyon-bağımlı gevşemelere neden olduğu gösterilmiştir (25).

Retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde bütün bu vazoaktif maddelerin yanı sıra retinadan serbestlenen gamaamino bütirik asit (GABA) (26), glutamat (26), glisin (26,32), adenzin (26), adrenomedullin (33) ve kalsitonin gen ilişkili peptit (CGRP) (34,35) gibi maddelerin de rolünün olabileceği bildirilmektedir. Ayrıca, retinal damarların içinden geçen kanın pH'sının, parsiyel O_2 ve CO_2 basıncının da retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde etkisinin olabileceği gösterilmiştir (11,12). 1998 yılında sığır retinal arterleri ve retinasında yapılan bir çalışmada ise retinadan gevşetici bir faktörün serbestlendiği ve bu yeni faktörün retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde rolünün olabileceği ileri sürülmüştür (26).

2.4. Retina Kaynaklı Gevşetici Faktör (RRF)

Son otuz yılda detektör kan damarları üzerinde donör dokuların etkilerinin incelendiği birçok çalışma yapılmış ve bu sayede damar tonüsünü regüle eden NO, prostasiklin gibi önemli vazoaktif maddeler bulunarak yapıları aydınlatılmıştır (36). 1998 yılında yapılan benzer bir çalışma ile Cristophe Delaey ve Johan Van de Voorde adlı araştırcılar doku kaynaklı yeni bir faktörün varlığından bahsetmişlerdir (26). İzole sığır retinal arterlerinde yapılan bu çalışmada, retinal dokudan tamamen temizlenmemiş damarların prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile elde edilen kasılma yanıtlarının, retinadan tamamen temizlenmiş damarlarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu gösterilmiştir (26). Araştırmacılar, tromboksan A_2 analogu U46619, serotonin ve endotelin-1 gibi diğer kastırıcı ajanlarla da benzer yanıtları elde etmişler ve retinal arterlerin tonüsünün retina varlığında regüle edildiğini bildirmişlerdir (26). Aynı

çalışmada prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile kastırılmış izole sığır retinal arterlerinin üzerine bir parça retina dokusunun yerleştirilmesinin retinal arterlerde gevşemeye neden olduğu gösterilmiş ve bu etkinin retinadan serbestlenen gevşetici bir faktör (retina kaynaklı gevşetici faktör; RRF) aracılığıyla gerçekleştiği öne sürülmüştür. Retina yerine bir parça koroid dokusunun yerleştirilmesinin ise retinal arterlerde benzer düzeyde bir gevşemeye neden olmadığı, bu nedenle retinaya bağlı gevşeme yanıtının mekanik bir etki sonucu oluşmadığı bildirilmiştir (26). Köpek (26), domuz (26), sıçan (37) ve fare (38) retinalarıyla yapılan çalışmalarda da retinadan gevşetici bir faktörün serbestlendiği gösterilmiş ve böylece bu faktörün türe özgü olmadığı ortaya konulmuştur. İlginç olarak, RRF'in etkisinin retinal arterle sınırlı kalmadığı, sıçan mezenterik (26), renal (26), karotid arterini (37), fare aortasını (38) ve hatta damar dışı bir düz kas olan sıçan bronş düz kasını (26) da gevşettiği gösterilmiştir.

Retinal arterlerin tönüsünün düzenlenmesinde NO'nun ve siklooksijenaz yolağının vazodilatör ürünlerinin rolünün olduğu bilinmektedir (11,12,18,19). Araştırmacılar NO sentaz, guanilat siklaz ve siklooksijenaz enzimlerinin spesifik inhibitörlerini kullanarak ya da retinal arterleri deendotelize ederek yaptıkları çalışmalarda RRF'in NO veya siklooksijenaz yolağı ürünlerinden farklı olduğunu ve gevşetici etkisinin sGMP aracılı olmadığını bildirmişlerdir (26,37,38). Elde edilen bu bulgular biyoassay çalışmalarıyla da desteklenmiş ve RRF'in polipeptit veya protein yapısında olmayan, hidrofilik özellikte, ısıya dayanıklı stabil bir faktör olduğu ileri sürülmüştür (26). pH ve pO_2 basıncındaki değişikliklerin damar düz kas tonüsünü etkilediği bilinmektedir (11,12). Ortam pH'sının değişmesinin (26) RRF'in gevşetici etkisini değiştirmediği, akut hipoksinin (37,38,39) ise RRF yanıtını potansiyalize ettiği gösterilmiştir.

RRF yanıtının genel özelliklerini ortaya koyan bu çalışmaların ardından etki mekanizmasına yönelik araştırmalar da yapılmıştır. Bu çalışmalarda, RRF'in gevşetici etkisinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, plazmalemmal kalsiyum-ATP_{az} pompasının aktivasyonunun, gevşetici etkiye kısmen aracılık ettiği öne sürülmüştür (37).

Adrenomedullin (33) ve CGRP'nin (34,35) retinal arterleri gevşetici yönde etkilerinin olduğu ve bu maddelerin retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde rolünün olabileceği bilinmektedir. RRF'in adrenomedullin veya CGRP olabileceği düşünülmüş ve bu vazoaaktif maddelerin izole sığır retinal arterleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Adrenomedullin veya CGRP'nin retinal arterlerdeki gevşetici etkilerinin esas olarak NO aracılı olması, RRF'in bu endojen maddelerden farklı olduğunu ortaya koymuştur (33,35).

2.5. Potasyum Kanalları

Damar düz kas hücresi membran potansiyeli ve damar düz kas tonüsü arasında sıkı bir ilişki vardır. Damar düz kas hücresi membran potansiyelindeki küçük değişimler, hücre içi kalsiyum düzeylerinde veya kontraktıl proteinlerin kalsiyuma olan duyarlığında değişikliğe yol açarak, damarlarda kasılma veya gevşemeye neden olmaktadır. Damar düz kas hücrelerinin membranlarında bulunan potasyum kanallarının açılması hücre içinden potasyum çıkışını artırarak hücre membranda hiperpolarizasyona neden olur. Hücre membranının hiperpolarize hale gelmesi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını kapatarak hücre içine kalsiyum girişinin azalmasına ve vazodilatasyona neden olmaktadır. Bazı endojen maddeler (CGRP, adenozin vb) ve çeşitli yapıdaki kimyasallar (pinasidil, kromakalim, NS004, 4-aminopiridin vb) bu kanalları açarak hücre membranında hiperpolarizasyona neden olurken, magnezyum iyonu, glibenklamid, tetraetilamonyum, iberiotoxin vb maddeler ise bu kanalları kapatarak depolarizasyon oluştururlar (40-43).

Damar düz kası hücre membranında temel olarak 4 tip potasyum kanalı bulunmaktadır (40-43). Bunlar;

- Voltaj bağımlı potasyum kanalları (K^+_{v})
- Kalsiyum ile aktive potasyum kanalları ($K^+_{Ca^{++}}$)
- İçe akım (inwardly rectifier) potasyum kanalları (K^+_{ir})
- ATP duyarlı potasyum kanallarıdır (K^+_{ATP}).

Bu kanalların yanı sıra damar endotel hücrelerinde asetilkoline duyarlı potasyum kanalları ile hücre içi potasyum iyonun dengesinin sağlanmasında önemli rol oynayan sodyum/potasyumATP_{az} iyon değiştiricisinin de hücre membranına görev aldığı bilinmektedir (44). Ancak bu kanallar ve iyon değiştiricisi damar düz kas tonüsünün düzenlenmesinde önemli rol almamaktadır.

2.5.1. Voltaj Bağımlı Potasyum Kanalları (K⁺_v)

Bu kanallar hücre membranı depolarize olduğunda açılmaktadır (40-43). Hücre membranının depolarizasyonu K⁺_v kanallarını açarak elektrokimyasal bir güç oluşturmakta ve potasyumun hücreden çıkışını arttırmaktadır. Membran depolarizasyonu ile birlikte bu kanalların aktivasyonu, aynı zamanda inaktivasyon sürecini de başlatmaktadır. Ancak, inaktivasyon süreci aktivasyona göre daha yavaş ve uzun sürede gerçekleşmektedir. Bu durum bir çeşit negatif feedback mekanizma gibi çalışarak hücre membranının aşırı depolarizasyonunu da engellemektedir (43). Damar düz kas K⁺_v kanallarının selektif inhibitörü 4-aminopiridindir. Bununla birlikte, fensiklidin ve kinidin de bu kanallar üzerinde inhibitör etki göstermektedir. Ayrıca, tetraetilamonyumun da, K⁺_{Ca++} kanallarını bloke eden konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyonlarda (K_i> 5mM), K⁺_v kanalları üzerine inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (43).

2.5.2. Kalsiyum ile Aktive Potasyum Kanalları (K⁺_{Ca++})

Kalsiyum ile aktive potasyum kanalları hücre içi kalsiyum düzeyinin artması veya membran depolarizasyonu ile aktive edilmektedir (40-43). Damar içi basıncın artması damar düz kas hücrelerinin depolarizasyonuna ve vazokonstriksiyona neden olur. Oluşan bu tonüs, myojenik tonüs olarak adlandırılmakta ve periferik damar direncinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Damar içi basıncın artmasının tetiklediği membran depolarizasyonu hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttırmakta ve K⁺_{Ca++} kanallarını aktive etmektedir. K⁺_{Ca++} kanallarının aktivasyonu potasyumun hücre içinden çıkışını arttırmaktadır. Artan potasyum çıkışı, membran

polarizasyonuna neden olarak myojenik tonüsün ya da çeşitli konstriktör ajanların oluşturduğu kasılmaya karşı ters yönde etki göstermektedir. $K^{+}_{Ca^{++}}$ kanallarının aktivasyonu damar düz kasının hiperpolarizasyonuna neden olarak gevşemesini sağlar. Damar içi basıncın düşürülmesi veya kalsiyum kanallarının bloke edilmesi ise $K^{+}_{Ca^{++}}$ kanallarının inaktive olmasına neden olur. $K^{+}_{Ca^{++}}$ kanalları bu mekanizmalar aracılığı ile membran potansiyelinin ve damar düz kas tonüsünün düzenlenmesinde aktif bir rol oynamaktadır (43).

Kalsiyum ile aktive potasyum kanallarının temelde iki alt tipi bulunmaktadır (40,42,43,45). Bunlar; büyük ($BK^{+}_{Ca^{++}}$) ve küçük kondüktans ($SK^{+}_{Ca^{++}}$) kalsiyum ile aktive potasyum kanallarıdır. Ayrıca, orta (intermediate) kondüktans ($IK^{+}_{Ca^{++}}$) kalsiyum ile aktive potasyum kanalları da tanımlanmıştır. Tetraetilamonyum, karibdotoksin, iberiotoksin ve apamin bu kanalların selektif inhibitörleridir. Tetraetilamonyumun her iki alt tipe, karibdotoksin ve iberiotoksinin $BK^{+}_{Ca^{++}}$ kanallarına, apaminin ise $SK^{+}_{Ca^{++}}$ kanallarına karşı daha selektif olduğu bildirilmiştir (40,43,45).

Kalsiyum ile aktive potasyum kanallarının alt tipleri olan $BK^{+}_{Ca^{++}}$ ve $SK^{+}_{Ca^{++}}$ kanallarının hormon sekresyonu, nörotransmitter serbestlenmesi, kalp hızı, damar reaktivitesi, düz kas tonüsünün düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik olayda görev aldığı ortaya konmuştur (43,45,46). Bu kanallar çok sayıda endojen hormon, nörotransmitter, arakidonik asit metabolitleri, siklik nükleotidler tarafından regüle edilmektedir (46). NO'nun, çeşitli damarlardaki gevşetici etkisini, doğrudan veya sGMP-bağımlı protein kinazlar aracılığıyla, $BK^{+}_{Ca^{++}}$ kanallarını açarak gösterdiği ortaya konmuştur (46). Benzer şekilde, arakidonik asit veya metabolitleri sGMP aracılı bir mekanizma ile bu kanalları aktive edebilmektedir. Bir çalışmada, arakidonik asit metaboliti olan 11-12-epoksieikozatrienoik asitin insan mamaryal arterinde oluşturduğu gevşemenin $BK^{+}_{Ca^{++}}$ kanalı inhibitörü iberiotoksin tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (46). Ayrıca, $BK^{+}_{Ca^{++}}$ ve $SK^{+}_{Ca^{++}}$ kanallarının endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktörün (EDHF) etkisinde rolü olduğu düşünülmektedir (44,47,48). Yapılan çeşitli çalışmalarda, bu kanalların spesifik inhibitörleri apamin veya karibdotoksinin endotel kaynaklı hiperpolarizasyonu inhibe ettiği, hatta bu

inhibitörlerin kombine olarak kullanılmasının EDHF etkisinde daha güçlü bir inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Örneğin, izole sığır gözünün siliyer arterlerinde yapılan bir çalışmada $BK^{+}_{Ca^{++}}$ ve $SK^{+}_{Ca^{++}}$ kanallarının inhibitörleri karibdotoksin ve apaminin, EDHF aracılı gevşemeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (47). Kobay karotid arterinde yapılan bir çalışmada ise EDHF aracılı vazodilatasyonun $BK^{+}_{Ca^{++}}$ ve $SK^{+}_{Ca^{++}}$ kanalları inhibitörlerinin kombine kullanılması ile tamamen inhibe olduğu bildirilmiştir (48).

2.5.3. İç Akım (Inwardly Rectifier) Potasyum Kanalları (K^{+}_{ir})

Bu kanallar birçok hücre çeşidinde bulunmaktadır. Küçük arter veya arteriyollerin düz kas hücrelerinin istirahat halindeki potasyum kondüktansını düzenlemektedir (49). Genelde damar boyutu arttıkça bu kanalların hücre membranındaki yoğunluklarının azaldığı ve büyük damarlarda bu kanalların bulunmadığı bildirilmektedir (42). K^{+}_{ir} kanallarının hipoksi, iskemi veya hipoglisemi gibi patolojik durumlarda aktive olduğu ve hücre dışı potasyum iyonunu düşük miktarda (15mM'a kadar) arttırarak damarlarda gevşemeye neden olduğu bildirilmiştir (42). Bu gevşeme yanıtı, hücre dışı potasyum miktarındaki artışa bağlı olarak, potasyum iyonlarının plazma membranı boyunca ters potansiyel oluşturması ve dışa K^{+}_{ir} akımını artırması sonucu meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu bu kanalların 6 farklı alt tipinin olduğu, ancak K^{+}_{ir2} alt tipinin güçlü içe akım gösterdiği ve fonksiyonel olduğu bildirilmiştir (42,49).

2.5.4. ATP Duyarlı Potasyum Kanalları (K^{+}_{ATP})

Bu kanallar ilk olarak kalp kası hücrelerinde gösterilmiştir. Bu kanalların özellikle pankreasın beta hücrelerinden insülin sekresyonu, kalbin iskemi-reperfüzyon hasarından korunması ve düz kas tonüsünün düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte K^{+}_{ATP} kanallarının üriner sistem, gastrointestinal bölge, kan damarları vb birçok düz kas hücre tipinde bulunduğu ve tonüsün düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir (42,49). Bu kanallar içe akım

kanallarının bir üyesi olup, voltaja bağlı olmaksızın aktive olmaktadır (42). K^+_{ATP} kanalları çok sayıda potasyum kanal açıcıları (pinasidil, kromakalim vb) tarafından aktive edilirken sülfonilüre türevi antidiyabetik bir ilaç olan glibenklamid ile selektif olarak inhibe edilmektedir.

2.6. Kalsiyum Kanalları

Kalsiyum iyonu, hücrelerin büyümesi, bölünmesi, eksitabilitesi ve hücrelerde çeşitli maddelerin sentezlenip serbestlenmesi gibi birçok önemli olayda rol oynamaktadır (50-52). Kalsiyum iyon konsantrasyonunun sitoplazmada kısa süreli değişmesi ile hücresel yanıtlar oluşmaktadır. İstirahat halindeki damar düz kas hücrelerinin hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ($0.1\mu M$), hücre dışı kalsiyum konsantrasyonuna göre (1-2mM) yaklaşık olarak 10000 kat daha azdır. Bu fark, plazma membranından sınırlı oranda kalsiyum geçişine izin verilmesi, hücre membranında bulunan aktif transport mekanizmaları ve hücre içi depolarda kalsiyumun depolanmasının bir sonucu olarak oluşmaktadır (50). İstirahat halinde, hücre içi ve dışı kalsiyum iyon konsantrasyonları arasında bu farkın bulunmasına rağmen sitoplazmaya kalsiyum iyonu girişi, hücre membranının eksite olabilir kalsiyum kanallarının kapalı olması nedeniyle yavaş gerçekleşmektedir. Damar düz kasının uyarılması için intraselüler kalsiyum düzeylerinin, yaklaşık $1\mu M$ düzeyine kadar çıkarılması gerekmektedir (50). Ancak damar düz kas hücresinde bu konsantrasyona homeostaz mekanizmaları nedeniyle istirahat halinde ulaşılması mümkün değildir. İstirahat halindeki damar düz kas hücresinde hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun bu kritik değerin altında tutulmasını sağlayan en az 5 muhtemel mekanizma vardır (50-52). Bunlar;

- Plazma membranı boyunca kalsiyum iyonunun ekstraselüler aralığa aktif transportu (plazmalemmal $Ca^{++}ATP_{az}$)
- İyon değiş-tokuşu (3 mol sodyum hücre içine alınırken 1 mol kalsiyum ekstraselüler aralığa taşınır)
- Sarkoplazmik retikuluma transport

- Mitokondri lümenine pasif transport
- Nükleusa transport

Kalsiyum hücrenin en önemli ikincil ulaklarından biri olduğu için bu iyonun homeostazında başka mekanizmalarda rol almaktadır. Bunlar hücre membranındaki potasyum ile aktive olan kalsiyum kanalları, klorür ile aktive olan kalsiyum kanalları ve kalsiyum ile aktive olan kalsiyum kanallarıdır (50). Bu kanalların yanısıra, kalsiyumun hücre içinde depolandığı en önemli organel olan sarkoplazmik/endoplazmik retikulumun membranına yerleşmiş olan, kalsiyumATP_{az} (SERCA) ile rianodin ve inozitol-1,4,5-trifosfat (İP₃) reseptör aracılı kalsiyum kanalları da damar düz kas hücresinde kalsiyum iyonunun homeostazında görev yapmaktadır (50,53). Temelde bu mekanizmaların tümü birbirinden bağımsız olmayıp ilişki içerisindedir.

Damar düz kas hücresinin homeostazının sağlanması, kasılma, gevşeme ve hücre proliferasyonu gibi önemli hücresel yanıtların ortaya çıkmasında başlıca iki tip kalsiyum kanalı rol oynar. Bunlar, *voltaj bağımlı kalsiyum kanalları ve reseptör aracılı kalsiyum kanallarıdır* (50,54,55). Bu kanallar birbirlerinden ayrı aktive olabildikleri gibi birinin aktivasyonu dolaylı olarak diğerinin aktivasyonuna da yol açabilmektedir.

2.6.1. Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları

Hücrelerde membran boyunca yerleşmiş 6 tip voltaj bağımlı kalsiyum kanalı bulunmaktadır. Bunlar, genellikle damar düz kası ve kalp kası hücrelerinde bulunan ve uzun sürede kapanabilen L-tipi, kısa süreli aktive olan T-tipi, nöronlarda sıkça bulunan N- tipi ile Q, P ve R tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarıdır (50-52).

2.6.1.1. L-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları

Yüksek voltaj ile aktive olan kalsiyum kanalları olarak da adlandırılırlar (50-52). Hücre membranına yerleşmiş glikoprotein yapısında iyon kanallarıdır. α_1 , α_2 , β , δ , γ olmak üzere 5 çeşit alt tipi vardır (50,51). En önemli alt tip α_1 olup kalsiyum kanal modülatörleri için özel bağlanma yerleri taşımaktadır. Bu kanallar T-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarına göre daha uzun sürede açılıp kapanmaktadır. Bay k 8644 spesifik agonisti olup, nifedipin gibi dihidropridin türevi antagonistlere karşı duyarlılık göstermektedirler.

Bu kanallar yaklaşık 25 pS'lik kondüktansa sahip olup, güçlü bir depolarizasyonla aktive edilirler (-40 mV – 0 mV) (50). Damar düz kas hücrelerinin birçoğunda voltaj bağımlı kalsiyum girişinin sağlanmasında L-tipi kalsiyum kanalları en önemli rolü üstlenmektedir.

Damar düz kas hücrelerinin bir stimulus ile depolarizasyonu bu kanalları açmakta ve hücre içine kalsiyum iyonu girmesi sonucu hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artmaktadır. Hücre içinde konsantrasyonu artan kalsiyum iyonları kalsiyum bağlayıcı bir protein olan kalmodulin (damar düz kası için) ile birleşerek (çizgili kaslarda troponin) kasılmaya neden olmaktadır. Ayrıca, hücre içi depolardan kalsiyum açığa çıkışı da L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını aktive edebilmektedir (50-52).

2.6.1.2. T-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları

Bu kanallar yaklaşık 5-9 pS kondüktans ile kısa bir süre açık kalarak -80 mV düzeyinde aksiyon potansiyeline sahip bir hücreyi -20 mV düzeyinde bir aksiyon potansiyeline kadar ulaştırabilmektedir. Bu özelliği ile diğer tip kalsiyum kanallarından ayrılmaktadır. T-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalları dihidropridin türevi kalsiyum antagonistlerine karşı duyarlı değildir (50,56).

Merkezi sinir sistemi üzerine etkili antiepileptik ilaçların etkilerini T-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalları üzerinden gösterdiği düşünülmektedir (50). Antihipertansif ve antianjinal etkili mibefradil, kalp kası hücrelerindeki T-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını bloke ederek etkisini göstermektedir (50,56). Ancak bu ilaç, çeşitli yan etkileri nedeniyle klinikte kullanımdan geri çekilmiştir.

2.6.1.3. N-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları

Bu tip kalsiyum kanalları ne L ne de T-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarına benzediği (neither L- nor T type) için bu adı almıştır. N-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalları, L-tipi kalsiyum kanalları gibi yüksek voltaj ile aktive olan kalsiyum kanalları olup omega-konotoksin-GVIA (ω -CgTx) ile selektif bir şekilde bloke edilmektedir (50,52). Dihidropridin türevi kalsiyum antagonistleri bu kanallara karşı düşük düzeyde afinite göstermektedirler.

2.6.1.4. P- Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları

İlk kez beyincik purkinje liflerinde tanımlandıkları için bu adı almışlardır. Yüksek voltaj ile aktive olan kalsiyum kanallarıdır. Huni-ağ toksini (FTX, funnel web toxin) ve omega-agatoksin-İVA (ω -AGA-İVA) ile selektif olarak bloke edilebilirler (50).

2.6.1.5. R ve Q-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları

Bu tip kanallar esas olarak merkezi sinir sistemindeki nöronlarda bulunurlar.

Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının aktivasyonu hücre membranına yerleşmiş halde bulunan sodyum/kalsiyum iyon değiştiricisini ve kalsiyumATP_{az} pompasını da aktive etmektedir. Ayrıca, depolarizasyona bağlı olarak hücre içi

kalsiyum konsantrasyonunun artması, hücre içi depolardan kalsiyum ile aktive olan kalsiyum serbestlenmesine de neden olmaktadır.

2.6.2. Reseptör Aracılı Kalsiyum Kanalları

Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının aksine reseptör aracılı kalsiyum kanalları hakkındaki bilgiler nispeten sınırlıdır. Damar düz kası hücrelerinin kasılma oluşturabilmesi için ekstraselüler aralıktan hücre içine kalsiyum girişinin sağlanması gerekmektedir. Hücre içine kalsiyum girişi için iki temel mekanizma vardır. Bunlar, daha öncede belirtildiği gibi voltaj bağımlı kalsiyum kanalları ve reseptör aracılı kalsiyum kanallarıdır. Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının varlığı hücre düzeyinde uygulanan özel bir teknik (patch-clamp) aracılığı ile birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (50,55). Ancak reseptör aracılı kalsiyum kanallarının belirlenmesi çok daha zor olmuştur. Bazı hücrelerde noradrenalinin nonselektif bir kanalı açarak kalsiyum iyonunu da içeren çeşitli pozitif yüklü iyonların girişine izin verdiği bildirilmiştir (50). Daha sonra, reseptör aracılı katyon akımları birçok düz kas hücresinde gösterilmiştir. Bu kanalların aktivasyonu ile sadece kalsiyum iyonlarının hücreye transportunun sağlanmayıp, diğer pozitif yüklü iyonların transportunun da yapıldığı belirlenmiştir. Bu nedenle, bu kanallara, reseptör aracılı kalsiyum kanalları yerine reseptör aracılı katyon kanalları da denilmektedir (50,55).

Reseptör aracılı katyon kanalları membran depolarizasyonuna ve voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının inhibitörlerine karşı duyarsızdırlar. Ancak bu kanalların aktivasyonu depolarizasyona neden olabilir. Bu kanallar bir agonist aracılığıyla aktive olabildikleri gibi artan hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ile de aktive olabilmektedir (50,55).

Reseptör aracılı katyon kanalların uyarılması sonucu G-proteini ile kenetli reseptörler aktive olmaktadır (50,51,57). G-proteini kenetli reseptör ile reseptör aracılı katyon kanalları arasındaki bu ilişki çeşitli dokularda tanımlanmıştır. Agonist tarafından indüklenerek konformasyonel değişikliğe uğrayan reseptör, kenetli halde

inaktif şekilde heterotrimerik durumda bulunan G-proteinini aktive etmektedir. G-proteini, α, β, γ alt birimlerinden oluşmaktadır. İnaktif konumda bu üç alt birim birbiri ile kenetlidir. Reseptördeki konformasyonel değişiklik ile aktive edilen G-proteini 1 mol guanozin trifosfat (GTP) harcayarak G_α ve $G_{\beta\gamma}$ şeklinde ikiye ayrılır. Her iki alt tip farklı tip fosfolipaz C (PLC) izozimlerini aktive edebilir. Aktive olan PLC, fosfotidilinozitol 4,5 bifosfatı, diaçilgliserole (DAG) ve inozitol trifosfata (IP_3) hidroliz eder. DAG, protein kinaz C'yi (PKC) aktive eder ve hücre yanıtı oluşur. IP_3 ise sarkoplazmik/endoplazmik retikulum membranında bulunan kendi reseptörlerine bağlanır. Böylece hücre içinde IP_3 kenetli kalsiyum kanalları açılır, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve hücre sel yanıt oluşur (50,51,57).

Reseptör aracılı katyon kanallarının aktivasyonu hücre içi kalsiyum düzeylerini doğrudan değiştirebildiği gibi, dolaylı bir şekilde voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını aktive ederek de değiştirebilmektedir. Hücre içi kalsiyum düzeylerinin IP_3 , IP_4 gibi ikincil ulaklar aracılığıyla yükseltilmesi membran depolarizasyonuna neden olmakta ve kalsiyum bağımlı klorür akımlarını aktive ederek voltaj bağımlı kalsiyum kanallarından kalsiyumun hücre içine girişini de (inflüks) stimule edebilmektedir (50,51). Hücre içi kalsiyum düzeylerindeki artış kalsiyum aracılı potasyum kanallarını aktive ederek hiperpolarizasyona da neden olmaktadır (41,42,50). Dolayısıyla bu tip kanalların aktivasyonu, kalsiyum bağımlı potasyum kanallarının (hiperpolarizasyon) ya da klorür kanallarının aktive (depolarizasyon) olmasına bağlı olarak zıt etkilere de aracılık edebilmektedir.

2.6.3. Sodyum / Kalsiyum İyon Değiştiricisi

Bu taşıyıcı sistem kalsiyum iyonu için zayıf afinite göstermesine rağmen yüksek düzeyde kalsiyum iyonu taşıma kapasitesine sahiptir. Normal fizyolojik koşullarda, sodyum elektrokimyasal gradiyenti doğrultusunda hücre içine girerken, kalsiyum gradiyentinin tersi yönünde hücre dışına atılmaktadır. Bu sistem hücre içi sodyum ve kalsiyum iyonlarının konsantrasyonlarına bağlı olarak çift yönlü çalışmaktadır. 2'-4'-diklorobenzamil ve klorobenzil-dimetil benzamil gibi amilorid türevi ilaçlar bu değiştiricinin selektif blokerleridir. Bu değiştirici sistem genellikle

elektrojenik pompa olarak bilinmektedir. Bu pompa ile üç sodyum iyonu hücre içine alınırken bir kalsiyum iyonu hücre dışına atılır. Bu değiştirici sistemin temel işlevi hücre içi kalsiyum düzeylerinin 1 μ M düzeylerini aştığı durumlarda fazla kalsiyumun hücreden atılmasını sağlamaktır (50,51).

2.6.4. Plazmalemmal KalsiyumATP_{az}

Plazmalemmal kalsiyumATP_{az}, kalsiyuma yüksek afinite gösteren ve kalsiyum taşıyıcı kapasitesi yüksek olan bir aktif transport sistemidir (50,51). Plazmalemmal kalsiyum pompası olarak da adlandırılmaktadır. Bu pompa birçok dokuda tanımlanmış olup yaklaşık 140 kDa ağırlığında ve protein yapısındadır. Katalitik ve düzenleyici iki alt birimden oluşmakta, katalitik aktivitesi için magnezyum iyonuna ihtiyaç duymaktadır. Genel olarak elektronötral kabul edilmektedir. Bu pompa aracılığı ile bir kalsiyum iyonu hücre dışına atılırken iki hidrojen iyonu içeri alınmaktadır. Dolayısıyla bu aktif transport sistemi hücre içi pH'sının kontrolünde de önemli rol oynamaktadır (50). Plazmalemmal kalsiyumATP_{az}, sodyum/potasyumATP_{az} inhibitörü oubain ile inhibe edilmemekte ancak vanadatlar ve lantanitler gibi nonspesifik ajanlarla inhibe edilmektedir. Buna karşın, sarkoplazmik/endoplazmik retikulum membranında bulunan kalsiyumATP_{az}'ı inhibe eden tapsigargin ve siklopiyazonik aside karşı duyarsızdır. Enzimin C-ucu sitoplazmik kısım üzerinde kalmodulin için ve çeşitli protein kinazlar için bağlanma bölgeleri taşımaktadır. Kalmodulin-kalsiyum kompleksinin bu bölgeye bağlanması enzimi aktive etmektedir. Kalmodulin yokluğunda ise enzim inaktif konuma geçmektedir (50).

2.6.5. Sarkoplazmik / Endoplazmik Retikulum KalsiyumATP_{az} (SERCA)

Plazmalemmal kalsiyumATP_{az}'a yapıca benzemesine rağmen önemli farklılıklar gösterir. Esas işlevi plazmalemmal kalsiyumATP_{az} gibi hücre içi kalsiyum düzeylerini azaltmaktır. Bu işlevi hücre içinde artmış kalsiyumu aktif transport ile sarkoplazmik/endoplazmik retikulum içine taşıyarak yapar. Bu taşıyıcı

sistem de plazmalemmal kaliumATP_{az} gibi magnezyuma ve vanadatlar, lantanitler gibi non spesifik inhibitörlere duyarlıdır. Ancak plazmalemmal kalsiyumATP_{az}'dan farklı olarak tapsigargin ve siklopiyazonik asit gibi spesifik inhibitörleri de bulunmaktadır (58).

Kalsiyum, sarkoplazmik/endoplazmik retikulum lümeninde kalretikülin ve kalsequestrin gibi hidrofilik proteinlere bağlanmaktadır (50,51). Kalsiyumun bu proteinlere bağlanması serbest haldeki kalsiyum konsantrasyonunun düşmesine neden olmaktadır. Serbest haldeki kalsiyum konsantrasyonunun düşmesi kalsiyumun sitozolden transportu için gerekli enerjinin miktarını azaltmaktadır. Bu sayede sarkoplazmik/endoplazmik retikulum, kalsiyum deposu gibi çalışmakta ve luminal kalsiyum konsantrasyonu 10-15 mM gibi yüksek bir düzeye ulaşabilmektedir.

Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum kalsiyumATP_{az} pompasının, plazmalemmal kalsiyumATP_{az} pompasında olduğu gibi bir kalmodulin bağlayıcı bölgesi yoktur. Dolayısıyla bu enzimin aktivitesi plazmalemmal enzimin aktivitesi gibi doğrudan kalmodulin ile regüle edilmemektedir. Ancak sarkoplazmik/endoplazmik retikulum kalsiyumATP_{az} pompasının regülasyonunda 6 kDa büyüklüğünde bir protein olan fosfolamman rol oynamaktadır. Fosfolamman, muhtemelen sarkoplazmik/endoplazmik retikulum kalsiyum pompasında kendine özgü, regüle edici bir bölgeye bağlanarak enzimin inaktivasyonunu sağlamaktadır (50,51).

2.6.6. Sarkoplazmik / Endoplazmik Retikulumda Bulunan Kalsiyum Kanalları

Damar düz kas hücresi sarkoplazmik retikulumunda en azından iki çeşit kalsiyum kanalı bulunmaktadır. Bunlar İP₃'e ve ryanodine duyarlı kalsiyum kanallarıdır (50,51,53).

Herhangi bir stimulusa (nörotransmitterler, hormonlar vb) bağlı olarak plazma membranındaki inozitol lipidlerin hidrolizi sonucu İP₃ ve DAG oluşur. İP₃,

sarkoplazmik retikulumda kendi reseptörlerine bağlanarak sitoplazmaya kalsiyum serbestlenmesine neden olurken DAG ise protein kinaz C' yi aktive ederek kalsiyum duyarlılığını (sensitizasyonunu) artırır. İP3, temel olarak iki farklı mekanizma ile başlatılan yollar üzerinden meydana gelir. Bunlar, G-proteini aracılı ve tirozin kinaz reseptörü aracılı yollardır. Her iki makromolekülün aktivasyonu bir dizi olayı başlatarak İP3 oluşumuna neden olur. Heparin, magnezyum, dekavanadat, dekstran sülfat bu kanalın spesifik antagonistleridir (50-52).

Sarkoplazmik/endoplazmik retikulumda depolanmış kalsiyumun sitoplazmaya mobilizasyonunda rol oynayan diğer kanal ryanodine duyarlı kalsiyum kanalıdır (51,53). Bu kanal da İP3 kanalları ile aynı işlevi görür ve sitoplazmada kalsiyum konsantrasyonunu artırır. Bir bitki alkaloidi olan ryanodin, düşük konsantrasyonlarda (nanomolar) bu kanalı açarken, yüksek konsantrasyonlarda (mikromolar) kapatır. Kafein, heparin, ve adenin nükleotidleri bu kanalın diğer aktivatörleri iken magnezyum, rutenyum kırmızısı, imperatoksin ise antagonistleridir (51,52).

Kalsiyum iyonunun homeostazında rol oynayan bir başka mekanizmada mitokondri ve nükleus içine transporttur (50,51).

2.6.7. Mitokondri İçinde Kalsiyum Depolanması

Hücrelerde, özellikle patolojik düzeyde, yüksek kalsiyum konsantrasyonlarına ulaşıldığında mitokondri içine kalsiyum transportu olmaktadır. Bu durum sitozolik kalsiyum düzeyini düzenleyerek kalsiyum bağımlı proteazların (kalpainler) ve diğer kalsiyum aktive enzimlerin (fosfolipazlar endonükleazlar) aktive olmasını engellemektedir (50).

2.6.8. Nükleus İçinde Kalsiyum Depolanması

Hücre içinde nükleus, sarkoplazmik retikulum ile doğrudan bağlantılı bir konumda bulunmaktadır. Bu nedenle bu organel de hücre içi kalsiyum deposu şeklinde rol oynamakta ve kalsiyumun homeostazına katmaktadır. Ayrıca kalsiyum iyonu hücre siklusunun düzenlenmesi için gereklidir. Bir çalışmada, hepatosit nükleusunun kalsiyum deposu gibi çalıştığı ve İP3 gibi intraselüler ulakların bu depoları boşaltabildiği bildirilmiştir (50).

2.7. Kalsiyum Duyarlılaşması

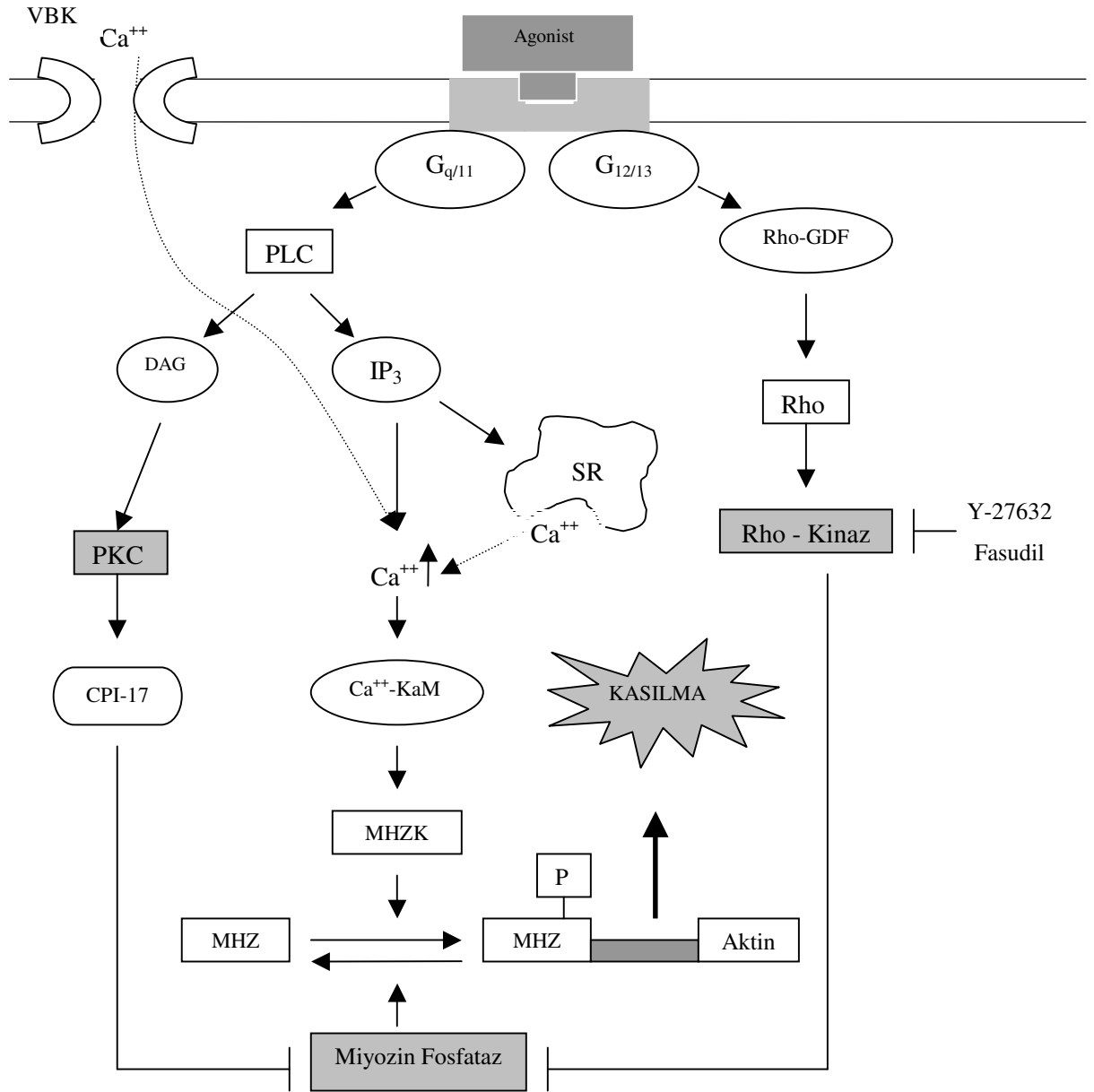
Düz veya çizgili kaslarda kasılma yanıtları, hücre içi kalsiyum düzeyindeki artışa bağlı olarak kalsiyum-kalmodulin (çizgili kaslarda troponin) kompleksi tarafından aktive edilen miyozin hafif zincir kinaz (MHZK) enziminin, miyozin hafif zincirini (MHZ) fosforile etmesiyle meydana gelmektedir (50). Bir mol kalmodulin 4 mol kalsiyum iyonu taşımaktadır. Kalsiyum iyonunun kalmodulin ile birleşmesi MHZK'yı aktive eder. Bu enzimin aktivasyonu bir mol ATP kullanarak MHZ'yi fosforile eder ve fosforile-miyozin oluşur. Fosforile-miyozin, aktin-aktive miyozin ATP_{az} enziminin aktivitesini artırır ve damar düz kasının kasılmasına neden olur. Hücre içi kalsiyum düzeylerinin düşmesi ise, kalmodulinin MHZK enziminden ayrılmasına ve bu enzimin inaktivasyona neden olur. İnaktive MHZK enzimi miyozin hafif zincir fosfataz (miyozin-fosfataz) enziminin aktivasyonuna neden olur. Bu enzim fosforile haldeki miyozini defosforile eder. Defosforile-miyozin aktin-aktive miyozin ATP_{az} enzimini inaktive eder ve sonucunda damar düz kasının gevşemesine neden olur (50,59).

Noradrenalin, endotelin-1, prostaglandin F_{2α}, tromboksan A₂ analogu U46619 vb çeşitli agonistler, G-proteini ile kenetli reseptörlerini aktive ederek hücre içi depolardan kalsiyum serbestlenmesine neden olmaktadır (59-61). G-proteini ile kenetli reseptörlerin çeşitli agonistler aracılığıyla uyarılması sonucu PLC aktive olmakta ve fosfotidil inozitolden ikincil ulaklar olan İP3 ve DAG oluşmaktadır. İP3

hücre içi depolardan kalsiyum açığa çıkmasına neden olmakta, DAG ise PKC'yi aktive etmektedir. Çeşitli agonistlerin, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artışından bağımsız bir mekanizma aracılığı ile de güçlü kasılma oluşturduğu ortaya konmuş ve bu olay *kalsiyum duyarlılaşması* olarak adlandırılmıştır (59). Kalsiyum duyarlılaşmasında rol oynayan mekanizmalardan birisi PKC'nin diğeri ise rho-kinazın aktivasyonudur (62-64). Rho kinazın aktivasyonu, G-proteinleri ile kenetli reseptörlerin uyarılması sırasında oluşan rho-proteinlerinin etkisiyle gerçekleşmektedir. G-proteinlerinin uyarılması sırasında rho-proteinlerinin oluşumuna ise bir guanazin nükleotid değişim faktörünün (Rho-GDF) aracılık ettiği bildirilmektedir (60,61,63). Hem PKC hem de rho kinazın aktivasyonunun, miyozin-fosfataz enzimini inhibe ederek, damar düz kasının hücre içi kalsiyumdan bağımsız güçlü bir şekilde kasılmasına neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 1) (59). İnsan omental arterlerinde yapılan bir çalışmada, noradrenalin ve tromboksan A₂ analogu U46619'un PKC ve rho kinaz aracılı bir mekanizma ile kalsiyum duyarlılaşmasına neden olduğu bildirilmiştir (64). Domuz koroner arterleri (62), tavşan aortası (65) ve sıçan mezenterik arterlerinde (66) yapılan çeşitli çalışmalarda da U46619, prostaglandin F_{2α} ve noradrenalinin kalsiyum duyarlılaşması ile kasılma oluşturdukları gösterilmiştir. Y27632 ve fasudil rho kinaz enziminin spesifik inhibitörleri olup damar düz kasında gevšemeye neden olmaktadır (67,68). Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda reseptör agonistlerinin yanı sıra, reseptör aracısız bir mekanizma ile hücre membranında depolarizasyon yaparak kasılma oluşturan KCl'nin de kalsiyum duyarlılaşmasına neden olduğu bildirilmektedir (69-72). Örneğin, Yeni Zelanda beyaz tavşanlarının femoral ve renal arterlerinde yapılan bir çalışmada rho kinaz inhibitörü Y-27632'nin, KCl'nin ve L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalı agonisti Bay k 8644'ün oluşturduğu kasılmaları inhibe ederek gevšemeye neden olduğu gösterilmiştir (70). Tavşan torasik aortası ve renal arterlerinde yapılan diğer çalışmalarda da KCl'nin rho kinazı aktive ettiği bildirilmiştir (71,72) .

Kalsiyum duyarlılaşması sonucu düz kasın kasılmasının, hem fizyolojik hem de patofizyolojik koşullarda etkili olabileceği ve özellikle çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda rol oynayabileceği bildirilmektedir (67,68,73-75). Spontan hipertansif sıçanlarda yapılan bir çalışmada rho kinaz inhibitörü Y-27632'nin kan basıncını

düşürdüğü bununla birlikte normotansif sıçanların kan basınçlarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (74). Bazı ülkelerde (Çin) damar gevşetici ilaç olarak kullanıma girmiş rho kinaz inhibitörü fasudil ve hidroksifasudilin spontan hipertansif sıçanların karotid ve koroner arterlerinde fenilefrin ve serotonin ile oluşturulan kasılmaları normotansif sıçanlarla karşılaştırıldığında daha belirgin bir şekilde inhibe ettiği ve rho kinaz mRNA düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (74). Bu bulgular ışığında olan rho kinazın kan damarlarında upregüle olarak hipertansiyona neden olduğu öne sürülmektedir. Rho kinaz aracılı kalsiyum duyarlılaşmasının hipertansiyonunun yanı sıra anjina pektoriste de önemli olduğu ve rho kinaz inhibitörü fasudilin koroner arterler vazospazmında etkili olabileceği bildirilmiştir (67,74,75). Rho-kinaz inhibitörü fasudilin, koroner vazospazmı, miyokard iskemisini ve stabil anjina pektoriste egzersinin neden olduğu koroner vazokonstriksiyonu engellediği ortaya konmuştur (74). Kalsiyum duyarlılaşmasının sistemik hipertansiyonun, anjina pektorisin yanı sıra, serebral vazospazm, ateroskleroz, iskemi-reperfüzyon hasarı, pulmoner hipertansiyon, inme, kalp yetmezliği, astım ve çeşitli damar hastalıklarında da önemli rolünün olduğu, rho kinaz inhibitörlerinin bu hastalıkların tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir (67,68,73-75).



Şekil 1: Düz kasın kasılması ve kalsiyum duyarlılaşması ile ilişkili mekanizmaların şematik gösterimi.

VBK: Voltaj bağımlı kalsiyum kanalı

SR: Sarkoplazmik retikulum

PLC: Fosfolipaz C

Rho-GDF: Rho-guanozin nükleotid değişim faktörü

PKC: Protein kinaz C

İP₃: İnozitol-1,4,5-trifosfat

DAG: Diaçil gliserol

KaM: Kalmodulin

MHZ: Miyozin hafif zincir

MHZK: Miyozin hafif zincir kinaz

Y27632 ve fasudil: Rho kinaz inhibitörleri

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri

Çalışmamızda kullanılan gözler yetişkin erkek veya dişi sığırlardan alınmıştır. Gözler, Çoşkun Et ve Et Mamülleri A.Ş. ve Çekmece Et ve Et Ürünleri Ticaret ve Sanayi A.Ş. mezbahalarında yapılan veteriner kontrolünden geçmiş günlük sığır kesimlerinden temin edilmiştir.

3.2. Araç ve Gereçler

Dört kanallı myograf sistemi (DMT&ADInstruments; Model 610M)

%95 O₂ + %5 CO₂ içeren gaz karışım tüpü

Mikropipet (Eppendorf)

Cerrahi makas ve pens

40 µm çapında paslanmaz çelik tel

Vorteks (Velp Scientifica)

Petri kutusu

Diseksiyon mikroskobu (Zeiss 2000)

Soğuk ışık kaynağı (Schott)

Termostatlı su banyosu (Thermomiks)

Bilgisayar ve yazıcı

“ADInstruments Powerlab Chart5 for Windows” yazılım programı

“ADInstruments Powerlab DMT Normalization v1 for Windows” yazılım programı

3.3. Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları

Prostaglandin F_{2α} (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁵M olarak distile suda hazırlanmıştır.

Noradrenalin (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁴M olarak 0.001N HCl'de hazırlanmıştır. Stok çözeltisinin hazırlanması esnasında maddenin stabilizasyonunu sağlamak için 1 mg/ml oranında askorbik asit (Merck) ilave edilmiştir. Stok çözeltisi ve dilüsyonlar ışıktan korunmuştur.

Endotelin-1 (Peninsula Lab): Stok çözeltisi 10⁻⁷M olarak distile suda hazırlanmıştır.

9,11-Dideoksi-11α,9α-EpoxymetanoprostaglandinF_{2α} (U46619; Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁵M olarak distile suda hazırlanmıştır.

KCl (Merck): Stok çözeltisi 10⁻²M olarak distile suda hazırlanmıştır.

Asetilkolin HCl (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁴M olarak 0.001N HCl'de hazırlanmıştır.

Sodyum nitroprusiyat (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁴M olarak distile suda hazırlanmıştır. Stok çözeltisi ve dilüsyonlar ışıktan korunmuştur.

N^G-Nitro-L-Arginin (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁴M olarak distile suda hazırlanmıştır.

1H-[1,2,4]Oxadiazolo-[4,3-a]Quinoxalin-1-One (ODQ; Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁵M olarak DMSO'da hazırlanmıştır.

İndometazin (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁵M olarak %5 NaH₂CO₃'de hazırlanmıştır.

Glibenklamid (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁵M olarak DMSO'da hazırlanmıştır.

Tetraetilamaonyum (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻²M olarak distile suda hazırlanmıştır.

Apamin (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁶M olarak distile suda hazırlanmıştır.

Karibdotoksin (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁷M olarak %0.9 NaCl'de hazırlanmıştır.

Bay k 8644 (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁶M olarak %95 etanolde hazırlanmıştır.

Nifedipin (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁶M olarak DMSO'da hazırlanmıştır.

Siklopiyazonik asit (Sigma): Stok çözeltisi 10⁻⁵M olarak DMSO'da hazırlanmıştır.

CaCl₂ (Merck): Stok çözeltisi 10⁻²M olarak distile suda hazırlanmıştır.

(R)-(+)-trans-N-(4-pyridyl)-4-(1-aminoethyl)cyclohexanecarboxamide (Y27632; Tocris): Stok çözeltisi 10⁻⁴M olarak distile suda hazırlanmıştır.

Deneylerde kullanılan ilaç solüsyonları derin dondurucuda saklanan stoklardan Krebs Ringer-bikarbonat çözeltisinde dilüe edilerek hergün taze olarak hazırlanmıştır. Krebs Ringer-bikarbonat çözeltisinin içeriği mM cinsinden şu şekildedir: (NaCl: 135, KCl: 5, NaHCO₃: 20, Glukoz: 10, CaCl₂: 2.5, MgSO₄.7H₂O: 1.3, KH₂PO₄: 1.2, EDTA: 0.026). Deneylerde kullanılan **kalsiyumsuz Krebs Ringer-bikarbonat solüsyonu** ise normal Krebs Ringer-bikarbonat çözeltisinden 2.5 mM CaCl₂'ün çıkarılıp yerine 0.5mM EGTA ilave edilmesiyle hazırlanmıştır. Bazı kimyasal maddeler için çözücü olarak kullanılan DMSO, NaH₂CO₃, HCl, etanol ve NaCl'nin organ banyosundaki konsantrasyonları % 0,1 den düşüktür. Kullanılan çözücülerin izole sığır retinal arterleri üzerine direkt etkilerinin olmadığı belirlenmiştir.

3.4. İzole Sığır Retinal Arterinin Hazırlanması

Mezbahada yeni kesilmiş sığırlardan alınan gözler (n=88) soğuk ve kısmen buzlu Krebs Ringer-bikarbonat solüsyonu içeren bir taşıma kabı ile hızla laboratuvara taşınmıştır. Gözler, ekstraoküler kasları ve bağ dokularından temizlendikten sonra korneal bölgenin gerisinden kesilerek ikiye ayrılmıştır. Anterior kısım atıldıktan sonra, geriye kalan içi vitröz hümör dolu kısım bir petri kutusuna alınmıştır. Retinaya zarar vermeden vitröz hümör dikkatle akıtılarak retinadan uzaklaştırılmıştır. Petri kutusu içerisinde ve diseksiyon mikroskobu altında merkezi retinal arterden myografin doku tutucuları arasına girecek uzunlukta (uzunluk:1,62±0,01 mm, iç çap (Do); 232,37±2,04 µm; n=88) preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatların her biri 40 µm çapında iki paslanmaz çelik telden geçirilmek suretiyle myografların doku tutucuları arasına yerleştirilmiştir. Bu tellerden biri güç duyarlı (force displacement) transdüser, diğeri ise mikrometreye fikse edilmiştir. Doku tutucuların arasına yerleştirilen merkezi retinal arterin

etrafındaki retinal doku bir pens yardımıyla artere hasar vermeden dikkatle çekilerek uzaklaştırılmıştır.

3.5. Yöntem

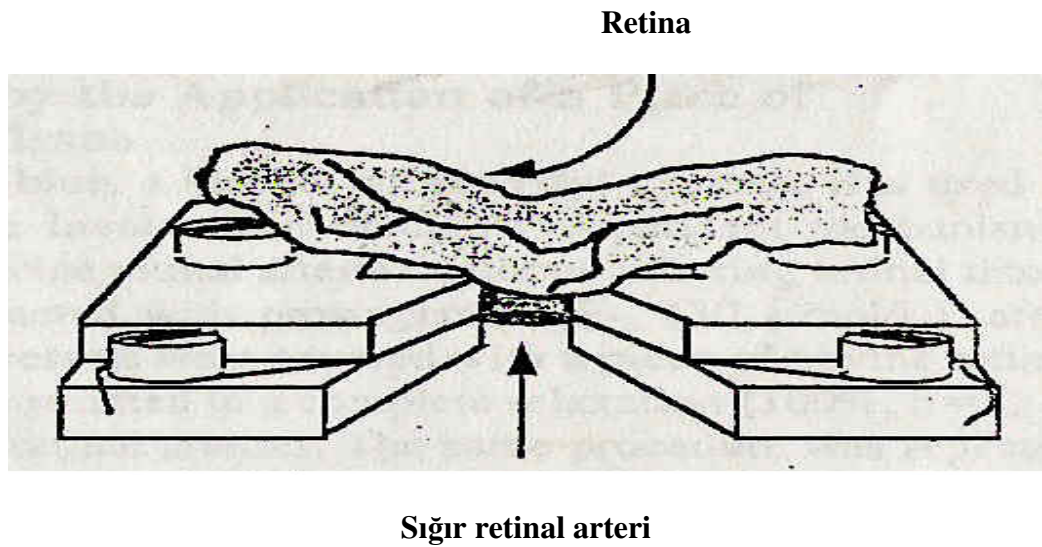
3.5.1. Retinal Arterin Standardizasyonu ve Reaktivitesinin Belirlenmesi

Krebs Ringer-bikarbonat solüsyonu içeren myograf sistemine yerleştirilen damarlar % 95 O₂ + % 5 CO₂ gaz karışımı ile havalandırılmış ve 37°C'de bir saat süreyle dengelenmeye bırakılmıştır. Dengelenme esnasında Krebs Ringer-bikarbonat solüsyonu her 10 dakikada bir değiştirilmiştir. Dengelenme süresinin ardından normalizasyon işlemine geçilmiştir. Normalizasyon işlemi esnasında, damarlara uygulanan gerim mikrometre yardımıyla kademeli olarak arttırılmış ve pasif damar duvar gerimi-iç çevre ilişkisi çalışılmıştır. Böylece normal fizyolojik koşullarda, tamamen gevşemiş damarın içinden geçen kanın damar duvarına yaptığı basınca (transmural basınç; 13.3 kPa [100mmHg]), karşılık gelen iç çevre (IC₁₀₀) belirlenmiş ve retinal arterlerin gerimi bir mikrometre yardımıyla bu iç çevrenin %90'ına (IC_i= 0.9xIC₁₀₀) karşılık gelen düzeye getirilmiştir. Bu sayede retinal arterlerde aktif güç gerimi için optimum şartlar sağlanmıştır. Retinal arterler bu ön gerimde 30 dakika süreyle tekrar dengelenmeye bırakılmış ve ardından 20'şer dakika ara ile iki defa potasyum klorür (KCl; 120mM) ve noradrenalin (NA; 10⁻⁴M) kombinasyonu (NAK) ile kastırılarak standardize edilmiştir. Retinal arterlerin spazmojen ajanlara karşı reaktivitesini belirlemek amacıyla, noradrenalin (NA; 10⁻⁸-10⁻⁴M), tromboksan A₂ analogu U46619 (10⁻⁹-10⁻⁶M), endotelin-1 (ET-1; 10⁻¹⁰-10⁻⁷M) ve prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}; 10⁻⁷-3x10⁻⁵M) gibi kastırıcı ajanlar damarlara kümülatif olarak uygulanmış ve konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edilmiştir. Retinal arterlerin endotel fonksiyonu ve düz kas gevşeme kapasitelerini belirlemek amacıyla prostaglandin F_{2α} ile prekontrakte edilmiş damarlara kümülatif olarak sırasıyla, asetilkolin (Ach; 10⁻⁸-10⁻⁴M) ve sodyum nitroprusiyat (SNP; 10⁻⁸-10⁻⁴M) uygulanmıştır.

3.5.2. Retinanın Etkisinin İncelenmesi

Retinaya bağlı yanıtlar, çeşitli spazmojen ajanlarla (NA, U46619, PGF_{2α}, ET-1 ve KCl) prekontrakte edilen retinal arterler üzerine bir parça retina dokusu (127.73±1.18 mm²: n=68) yerleştirilmek suretiyle incelenmiştir (Şekil 2). Spazmojen ajanlarla oluşturulan prekontraksiyon düzeylerinin benzer olmasına dikkat edilmiştir. Spazmojen ajanların prekontraksiyon için kullanılan konsantrasyonları kümülatif konsantrasyon–yanıt eğrilerinden belirlenmiştir.

Prekontrakte edilen retinal arterin üzerine bir parça retina dokusunun yerleştirilmesi retinal arterde gevşeme yanıtına neden olmuştur. Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtında, mekanik bir etkinin rolünün olup olmadığı, prekontrakte edilen retinal arterler üzerine retina ile benzer büyüklükte koroid dokusu (n= 35) yerleştirilerek test edilmiştir.



Şekil 2: Sığır retinal arteri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesinin şematik gösterimi (kaynak:26).

3.5.3. Retinaya Bağlı Gevşetici Etkinin Mekanizmasının İncelenmesi

Retinal arterlerde retinaya bağlı gevşeme yanıtının ortaya konulmasının ardından gevşetici etkinin mekanizmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. İlk olarak elde edilen retina kaynaklı gevşetici etkinin endotel kaynaklı gevşetici faktörler olan NO ve siklooksijenaz yolağının vazodilatör ürünü, prostasiklin (PGI_2) ile ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen retinal arterlerde retina dokusunun yerleştirilmesine bağlı gevşeme yanıtı (kontrol) elde edilmiştir. Ardından, hem retina dokusu hem de retinal arterler, NO sentezine aracılık eden NO sentaz (NOS) enziminin spesifik inhibitörü L-NOARG ($10^{-4}M$, 30 dk), NO'nun etkisine aracılık eden guanilat siklaz enziminin spesifik inhibitörü ODQ ($10^{-4}M$; 30 dk.) veya PGI_2 'nin sentezine aracılık eden siklooksijenaz enziminin spesifik inhibitörü indometazin ($10^{-5}M$; 30 dk.) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından damarlar prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile tekrar prekontrakte edilmiş ve retinaya bağlı gevşeme yanıtının inhibitörler varlığında değişip değişmediği incelenmiştir. Bu deneylere paralel olarak, retina kaynaklı gevşetici etkinin endotel tabakası ile ilişkisi, bir saç teli yardımıyla mekanik olarak deendotelize edilen retinal arterlerde de araştırılmıştır.

İkincil olarak retinaya bağlı görülen gevşetici etkide potasyum kanallarının rolü incelenmiştir. K^+_{ATP} ve $K^+_{Ca^{++}}$ kanallarının açılmasının damar düz kasında hiperpolarizasyonuna neden olarak gevşeme oluşturduğu bilinmektedir. Retinaya bağlı gevşeme yanıtında K^+_{ATP} ve $K^+_{Ca^{++}}$ kanallarının rolünün olup olmadığı bu kanalların spesifik inhibitörlerinin varlığında yapılan deneylerle değerlendirilmiştir. Retinal arterler ve retina; K^+_{ATP} kanalı inhibitörü glibenklamid (Glib. $10^{-5}M$, 30dk.), nonspesifik $K^+_{Ca^{++}}$ kanalı inhibitörü tetraetilamonyum (TEA $10^{-2}M$; 30 dk.), $BK^+_{Ca^{++}}$ inhibitörü karibdotoksin (CTX $10^{-7}M$, 30 dk.), $SK^+_{Ca^{++}}$ inhibitörü apamin ($3 \times 10^{-7}M$, 30 dk.) veya karibdotoksin ile apaminin kombinasyonu ile inkübe edilerek retinal yanıtın bu inhibitörler varlığında değişip değişmediği araştırılmıştır.

Kalsiyumun iyonunun hücre içindeki konsantrasyon düzeyi düz kasın tonüsünün belirlenmesi açısından önemlidir. Temel olarak damar düz kas hücresi

içinde kalsiyum konsantrasyonunun artması kasılma yanıtına, azalması ise gevşeme yanıtına neden olmaktadır. Retina kaynaklı gevşetici etkide hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu düzenleyen mekanizmalardan biri olan ve hücre içine kalsiyum girişine aracılık eden L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının rolü araştırılmıştır. Bu amaçla önce sığır retinal arterlerinin bu kanalların spesifik agonisti olan Bay k 8644'e karşı reaktivitesi incelenmiş ve konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edilmiştir. Daha sonra depolarize (KCl 20mM) retinal arterlerde Bay k 8644 (10^{-6} M) ile prekontraksiyon oluşturulmuş ve üzerine bir parça retina dokusu yerleştirilerek retinaya bağlı yanıtlar incelenmiştir. Ayrıca bir grup deneyde, retinal arterler ve retina dokusu bu kanalların spesifik antagonisti olan nifedipin (Nif. 10^{-6} M, 30 dk.) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda retinal arterler $PGF_{2\alpha}$ ile tekrar prekontrakte edilmiş ve retinaya bağlı gevşeme yanıtları incelenmiştir.

Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu düzenleyen bir diğer mekanizma ise SERCA pompasıdır. Bu pompa kalsiyumun sarkoplazmik/ endoplazmik retikulumda depolanmasına aracılık etmektedir. Retinal gevşetici etkide SERCA'nın olası rolü bu pompanın spesifik inhibitörü siklopiyazonik asit (CPA; 10^{-6} M; 30 dk.) ile inkübe edilmiş retinal arterlerde ve retina dokusunda araştırılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda retinal arterler $PGF_{2\alpha}$ ile tekrar prekontrakte edilmiş ve retinaya bağlı gevşeme yanıtları incelenmiştir.

Retina kaynaklı gevşetici etkide, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu değiştiren mekanizmaların yanısıra, düz kasın kalsiyuma karşı duyarlılığındaki bir değişikliğin de rol oynayabileceği düşünülmüştür. Bunu incelemek amacıyla kalsiyumsuz ortamda (kalsiyumsuz Krebs Ringer-bikarbonat solüsyonu) 30 dakika süreyle dengelenen ve sonrasında 20 mM KCl ile depolarize edilen retinal arterlerde kalsiyum klorürün ($CaCl_2$; 10^{-7} - 10^{-2} M) kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edilmiştir. Paralel olarak, üzerine retina dokusu yerleştirilen ve 20 dakika süreyle retina ile bekletilen retinal arterlerde de $CaCl_2$ 'ün konsantrasyon-yanıt eğrisi çalışılmıştır. Daha sonra $CaCl_2$ 'ün üzerine retina dokusu yerleştirilmiş ve yerleştirilmemiş retinal arterlerdeki konsantrasyon-yanıt profilleri karşılaştırılmıştır.

Ayrıca, retinal arterde kalsiyumsuz ortamda CaCl_2 ile oluşturulan kontraksiyonda retinanın gevşetici etkisi de incelenmiştir.

Retina kaynaklı gevşetici etkide ekstraselüler kalsiyumun önemi de araştırılmış ve gevşetici etkinin ekstraselüler kalsiyumun ortamdaki uzaklaştırılmasıyla değişip değişmediği incelenmiştir. Bu amaçla, kalsiyumsuz ortamda (kalsiyumsuz Krebs ringer bikarbonat solüsyonu) 30 dakika süreyle dengelenen retinal arterlerde $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontraksiyon oluşturulmuş ve retinanın gevşetici etkisi incelenmiştir.

Çalışmamızda, retina kaynaklı gevşetici etkinin kalsiyum duyarlılaşması ile ilgili mekanizmalardan birisi olan Rho-kinaz yolağı ile ilişkisi de araştırılmıştır. Rho-kinazın aktivasyonu myozin fosfatazı inhibe ederek miyozinin fosforilasyonunu arttırmakta ve böylece düz kasın, hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artıştan bağımsız bir mekanizma ile kasılmasına neden olmaktadır. Rho-kinazın inhibisyonunun ise gevşetici etkiye aracılık ettiği bilinmektedir. Retina kaynaklı gevşetici etkinin rho-kinaz yolağı ile ilişkili olabileceği düşünülmüş ve bu nedenle çalışmamızda Rho kinaz inhibitörü Y27632'nin sığır retinal arterlerindeki etkisinin, retina kaynaklı gevşetici etki ile karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, $\text{PGF}_{2\alpha}$ veya KCl ile prekontrakte edilen retinal arterler üzerine rho kinaz inhibitörü Y27632 (10^{-9} - 10^{-5}M) kümülatif olarak uygulanmış ve Y27632'nin konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edilmiştir.

Bazı inhibitörler ile inkübasyonun ya da deendotelizasyonun retinal arterlerde $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile oluşturulan prekontraksiyon düzeylerini düşürdüğü gözlenmiştir. Bu nedenle bir grup deneyde retinal arterlerde $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile oluşturulan prekontraksiyonun benzer düzeyde değiştirilmesinin retinaya bağlı gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi incelenmiştir.

3.6. Normalizasyon

Damar düz kas tonüsü çok sayıda gevşetici veya kastırıcı özellikte uyarılar tarafından düzenlenmekte ve böylece kan akışı regüle edilmektedir. Damar düz kas tonüsüne etki eden mekanizmalardan birisi de damarların *myojenik* yanıtlarıdır (76-78). Myojenik yanıt, çeşitli uyarılar karşısında damarın kasılması sonucu damar içi (intralüminal) basınçtaki artış olarak karakterize edilmektedir. Damarların çeşitli uyarılarla kasılması nedeniyle damarın çapı ve çevresi değişmekte ve bu myojenik yanıtı etkilemektedir (79). Bu prensipten hareketle, in vitro çalışmalarda damarlara uygulanan gerimin, damarın çeşitli agonistlere karşı cevaplılıklarını değiştireceği düşünülmüş ve dolayısıyla damarlara optimum yanıt vereceği uygun gerimin uygulanmasının gerekliliği ortaya konmuştur (79-81). Optimum damar yanıtlarının alınacağı uygun gerim, damara tamamen gevşediği (pasif gerim) durumda küçük basamaklarda gerim artışı uygulanarak hesaplanmakta (79) ve bu işlem *normalizasyon* olarak adlandırılmaktadır.

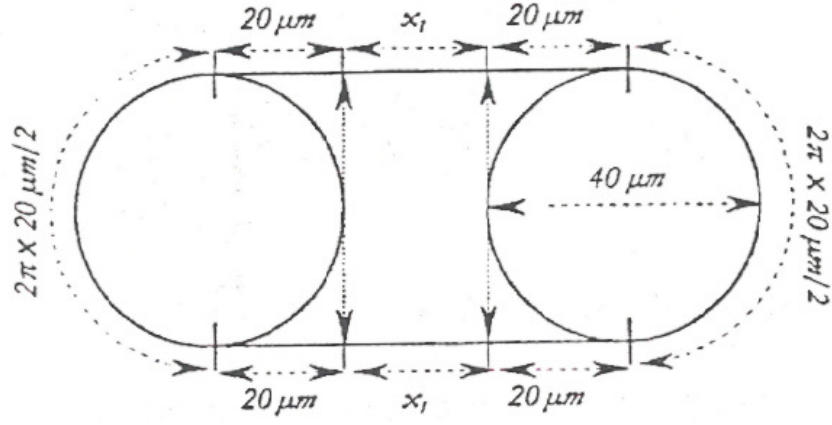
Damarlara uygulanan basınç (efektif basınç; P_i), Laplace denklemi uyarınca damar duvar geriminin (T_i), damarın iç çevresine (IC_i) bölünmesiyle ifade edilmektedir (79,81).

$$\begin{aligned} P_i &= T_i / [IC_i / (2\pi)] \\ &= 2\pi T_i / IC_i \end{aligned}$$

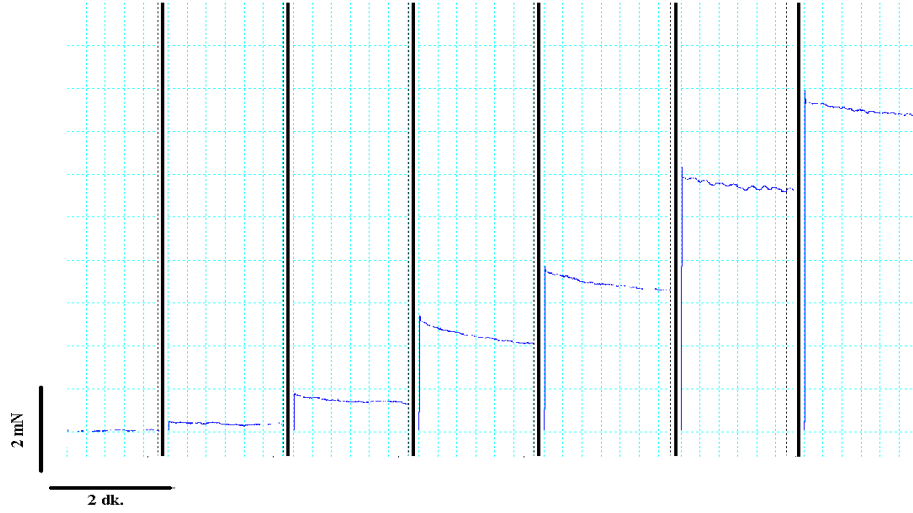
Damarın iç çevresi (IC_i) ise kullanılan tellerin çapları ile teller arası boşluğun (x_i) toplamıdır. Çalışmamızda kullanılan tellerin çapları $40 \mu\text{m}$ olduğuna göre damarın iç çevresi;

$$\begin{aligned} IC_i &= 2 (2\pi \cdot 20 \mu\text{m} / 2) + 4 \cdot 20 \mu\text{m} + 2 x_i \\ &= \pi \cdot 40 \mu\text{m} + 2 \cdot 40 \mu\text{m} + 2 x_i \\ &= (\pi + 2) 40 \mu\text{m} + 2 x_i \quad \pi=3.14 \text{ olarak alınırsa} \\ &= 205.7 \mu\text{m} + 2 x_i \text{ olarak hesaplanır (Şekil 3 A).} \end{aligned}$$

A)



B)



Şekil 3: İç çevrenin hesaplanmasının şematik gösterimi (A) ve normalizasyon işlemi (B) (sığır retinal arteri, orijinal trase).

Normalizasyon işlemi bilgisayarda “DMT Normalization v1 for windows” yazılım programı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Myograf sistemine yerleştirilen damarlara küçük basamaklarda gerim artışı uygulanarak yapılan normalizasyon işleminde şu değerlerin bilinmesi gerekmektedir;

X_0 : Başlangıçta (damarın içinden geçen tellerin birbirlerine değmediği, aralarında boşluğun ve damara uygulanan kuvvetin olmadığı konum) myografin mikrometresinde okunan değer

Y_0 : Başlangıçta (damarın içinden geçen tellerin birbirlerine değmediği, aralarında boşluğun ve damara uygulanan kuvvetin olmadığı konum) myografda okunan damar duvar gerimi (mN)

X_i : Damara gerim uygulandıktan sonra mikrometre üzerinde okunan değer

Y_i : Damarlara uygulanan gerim (mN)

delta: mm/oküler birim (diseksiyon mikroskopunda belirli bir büyütme altında 1 mm' lik uzunluğa karşılık gelen oküler birim)

a_1 : Damar parçasının uzak ucunun okülerde okunan değeri

a_2 : Damar parçasının yakın ucunun okülerde okunan değeri

Normalizasyon işleminde her bir gerim artışından sonra "i" noktasındaki damar duvar gerimi (T_i : mN/mm) şu şekilde hesaplanmaktadır;

$$T_i = (Y_i - Y_0) / 2 \cdot [\text{delta} (a_1 - a_2)]$$

Bu denklemde; $[\text{delta} \cdot (a_1 - a_2)]$ damar boyunu (l) vermektedir. Ancak damara uygulanan gerim damarın tellerle temas eden iki yüzü arasında paylaşılmaktadır. Bu nedenle damarın boyu ölçülen damar boyunun 2 katına eşittir. Normalizasyon işleminde her bir gerim artışından sonra "i" noktasındaki iç çevre (IC_i : μM) ise;

$$IC_i = IC_0 + 2(X_i - X_0) \quad \text{denklemleriyle hesaplanır.}$$

IC_0 : Damarın içinden geçen tellerin birbirlerine değmediği, aralarında boşluğun ve damara uygulanan kuvvetin olmadığı konum.

Telin çapı 40 μm olduğuna göre IC_0 , 205.7'ye eşittir. İç çevre ;

$$IC_i = 205.7 + 2(X_i - X_0)$$

Damarlara uygulanan her bir basamak gerim için “ T_i ” ve “ IC_i ” değerleri ayrı ayrı hesaplanarak eksponansiyel bir eğri elde edilir. Damarlara basamaklar halinde giderek artan düzeyde gerim verme işlemine, hedeflenen damar içi basınca ($P_i=100$ mmHg; 13.3 kPa) ulaşılan kadar devam edilir (Şekil 3B).

$$P_i = 2\pi T_i / IC_i$$

$$100 \text{ mmHg} = 2\pi \cdot T_{100} / IC_{100}$$

T_{100} : Laplace denkleminde hedeflenen efektif basınçta (100 mmHg =13.kPa) karşılık gelen damar duvar gerimi (mN/mm).

IC_{100} : Laplace denkleminde hedeflenen efektif basınçta (100 mmHg =13.kPa) karşılık gelen iç çevre (μm).

IC_{100} 'ün bulunmasının ardından normalize iç çevre (IC_i) hesaplanır. Normalize iç çevre IC_{100} 'ün “k” gibi bir faktörle çarpılmasıyla elde edilir. Bu faktör sıçan mezenterik arteri, sığır retinal arteri vb damarlar için 0.9 olarak belirlenmiş olup farklı damarlar için optimum cevaplılığın elde edildiği değer olarak farklılık gösterebilmektedir.

$$IC_i = k \cdot IC_{100} \quad \text{sığır retinal arterleri için } IC_i = 0.9 \cdot IC_{100}$$

Damarın iç çapı (μm) ise normalize olduğu andaki iç çevrenin π sayısına bölünmesiyle hesaplanır;

$$d_i = IC_i / \pi$$

Bu değerlerin hesaplanmasının ardından mikrometre hesaplanan X_i değerine getirilerek normalizasyon işlemi tamamlanır.

$$X_i = X_o + [(IC_i - IC_o) / 2]$$

3.7. İstatistiksel Analiz

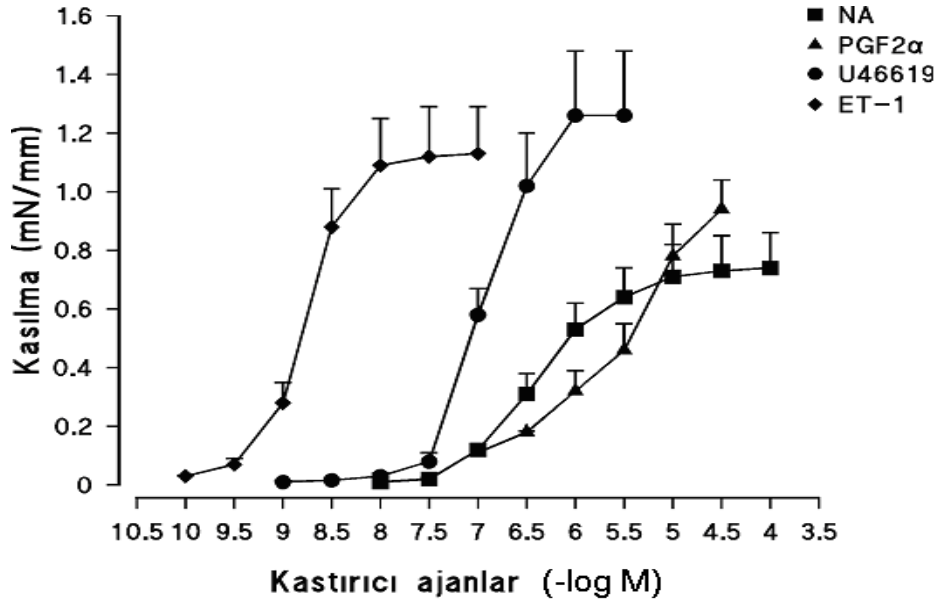
Veriler “ortalama \pm standart hata” şeklinde gösterilmiştir. Deney gruplarında belirtilen “n” çalışılan sığır retinal arterlerinin sayısını göstermektedir. Kastırıcı ajanların kasılma yanıtları “mN/mm”, prekontrakte edilen damarlarda retina ve koroid dokusuna bağlı olarak görülen gevşeme veya kasılma yönündeki yanıtlar ise prekontraksiyona göre “%” cinsinden verilmiştir. E_{maks} ; kastırıcı ajanlarla elde edilen maksimum kasılma yanıtları ile retina ve koroid dokusuna karşı oluşan maksimum gevşeme veya kasılma yanıtlarını, pD_2 ; maksimum yanıtın (kasılma veya gevşeme) %50’sini oluşturan konsantrasyonun, yani EC_{50} ’nin (-) logaritmasını göstermektedir. İstatistiksel analizde “Student’s t-testi (iki eş arasındaki farkın anlamlılık testi ve gruplar arası farkın anlamlılık testi) ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmış ve “p” değeri 0,05 den küçük olan karşılaştırmalar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. İzole Sığır Retinal Arterlerinin Reaktivesinin İncelenmesi

4.1.1. Kastırıcı Ajanların İzole Sığır Retinal Arterleri Üzerine Etkileri

Noradrenalin (NA; 10^{-8} - 10^{-4} M), tromboksan A_2 analogu U46619 (10^{-9} - 10^{-6} M), endotelin-1 (ET-1; 10^{-10} - 10^{-7} M) ve prostaglandin $F_{2\alpha}$ 'nın ($PGF_{2\alpha}$; 10^{-7} - 3×10^{-5} M) artan konsantrasyonlarda kümülatif olarak uygulanması izole sığır retinal arterlerinde konsantrasyon-bağımlı kasılma yanıtına neden olmuştur (Şekil 4). Retinal arterlerde ET-1 ve U4619 ile elde edilen maksimum kasılma yanıtının NA ve $PGF_{2\alpha}$ ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği belirlenmiştir. Spazmojen ajanların EC_{50} değerleri karşılaştırıldığında ise retinal arterlerin ET-1'e karşı diğer ajanlarla göre daha yüksek duyarlılık gösterdiği görülmektedir. Ayrıca retinal arterler U46619'a karşı $PGF_{2\alpha}$ 'dan daha duyarlı bulunmuştur. $PGF_{2\alpha}$ ve NA'nın EC_{50} değerleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Şekil 4, Tablo 1).



Şekil 4: Çeşitli spazmojen ajanların izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri.

Tablo 1: Çeşitli spazmojen ajanların izole sığır retinal arterlerinde elde edilen E_{maks} ve pD_2 değerleri.

	E_{maks}		n
	(mN/mm)	pD_2	
PGF_{2α}	0.94±0.10	5.53±0.35***#	8
NA	0.74±0.12	6.34±0.36**	11
ET-1	1.13±0.16	8.76±0.047	6
U 46619	1.26±0.22	6.99±0.18*	8

pD_2 : Maksimum kasılma yanıtının %50'sini oluşturan konsantrasyonun (-) logaritma değeri (- log EC_{50}).

E_{maks} : Maksimum kasılma yanıtı.

n: İzole sığır retinal arteri sayısı.

*** $p < 0.01$ ve ** $p < 0.001$:** ET-1 ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

$p < 0.05$: U46619 ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.2. İzole Sığır Retinal Arterlerinin Endotel ve Düz Kas Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi

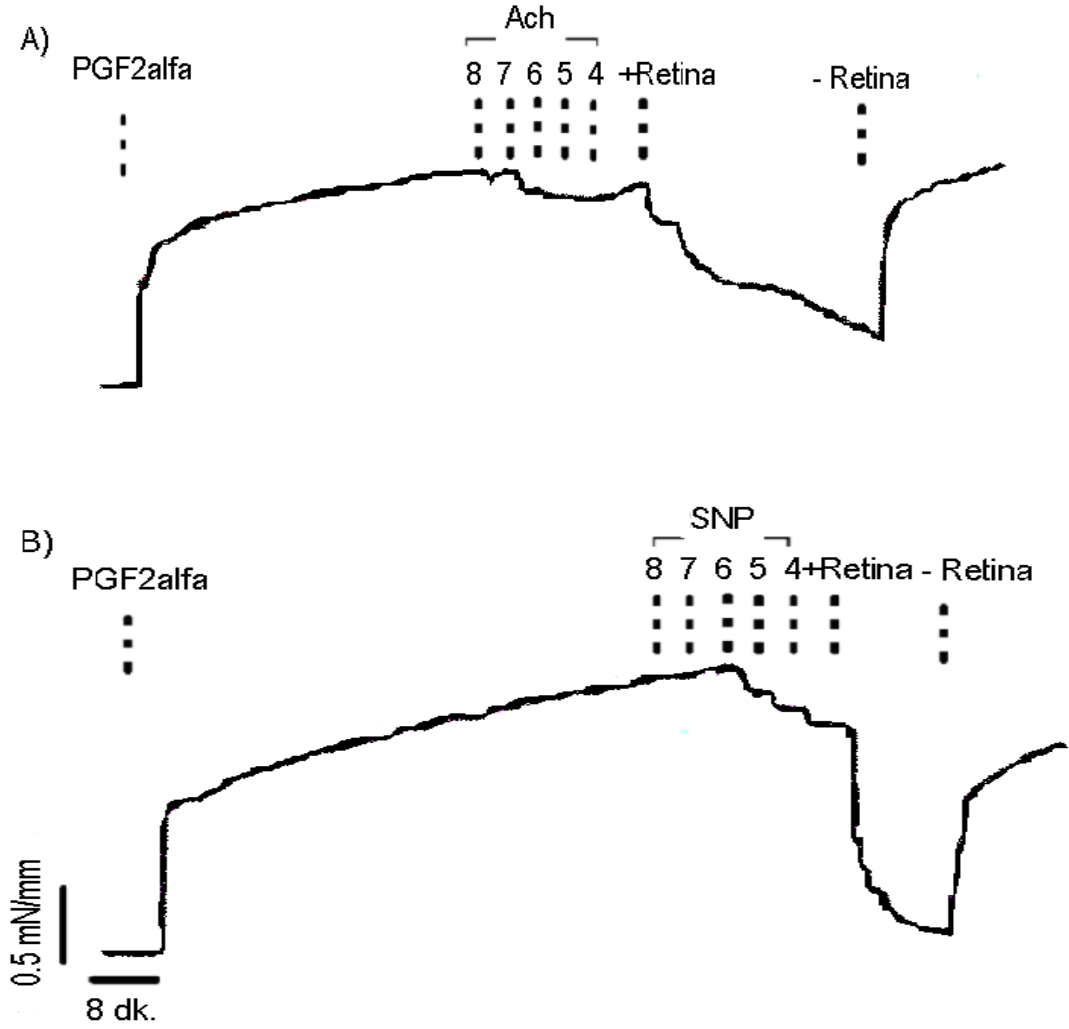
4.2.1. Asetilkolinin Etkisi

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak asetilkolin (Ach; 10^{-8} - $10^{-4}M$) uygulanması konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları oluşturmuştur ($E_{maks} = \%35.24 \pm 6.59$ n=12, Şekil 5 ve 6).

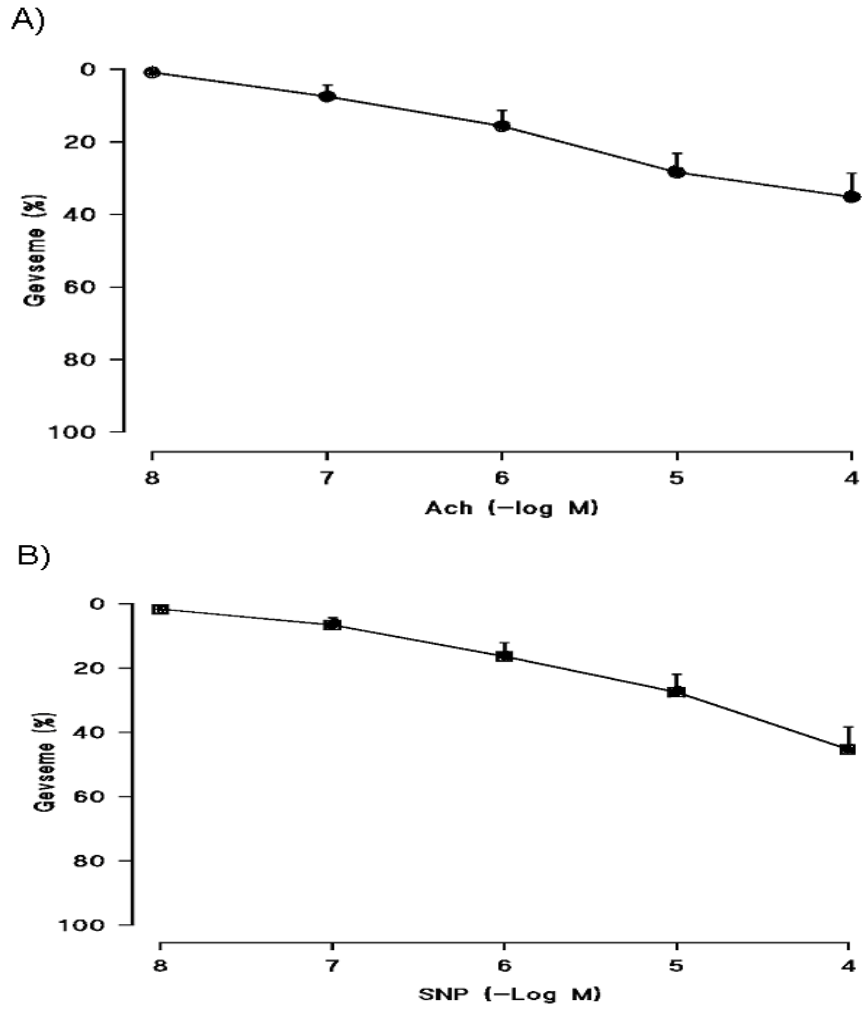
4.2.2. Sodyum Nitroprusiyatın Etkisi

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak sodyum nitroprusiyat (SNP; 10^{-8} - $10^{-4}M$) uygulanması konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları oluşturmuştur ($E_{maks} = \%45.32 \pm 6.94$ n=13, Şekil 5 ve 6).

Ach ve SNP sığır retinal arterlerinde zayıf bir gevşeme oluşturmuşlardır. Ach ve SNP' nin sığır retinal arterlerinde oluşturduğu maksimum gevşeme yanıtları birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Ach ve SNP ile kısmen gevşemiş olan retinal arterlerin üzerine bir parça retina dokusunun yerleştirilmesi ise retinal arterlerin tamamen gevşemesine neden olmuştur (Şekil 5).



Şekil 5: Prostaglandin F_{2α} (3x10⁻⁵M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak (A) asetilkolin (Ach; 10⁻⁸-10⁻⁴M) ve (B) sodyum nitroprusiyat (SNP;10⁻⁸-10⁻⁴M) uygulanması ve ardından damarlar üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi ile elde edilen gevşeme yanıtları (orijinal trase).



Şekil 6: Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak (A) asetilkolin (ACh; 10^{-8} - $10^{-4} M$) ve (B) sodyum nitroprusiyat (SNP; 10^{-8} - $10^{-4} M$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri.

4.3. Retinanın Etkisinin İncelenmesi

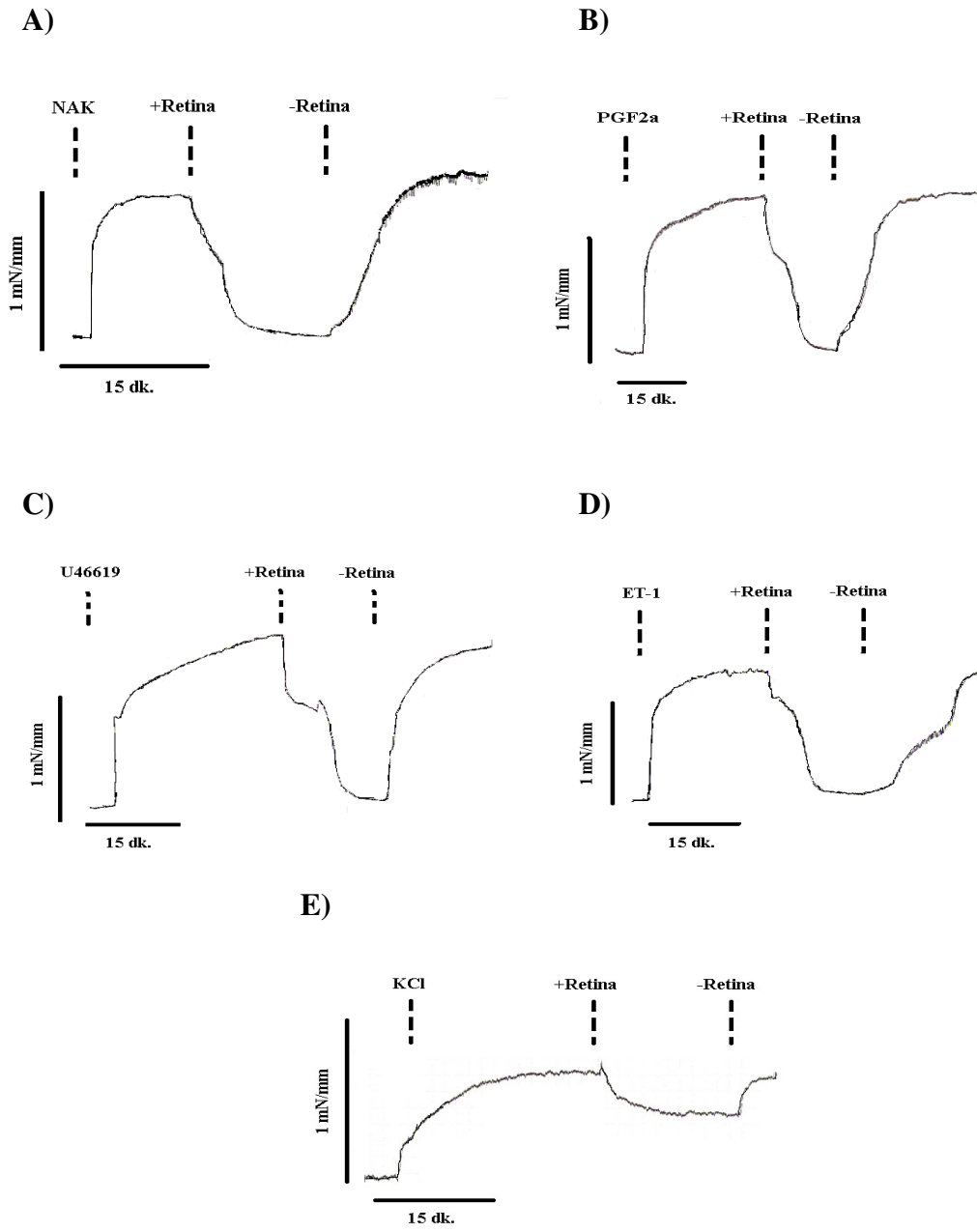
4.3.1. Çeşitli Spazmojen Ajanlar ile Prekontrakte Edilmiş Retinal Arterler Üzerine Retina Dokusunun Yerleştirilmesi

Retina dokusunun sığır retinal arterleri üzerine etkisi NA, U46619, ET-1 ve $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen preparatlarda incelenmiştir. Bu kastırıcı ajanların sığır retinal arterlerinde elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinden yararlanılarak benzer düzeyde kasılma oluşturan konsantrasyonları tespit edilmiştir. Kastırıcı ajanlar belirlenen konsantrasyonlarda uygulanmış ve kasılma düzgün bir platoya ulaştığında retina dokusu retinal arterin üzerine yerleştirilmiştir. Noradrenalin ile oluşturulan prekontraksiyon stabil kalmadığı için KCl (30mM) ile kombine halde uygulanmıştır. Ayrıca, bu kastırıcı ajanlardan farklı olarak reseptör aracısız bir mekanizma ile kasılma oluşturan KCl prekontraksiyonu karşısında da retina dokusunun etkisi incelenmiştir. KCl, retinal arterlerde diğer spazmojen ajanlara göre daha zayıf bir kastırıcı etkiye neden olmuştur. KCl'nin düşük konsantrasyonları retinal arterlerde güçlü bir kasılma yanıtı oluşturmamıştır. Bu nedenle KCl yüksek konsantrasyonda (120mM) uygulanmış ve böylece diğer spazmojen ajanlar ile benzer düzeyde kasılma elde edilmiştir.

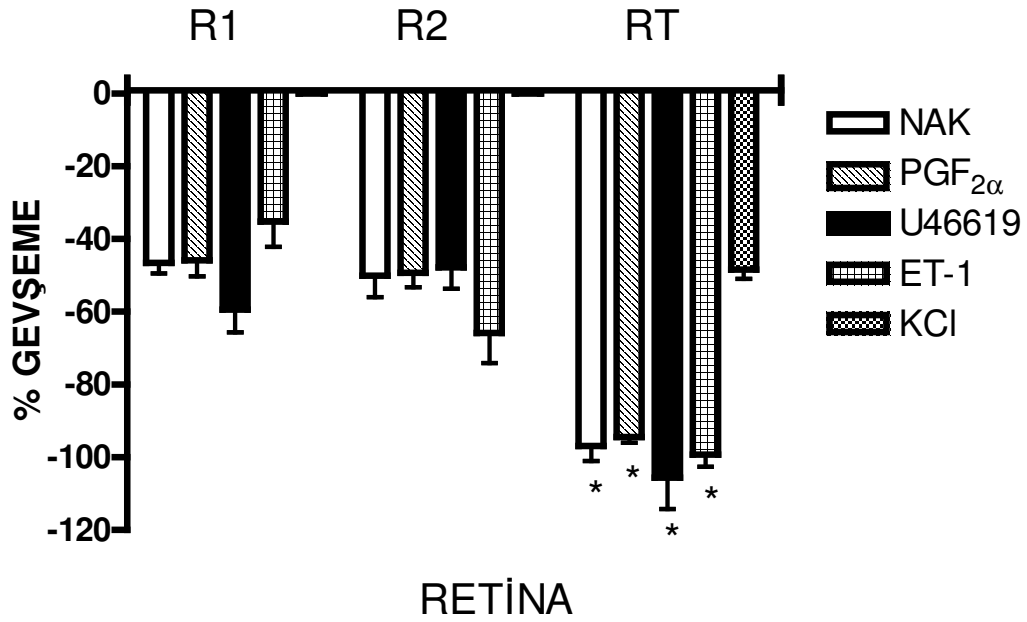
Noradrenalin ($10^{-4}M$) + potasyum klorür (30mM) kombinasyonu (NAK), tromboksan A_2 analogu (U46619; $3 \times 10^{-7}M$), endotelin-1 (ET-1; $10^{-8}M$) veya prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$; $3 \times 10^{-5}M$) ile benzer kasılma düzeyinde prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi akut başlayan ve genellikle bifazik karakter gösteren tam bir gevşeme yanıtına neden olmuştur (Şekil 7 ve 8). Farklı spazmojen ajanlar karşısında retina ile elde edilen bifazik gevşeme yanıtlarının ilk faz, ikinci faz ve maksimum düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$; Tablo 2). Bununla birlikte, NAK ile yapılan 7, $PGF_{2\alpha}$ ile yapılan 12 ve U46619 ile yapılan 6 deneyden birinde, ayrıca ET-1 ile yapılan 7 deneyden iki tanesinde retinaya bağlı gevşeme yanıtı bifazik karakter göstermemiş ve tek fazda maksimum gevşeme yanıtını oluşturmuştur. Öte yandan, retina dokusunun KCl (120mM) ile prekontrakte edilen

retinal arterlerin üzerine yerleştirilmesi ise akut başlayan ancak bifazik karakter göstermeyen ve daha düşük düzeyde bir gevşeme yanıtına neden olmuştur (şekil 7 ve 8; Tablo 2). KCl ile prekontrakte edilen dokularda retina her zaman tek fazlı gevşeme yanıtı oluşturmuştur.

Retinaya bağlı gevşeme yanıtı, retina dokusu retinal arter üzerinden kaldırıldığında tamamen geriye dönmektedir (şekil 7). Çalışılan retinal arterlerin uzunluk ve i çap değerleri ile spazmojen ajanlar ile oluşturulan prekontraksiyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Tablo 3).



Şekil 7: (A) NAK [10^{-4} M + KCl (30mM)], (B) PGF_{2α} (3×10^{-5} M), (C) U46619 (3×10^{-7} M), (D) ET-1 (10^{-8} M), (E) KCl (120mM) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi ile elde edilen gevşeme yanıtları (orijinal trase).



Şekil 8: Çeşitli spazmojen ajanlarla benzer düzeyde prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerinde retina dokusunun yerleştirilmesi ile elde edilen gevşeme yanıtları.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

*** $p < 0.001$:** KCl ile prekontrakte edilen dokularda elde edilen maksimum gevşeme yanıtı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Tablo 2: Çeşitli spazmojen ajanlarla benzer düzeyde prekontrakte edilen izole sığır retinal arterler üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi ile elde edilen gevşeme yanıtları.

	R1 (%)	R2 (%)	n	RT (%)	n
NAK	46.60±2.88	50.07±5.85	6	96.83±4.24*	7
PGF_{2α}	45.84±4.38	49.24±4.02	11	94.45±1.57*	12
U46619	59.39±6.22	47.22±5.92	5	105.7±8.57*	6
ET-1	35.15±6.96	65.86±8.24	5	99.23±3.38*	7
KCl	-	-	-	48.30±2.70	8

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

n: Retinal arter sayısı.

***p<0.001:** KCl ile prekontrakte edilen dokularda elde edilen maksimum gevşeme yanıtı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Tablo 3: İzole sığır retinal arterlerinin uzunlukları, iç çapları ve çeşitli spazmojen ajanlarla oluşturulan prekontraksiyon düzeyleri.

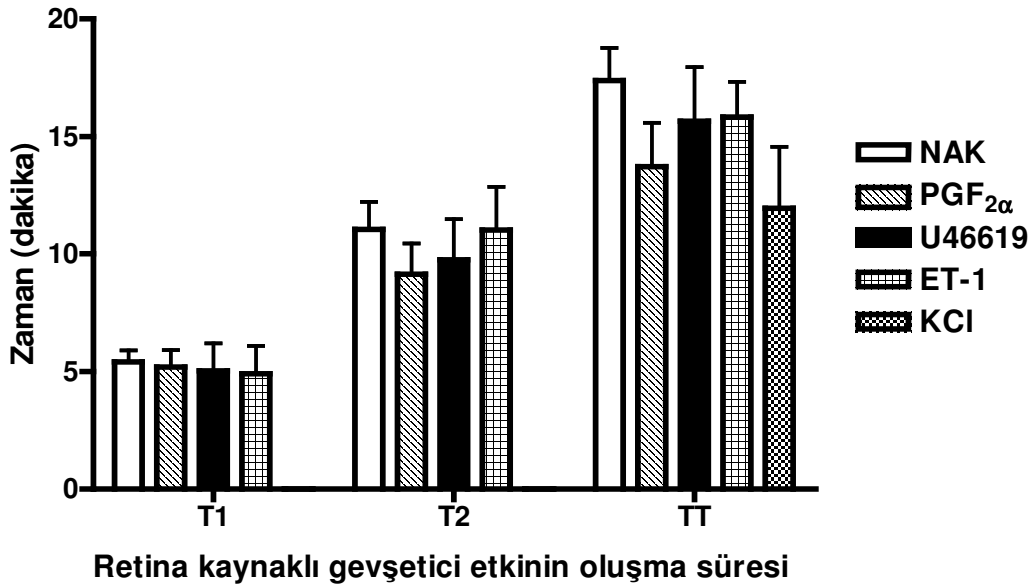
	Uzunluk	İç çap	Prekontraksiyon düzeyi	n
	(mm)	(µm)	(mN/mm)	
NAK	1.61±0.06	243.91±18.39	0.64±0.11	7
PGF_{2α}	1.67±0.05	224.55±13.85	1.04±0.14	12
U46619	1.60±0.09	230.20±22.37	0.83±0.17	6
ET-1	1.63±0.07	247.60±15.81	0.71±0.16	7
KCl	1.67±0.05	224.76±9.34	0.63±0.12	8

n: Retinal arter sayısı.

p>0.05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

4.3.2. Retinaya Bağlı Gevşetici Etkinin Oluşma Süresi

Noradrenalin (10^{-4} M) + potasyum klorür (30mM) kombinasyonu (NAK), U46619 (3×10^{-7} M), ET-1 (10^{-8} M), $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) veya KCl (120mM) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesine bağlı olarak meydana gelen ilk faz, ikinci faz ve toplam (maksimum) gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 9, Tablo 4).



Şekil 9: Çeşitli spazmojen ajanlarla benzer düzeyde prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi ile elde edilen gevşeme yanıtlarının oluşma süresi.

T1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi.

T2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi.

TT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi (T_{maks}).

Tablo 4: Çeşitli spazmojen ajanlarla benzer düzeyde prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi ile elde edilen gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.

	T1 (dk.)	T2 (dk.)	n	TT (dk.)	n
NAK	5.40±0.50	11.04±1.18	6	17.38±1.39	7
PGF_{2α}	5.19±0.72	9.14±1.31	11	13.72±1.86	12
U46619	5.02±1.18	9.74±1.74	5	15.64±2.31	6
ET-1	4.91±1.17	11.01±1.85	5	15.82±1.51	7
KCl	-	-	-	11.94±2.62	8

T1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi.

T2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi.

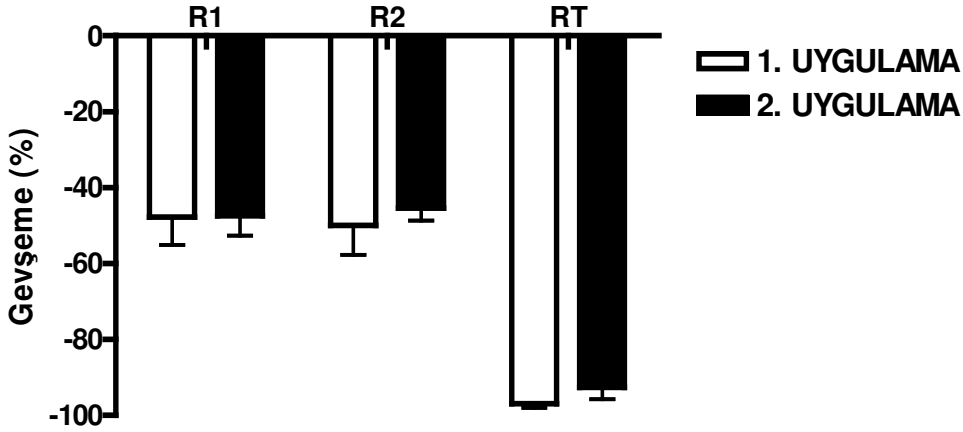
TT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (T_{maks}) dakika cinsinden oluşma süresi.

n: Retinal arter sayısı.

p>0.05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

4.3.3. Retinaya Bağlı Gevşetici Etkinin Tekrarlanabilirliği

İzole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusu yerleştirilmesine bağlı gevşeme yanıtının tekrarlanabilir özellikte olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaçla $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilmiş retinal arterlerde retina dokusuna bağlı ilk gevşeme yanıtı elde edildikten sonra, damarlar 1 saat dinlenmeye bırakılmış ve her 10 dakikada bir ortamın solüsyonu değiştirilmiştir. Bekleme süresinin ardından damarlar yine $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilerek retinaya bağlı gevşeme yanıtı tekrar elde edilmiştir. Retinaya bağlı gevşetici etkinin maksimum düzeyi, profili ve oluşma süreleri, ilk ve ikinci uygulamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir (Şekil 10 ve 11; Tablo 5 ve 6).

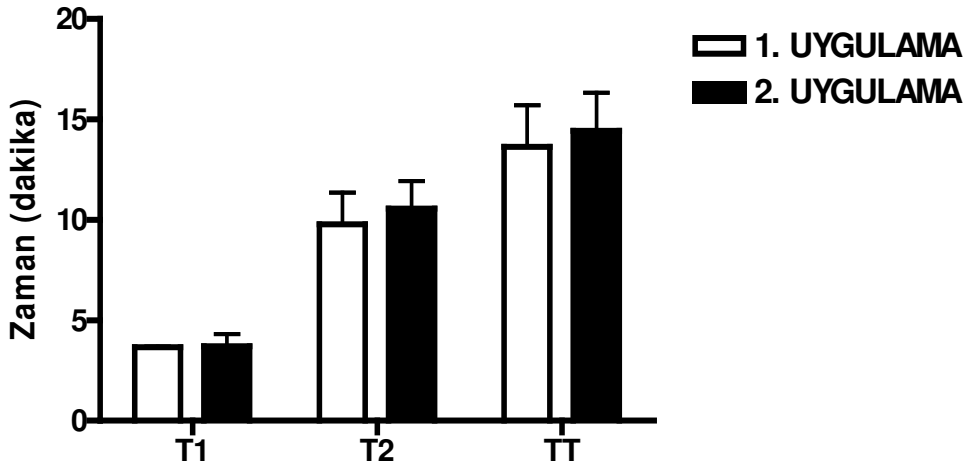


Şekil 10: $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesine bağlı oluşan gevşetici etkinin tekrarlanabilirliğinin incelenmesi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.



Şekil 11: $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusu yerleştirilmesine bağlı oluşan gevşetici etkinin tekrarlanabilirliğinin zaman açısından incelenmesi.

T1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi.

T2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi.

TT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (T_{maks}) dakika cinsinden oluşma süresi.

Tablo 5: $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun ilk ve ikinci uygulama olarak yerleştirilmesi sonucu elde edilen gevşeme yanıtları ve prekontraksiyon düzeyleri.

	Prekontraksiyon	R1	R2	RT	n
	(mN/mm)	(%)	(%)	(%)	
1. Uygulama	1.32±0.09	47.69±7.34	49.94±7.79	96.89±1.10	6
2. Uygulama	1.31±0.16	47.34±5.26	45.38±3.25	92.60±3.11	6

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

n: Retinal arter sayısı.

p>0.05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

Tablo 6: $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun ilk ve ikinci uygulama olarak yerleştirilmesi sonucu elde edilen gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.

	T1	T2	TT	n
	(dk.)	(dk.)	(dk.)	
1. Uygulama	3.65±0.04	9.77±1.58	13.64±2.06	6
2. Uygulama	3.70±0.6	10.55±1.38	14.45±1.87	6

T1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi.

T2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi.

TT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (T_{maks}) dakika cinsinden oluşma süresi.

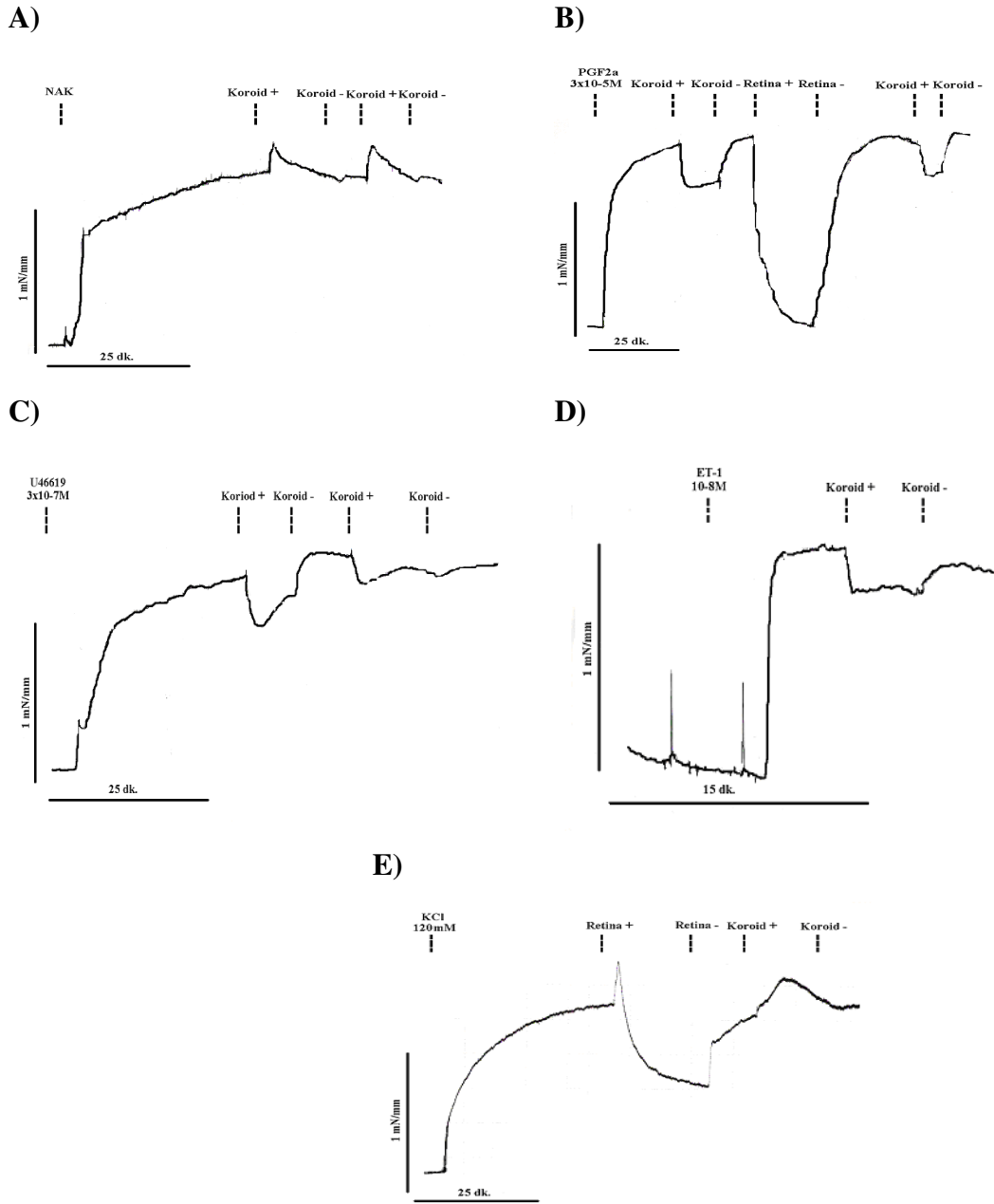
n: Retinal arter sayısı.

p>0.05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

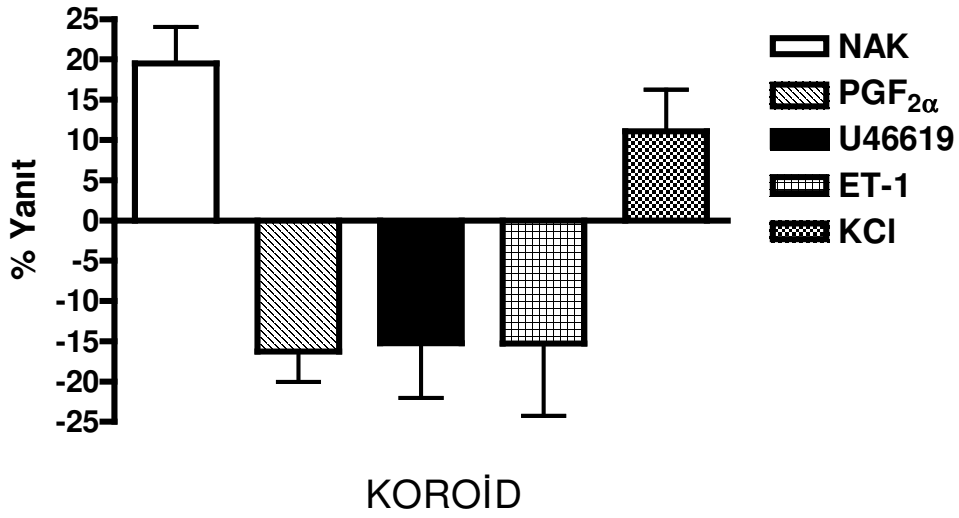
4.4. Koroidin Etkisinin İncelenmesi

4.4.1. Çeşitli Spazmojen Ajanlar ile Prekontrakte Edilen İzole Sığır Retinal Arterleri Üzerine Koroid Dokusunun Yerleştirilmesi

Noradrenalin ($10^{-4}M$) + potasyum klorür (30mM) kombinasyonu (NAK), U46619 ($3 \times 10^{-7}M$), ET-1 ($10^{-8}M$), $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) veya KCl (120mM) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine retinal dokuya benzer boyutta koroid dokusunun yerleştirilmesi retinadan farklı olarak zayıf bir gevşeme veya hafif bir kasılma yanıtına neden olmuştur. NAK ve KCl ile prekontrakte edilen damarlarda koroide ait yanıtların genellikle kasılma şeklinde U46619, ET-1 veya $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen damarlarda ise genellikle gevşeme şeklinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 12 ve 13, Tablo 7). Sığır retinal arterlerinde koroid dokusu ile elde edilen gevşetici etkinin, retina dokusu ile elde edilen gevşetici etkiye göre oldukça düşük düzeyde olduğu görülmüştür.



Şekil 12: (A) NAK [$10^{-4}M$ + KCl (30mM)], (B) PGF_{2α} ($3 \times 10^{-5}M$), (C) U46619 ($3 \times 10^{-7}M$), (D) ET-1 ($10^{-8}M$), (E) KCl (120mM) prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine koroid dokusunun yerleştirilmesinin etkisi (orijinal trase).



Şekil 13: Çeşitli spazmojen ajanlarla prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine koroid dokusunun yerleştirilmesinin etkisi.

Tablo 7: Çeşitli spazmojen ajanlarla prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde koroid dokusunun etkisi.

	Koroid	
	% Yanıt	n
NAK	19.54±4.51	6
PGF _{2α}	-16.26±3.78	6
U46619	-15.24±6.78	6
ET-1	-15.28±8.95	9
KCl	11.10±5.17	8

Koroide bağlı oluşan toplam yanıtın % cinsinden gösteriminde (-) değerler gevşeme, (+) değerler ise kasılma yönündeki yanıtları ifade etmektedir.

n: Retinal arter sayısı.

4.5. Retinata Bağlı Gevşetici Etkinin Mekanizmasının İncelenmesi

4.5.1. Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktörlerin Rolünün İncelenmesi

Bu deneylerde kullanılan retinal arterlerin uzunlukları, iç çap ölçüleri ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile elde edilen prekontraksiyon düzeyleri birbiriyle uyumluluk göstermektedir (Tablo 8). Bununla birlikte deendotelize damarlarda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile elde edilen prekontraksiyon düzeyinin endoteli intakt olan kontrolü ile karşılaştırıldığında azaldığı gözlenmiştir (Tablo 8). Mekanizmaya yönelik çalışmalarda, prekontraksiyon ajanı olarak stabil bir kasılma oluşturması ve hızla yanıt vermesi nedeniyle $\text{PGF}_{2\alpha}$ 'nin kullanılması tercih edilmiştir.

4.5.1.1. Siklooksijenaz İnhibitörü İndometazinin Etkisi

Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı kontrol gevşeme yanıtı alındıktan sonra retinal arterler ve retina dokusu siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10^{-5}M ; 30 dk.) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda retinal arterler $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile benzer kasılma düzeyinde prekontrakte edilmiş ve retinanın etkisi tekrar incelenmiştir. Retinaya bağlı gevşeme yanıtları aynı dokudaki kontrolü (inkübasyon öncesi retinal gevşeme yanıtları) ile karşılaştırıldığında ilk faz, ikinci faz ve toplam (maksimum) gevşeme yüzdeleri ve süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (Şekil 14, Tablo 9 ve 10).

4.5.1.2. Nitrik Oksit Sentetaz İnhibitörü L-NOARG' ın Etkisi

Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı kontrol gevşeme yanıtı alındıktan sonra retinal arterler ve

retina dokusu NO sentetaz inhibitörü L-NOARG (10^{-4} M; 30 dk.) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda retinal arterler $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile benzer kasılma düzeyinde prekontrakte edilmiş ve retinanın etkisi tekrar incelenmiştir. Retinaya bağlı gevşeme yanıtları aynı dokudaki kontrolü (inkübasyon öncesi retinal gevşeme yanıtları) ile karşılaştırıldığında ilk faz, ikinci faz ve toplam (maksimum) gevşeme yüzdeleri ve süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (Şekil 15, Tablo 9 ve 10).

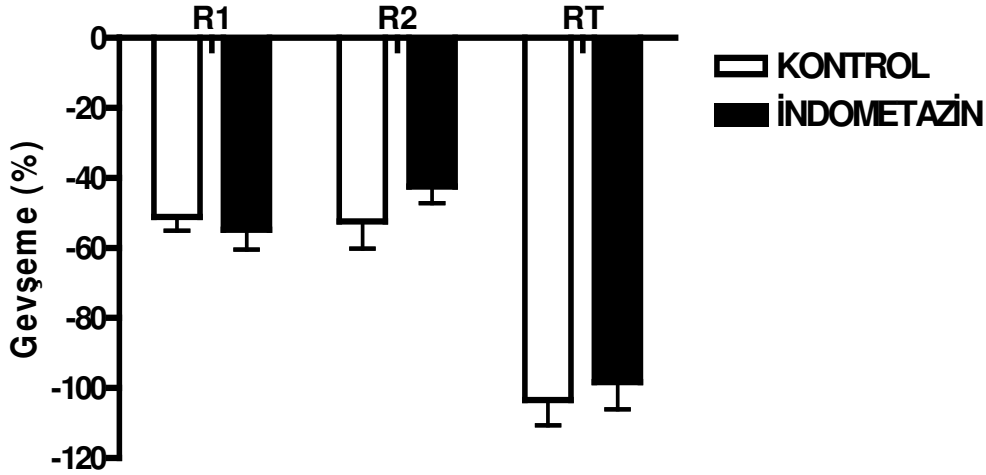
4.5.1.3. Guanilat Siklaz İnhibitörü ODQ' nun Etkisi

Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı kontrol gevşeme yanıtı alındıktan sonra retinal arterler ve retina dokusu guanilat siklaz inhibitörü ODQ (10^{-5} M; 30 dk.) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda retinal arterler $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile benzer kasılma düzeyinde prekontrakte edilmiş ve retinanın etkisi tekrar incelenmiştir. Retinaya bağlı gevşeme yanıtları aynı dokudaki kontrolü (inkübasyon öncesi retinal gevşeme yanıtları) ile karşılaştırıldığında ilk faz, ikinci faz ve toplam (maksimum) gevşeme yüzdeleri ve süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (Şekil 16, Tablo 9 ve 10).

4.5.1.4. Deendotelize Edilmiş İzole Sığır Retinal Arterlerinde Retinanın Etkisi

Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile prekontrakte edilen deendotelize sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi yine bifazik karakter gösteren akut bir gevşeme yanıtına neden olmuştur. İlk faz gevşeme yanıtlarının endoteli intakt (kontrol) retinal arterlerde elde edilen ilk faz gevşeme yanıtları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu buna karşın ikinci faz gevşeme yanıtlarının ise daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ancak retinaya bağlı toplam (maksimum) gevşeme yanıtlarının % değerleri ve yanıtların oluşma süreleri açısından deendotelize ve endoteli intakt retinal arterler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil

17, Tablo 9 ve 10). Bununla birlikte deendotelize damarlarda $PGF_{2\alpha}$ ile elde edilen prekontraksiyon düzeyinin endoteli intakt olan kontrolü ile karşılaştırıldığında azaldığı gözlenmiştir (Tablo 8).

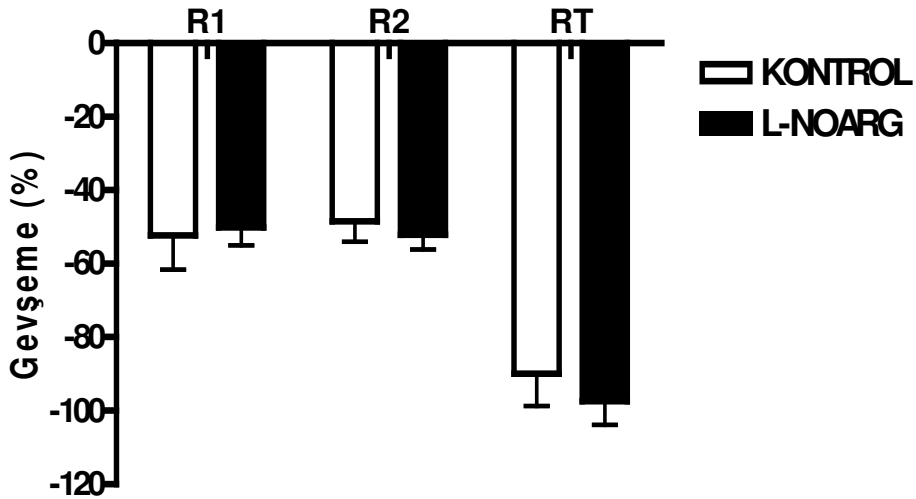


Şekil 14: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında siklooksijenaz inhibitörü indometazin ($10^{-5}M$) etkisi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

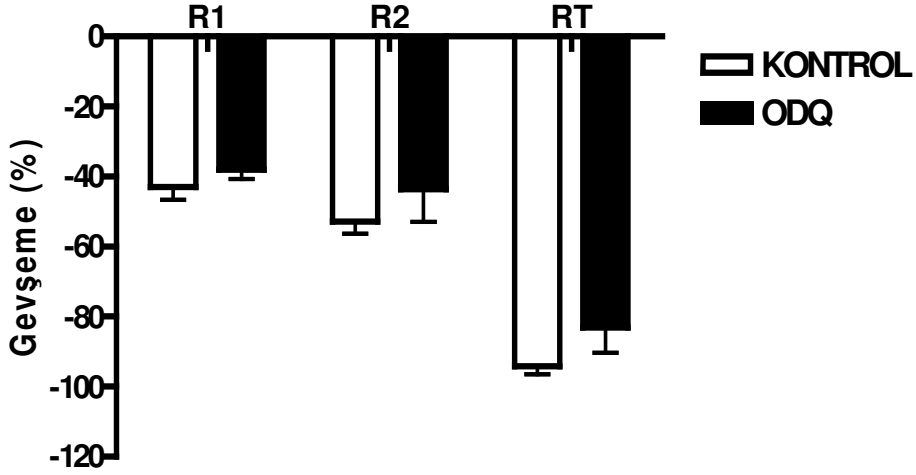


Şekil 15: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında NO sentaz inhibitörü L-NOARG' in ($10^{-4}M$) etkisi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

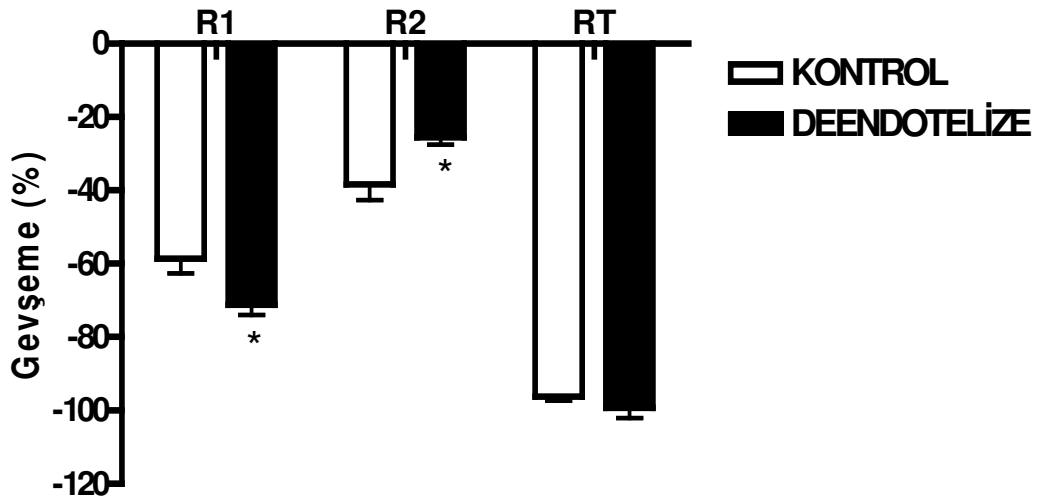


Şekil 16: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında guanilat siklaz inhibitörü ODQ'nun (10^{-5} M) etkisi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.



Şekil 17: Deendothelize edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtları.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

***p<0.01:** Kontrol (endoteli intakt) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Tablo 8: Deendotelize veya çeşitli inhibitörler ile inkübe edilen izole sığır retinal arterlerinin uzunlukları, iç çapları ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile elde edilen prekontraksiyon düzeyleri.

	Uzunluk (mm)	İç çap (μm)	Prekontraksiyon (mN/mm)	n
Kontrol	1.75 \pm 0.02	233.00 \pm 11.35	1.20 \pm 0.20	6
+İndo. (10^{-5}M)			1.16 \pm 0.15	6
Kontrol	1.73 \pm 0.04	233.87 \pm 11.04	0.74 \pm 0.13	6
+L-NOARG (10^{-4}M)			0.81 \pm 0.15	6
Kontrol	1.58 \pm 0.30	237.67 \pm 16.04	1.30 \pm 0.23	8
+ODQ (10^{-4}M)			1.42 \pm 0.21	8
Kontrol	1.68 \pm 0.05	228.92 \pm 18.68	1.50 \pm 0.07	6
Deendotelize	1.56 \pm 0.12	207.48 \pm 11.65	1.02 \pm 0.21*	6

n: Retinal arter sayısı.

p>0.05: Kontrol (endoteli intakt) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Tablo 9: Deendotelize veya çeşitli inhibitörler ile inkübe edilen izole sığır retinal arterlerinde retina dokusuna bağlı olarak oluşan gevşeme yanıtları.

	R1 (%)	R2 (%)	n	RT (%)	n
Kontrol	51.12±3.91	52.31±7.84	6	103.43±7.19	6
+İndo. (10⁻⁵M)	54.74±5.69	42.45±4.72	6	98.22±7.79	6
Kontrol	52.24±9.40	48.43±5.63	4	89.94±8.83	6
+L-NOARG (10⁻⁴M)	50.20±4.79	52.14±3.99	4	97.47±6.33	6
Kontrol	42.95±3.75	52.83±3.56	6	94.15±2.33	8
+ODQ (10⁻⁵M)	38.04±2.61	43.68±9.30	6	83.13±7.23	8
Kontrol	49.78±6.56	44.66±6.37	4	94.43±0.61	6
Deendotelize	73.98±2.09*	24.33±1.78*	4	101.17±3.45	6

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

***p<0.01:** Kontrol (endoteli intakt) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Tablo 10: Deendotelize veya çeşitli inhibitörler ile inkübe edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.

	T1 (dk.)	T2 (dk.)	n	TT (dk.)	n
Kontrol	6.40±0.86	9.45±1.19	6	16.51±1.61	6
+ İndo. (10⁻⁵M)	6.95±0.79	10.77±0.86	6	16.57±2.56	6
Kontrol	6.82±0.75	11.85±0.96	4	15.66±2.60	6
+L-NOARG (10⁻⁴M)	6.05±0.71	15.28±2.56	4	19.32±3.46	6
Kontrol	6.15±0.48	11.00±2.00	6	15.44±2.34	8
+ODQ (10⁻⁵M)	5.80±1.51	12.65±3.26	6	17.38±3.51	8
Kontrol	5.85±1.28	6.40±1.26	4	10.69±1.58	6
Deendotelize	5.23±0.75	7.91±1.16	4	13.27±1.17	6

T1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının oluşma süresi.

T2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının oluşma süresi.

TT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (T_{maks}) oluşma süresi.

n: Retinal arter sayısı.

p>0.05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

4.5.2. Potasyum Kanallarının Rolünün İncelenmesi

Bu deneylerde kullanılan retinal arterlerin uzunlukları, iç çap ölçüleri ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile elde edilen prekontraksiyon düzeyleri birbiriyle uyumluluk göstermektedir (Tablo 11).

4.5.2.1. K^+_{ATP} Kanalı İnhibitörü Glibenklamidin Etkisi

Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı kontrol gevşeme yanıtı alındıktan sonra retinal arterler ve retina dokusu K^+_{ATP} kanalının inhibitörü olan glibenklamid (Glib. 10^{-5}M , 30dk.) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda retinal arterler $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile benzer kasılma düzeyinde prekontrakte edilmiş ve retinanın etkisi tekrar incelenmiştir. Glibenklamid inkübasyonu varlığında elde edilen retinaya bağlı gevşeme yanıtları aynı dokudaki kontrolü (inkübasyon öncesi retinal gevşeme yanıtları) ile karşılaştırıldığında ilk faz, ikinci faz ve toplam (maksimum) gevşeme yüzdeleri ve süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (Şekil 18, Tablo 12 ve 13).

4.5.2.2. $\text{K}^+_{\text{Ca}^{++}}$ Kanalı İnhibitörü Tetraetilamonyumun Etkisi

Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı kontrol gevşeme yanıtı alındıktan sonra retinal arterler ve retina dokusu $\text{K}^+_{\text{Ca}^{++}}$ kanallarının nonspesifik inhibitörü olan tetraetilamonyum (TEA; 10^{-2}M ; 30 dk.) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda retinal arterler $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile benzer kasılma düzeyinde prekontrakte edilmiş ve retinanın etkisi tekrar incelenmiştir. TEA inkübasyonu varlığında elde edilen retinaya bağlı gevşeme yanıtları, aynı dokudaki kontrolü (inkübasyon öncesi retinal gevşeme yanıtları) ile karşılaştırıldığında ilk faz, ikinci faz ve toplam (maksimum) gevşeme yüzdeleri ve süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (Şekil 19, Tablo 12 ve 13).

4.5.2.2.i. $BK^{+}_{Ca^{++}}$ Kanalı İnhibitörü Karibdotoksinin Etkisi

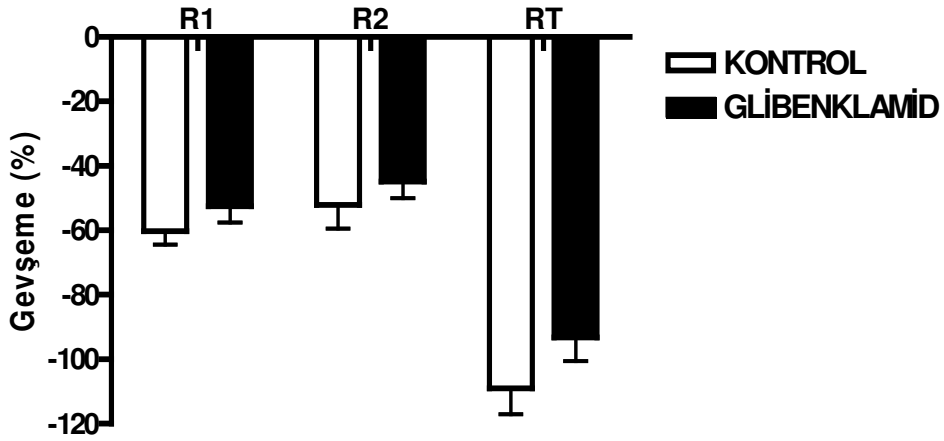
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı kontrol gevşeme yanıtı alındıktan sonra retinal arterler ve retina dokusu $K^{+}_{Ca^{++}}$ kanallarının bir alt tipi olan $BK^{+}_{Ca^{++}}$ kanalının inhibitörü olan karibdotoksin (CTX; $10^{-7}M$, 30 dk.) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda retinal arterler $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile benzer kasılma düzeyinde prekontrakte edilmiş ve retinanın etkisi tekrar incelenmiştir. CTX inkübasyonu varlığında elde edilen retinaya bağlı gevşeme yanıtları aynı dokudaki kontrolü (inkübasyon öncesi retinal gevşeme yanıtları) ile karşılaştırıldığında ilk faz, ikinci faz ve toplam (maksimum) gevşeme yüzdeleri ve süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (Şekil 20, Tablo 12 ve 13).

4.5.2.2.ii. $SK^{+}_{Ca^{++}}$ Kanalı İnhibitörü Apaminin Etkisi

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı kontrol gevşeme yanıtı alındıktan sonra retinal arterler ve retina dokusu $K^{+}_{Ca^{++}}$ kanallarının bir alt tipi olan $SK^{+}_{Ca^{++}}$ kanalının inhibitörü olan apamin ($5 \times 10^{-7}M$, 30 dk.) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda retinal arterler $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile benzer kasılma düzeyinde prekontrakte edilmiş ve retinanın etkisi tekrar incelenmiştir. Apamin inkübasyonu varlığında elde edilen retinaya bağlı gevşeme yanıtları aynı dokudaki kontrolü (inkübasyon öncesi retinal gevşeme yanıtları) ile karşılaştırıldığında ilk faz, ikinci faz ve toplam (maksimum) gevşeme yüzdeleri ve süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (Şekil 21, Tablo 12 ve 13).

4.5.2.2.iii. $BK^{+}_{Ca^{++}}$ Kanalı İnhibitörü Karibdotoksin ve $SK^{+}_{Ca^{++}}$ Kanalı İnhibitörü Apamin Kombinasyonunun Etkisi

Karibdotoksin ve apaminin sırasıyla, $BK^{+}_{Ca^{++}}$ ve $SK^{+}_{Ca^{++}}$ kanallarının spesifik inhibitörleri, birlikte kullanılmasının bu kanalların üzerinde daha güçlü bir inhibisyona neden olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı kontrol gevşeme yanıtı alındıktan sonra retinal arterler ve retina dokusu $BK^{+}_{Ca^{++}}$ inhibitörü olan karibdotoksin (CTX $10^{-7}M$, 30 dk.) ve $SK^{+}_{Ca^{++}}$ inhibitörü olan apamin ($5 \times 10^{-7}M$, 30 dk.) kombinasyonu ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda retinal arterler $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile benzer kasılma düzeyinde prekontrakte edilmiş ve retinanın etkisi tekrar incelenmiştir. CTX ve apaminin kombine inkübasyonu varlığında elde edilen retinaya bağlı gevşeme yanıtları, aynı dokudaki kontrolü (inkübasyon öncesi retinal gevşeme yanıtları) ile karşılaştırıldığında ilk faz, ikinci faz ve toplam (maksimum) gevşeme yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (Şekil 22, Tablo 12). Ancak, retinaya bağlı ilk faz ve toplam (maksimum) gevşeme yanıtının oluşma sürelerinin inhibitör kombinasyonu varlığında arttığı gözlenmiştir (Tablo 13).

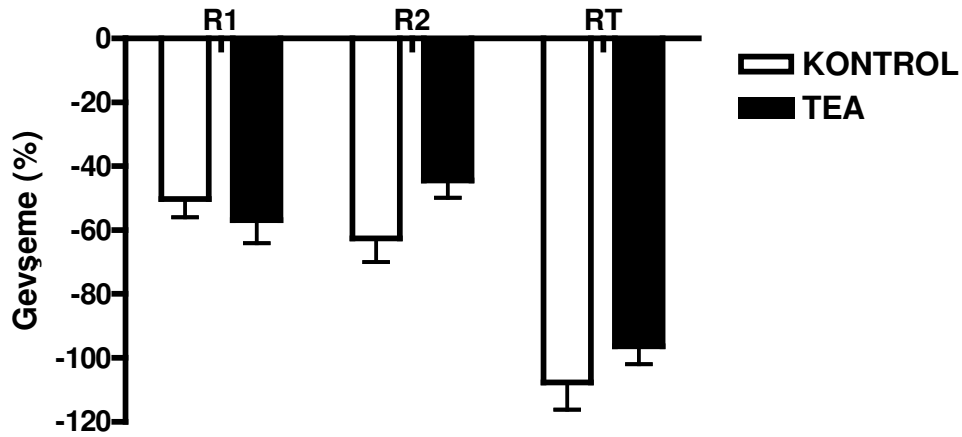


Şekil 18: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında K^+_{ATP} kanalı inhibitörü glibenklamidin ($10^{-5}M$) etkisi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

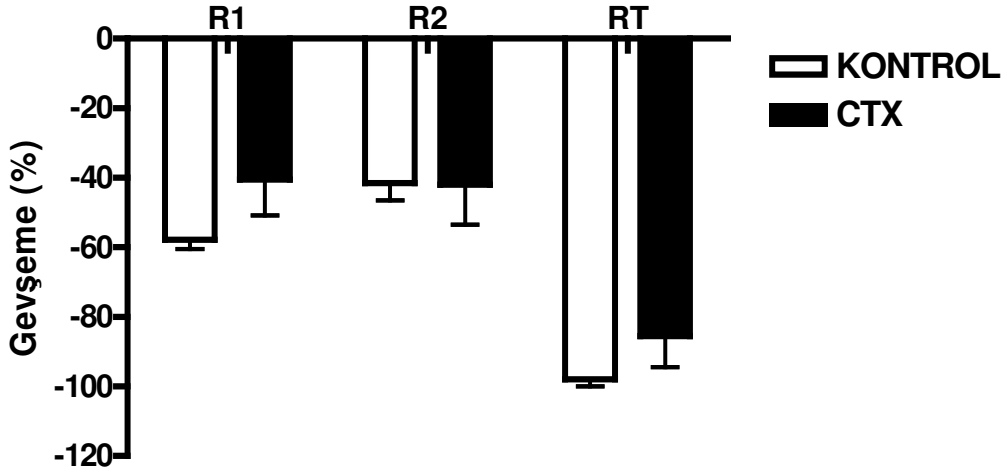


Şekil 19: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında K^+_{Ca++} kanalı inhibitörü TEA' nin ($10^{-2}M$) etkisi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

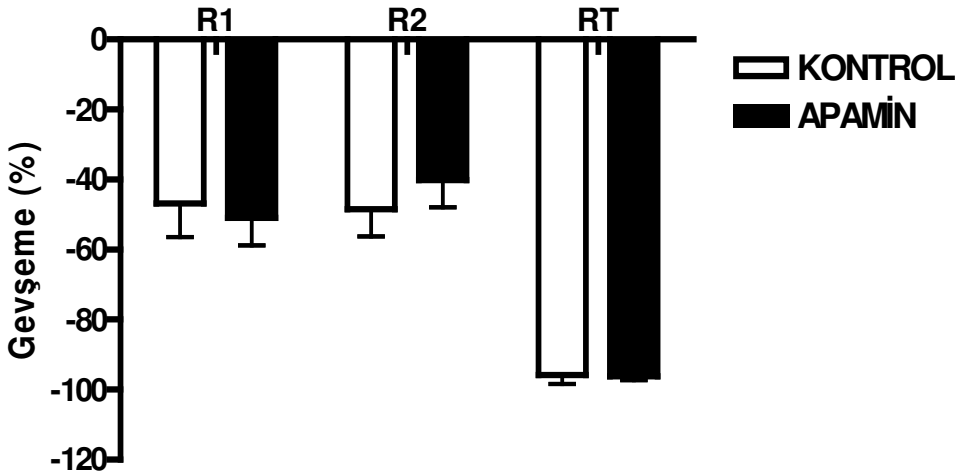


Şekil 20: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında $BK^{+}_{Ca^{++}}$ kanalı inhibitörü CTX' in ($10^{-7}M$) etkisi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

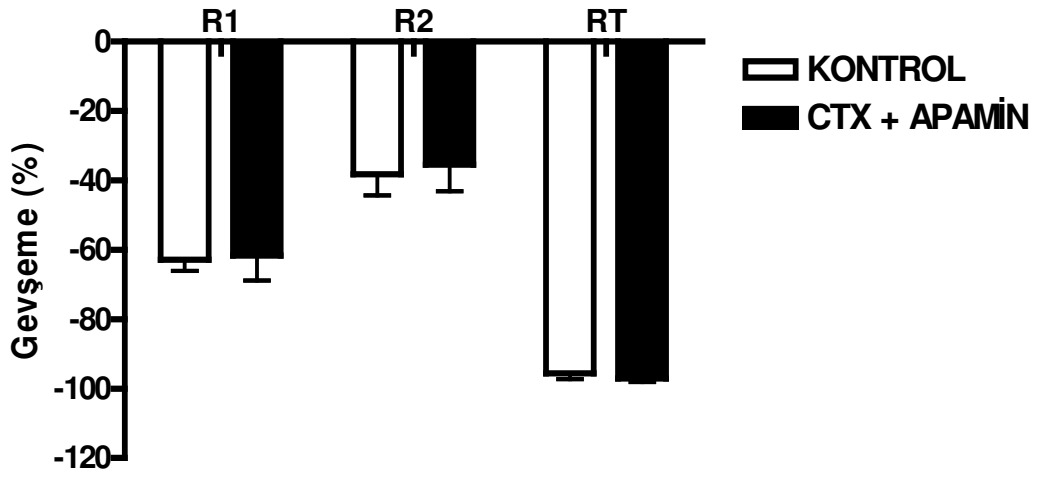


Şekil 21: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında $SK^{+}_{Ca^{++}}$ kanalı inhibitörü apaminin ($5 \times 10^{-7}M$) etkisi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.



Şekil 22: Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında CTX ($10^{-7}M$) ve apamin ($5 \times 10^{-7}M$) kombinasyonunun etkisi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

Tablo 11: K^+_{ATP} veya $K^+_{Ca^{++}}$ kanallarının inhibitörleri ile inkübe edilen izole sığır retinal arterlerinin uzunlukları, iç çapları ve prekontraksiyon düzeyleri.

	Uzunluk (mm)	İç çap (μ m)	Prekontraksiyon (mN/mm)	n
Kontrol	1.73 \pm 0.02	222.29 \pm 6.04	1.25 \pm 0.16	9
+Glib. (10^{-5}M)			1.10 \pm 0.12	9
Kontrol	1.67 \pm 0.07	226.07 \pm 8.53	1.30 \pm 0.12	9
+TEA (10^{-2}M)			1.30 \pm 0.13	9
Kontrol	1.67 \pm 0.06	244.87 \pm 7.10	1.34 \pm 0.09	7
+CTX (10^{-7}M)			1.40 \pm 0.11	7
Kontrol	1.72 \pm 0.03	226.21 \pm 9.72	1.06 \pm 0.20	6
+Apamin (5×10^{-7}M)			1.02 \pm 0.18	6
Kontrol	1.69 \pm 0.05	230.69 \pm 9.43	1.20 \pm 0.18	6
+CTX (10^{-7}M) + Apamin (5×10^{-7}M)			1.04 \pm 0.19	6

n: Retinal arter sayısı.

p> 0.05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

Tablo 12: K^+_{ATP} veya $K^+_{Ca^{++}}$ kanallarının inhibitörleri varlığında retinaya bağlı gevşeme yanıtları.

	R1 (%)	R2 (%)	n	RT (%)	n
Kontrol	60.21±4.20	52.12±7.38	5	109.03±7.99	9
+Glib. ($10^{-5}M$)	52.53±5.01	44.87±5.19	5	93.22±7.30	9
Kontrol	50.24±5.71	62.55±7.37	6	107.69±8.41	9
+TEA ($10^{-2}M$)	56.82±7.28	44.40±5.43	6	96.33±5.67	9
Kontrol	57.88±2.61	41.60±4.84	5	97.94±2.00	7
+CTX ($10^{-7}M$)	40.56±10.33	41.99±11.49	5	85.54±8.91	7
Kontrol	46.85±9.59	48.47±7.82	6	95.82±2.55	6
+Apamin ($5 \times 10^{-7}M$)	50.97±7.77	40.12±7.81	6	96.16±1.06	6
Kontrol	62.81±3.20	38.22±6.17	6	95.52±1.77	6
+CTX ($10^{-7}M$) + Apamin ($5 \times 10^{-7}M$)	61.63±7.22	35.46±7.72	6	97.09±0.92	6

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

n: Retinal arter sayısı.

p>0.05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

Tablo 13: K^+_{ATP} veya $K^+_{Ca^{++}}$ kanallarının inhibitörleri varlığında retinaya bağlı gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.

	T1 (dk.)	T2 (dk.)	n	TT (dk.)	n
Kontrol	5.79±0.27	8.74±0.89	5	15.72±0.83	9
+Glib. ($10^{-5}M$)	4.48±0.87	10.46±0.99	5	13.30±1.40	9
Kontrol	5.02±0.28	10.73±0.7	6	15.89±0.62	9
+TEA ($10^{-2}M$)	7.14±0.71	14.29±2.17	6	18.47±2.63	9
Kontrol	5.53±1.05	7.81±1.02	5	12.54±0.73	7
+CTX ($10^{-7}M$)	5.81±1.53	13.81±4.43	5	16.65±3.80	7
Kontrol	4.60±0.74	6.49±1.00	6	10.44±1.10	6
+Apamin ($5 \times 10^{-7}M$)	6.54±1.68	8.91±0.98	6	12.93±1.45	6
Kontrol	3.47±0.45	5.95±0.86	6	9.63±0.75	6
+CTX ($10^{-7}M$) + Apamin ($5 \times 10^{-7}M$)	5.76±0.59*	7.95±1.26	6	13.77±1.80*	6

T1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının oluşma süresi.

T2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının oluşma süresi.

TT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (T_{maks}) oluşma süresi.

n: Retinal arter sayısı.

***p<0.05:** Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

4.5.3. Kalsiyum Kanallarının Rolünün İncelenmesi

Bu grup deneylerde çalışılan retinal arterlerin uzunlukları, iç çap ölçüleri ve elde edilen prekontraksiyon düzeyleri birbiriyle uyumluluk göstermektedir (Tablo 14 ve 15). Bununla birlikte, nifedipin inkübasyonunun $PGF_{2\alpha}$ ile oluşturulan prekontraksiyon düzeyinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Tablo 14).

4.5.3.1. L-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanallarının Etkisi

4.5.3.1.i. L-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanal Agonisti Bay k 8644'ün Etkisi

KCl (20mM) ile depolarize edilmiş izole sığır retinal arterler üzerine kümülatif olarak Bay k 8644'ün (10^{-9} - 10^{-6} M) uygulanması konsatrasyon-bağımlı kasılma yanıtına neden olmuştur (E_{maks} : 0.60 ± 0.11 mN/mm, pD_2 : 8.52 ± 0.13 , $n=8$, Şekil 23). Retinanın gevşetici etkisi Bay k 8644'ün maksimum kasılma oluşturan konstrasyonu ile prekontrakte edilen arterlerde incelenmiştir. Bay k 8644 (10^{-6} M) ile prekontrakte edilmiş retinal arterlerin üzerine bir parça retina dokusunun yerleştirilmesi akut başlayan ve bifazik özellik gösteren gevşeme yanıtına neden olmuştur (Şekil 24). Bay k 8644 (10^{-6} M) ile prekontrakte edilen retinal arterlerinde elde edilen maksimum gevşeme düzeyi $PGF_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile prekontrakte edilen arterlerde gözlenen maksimum gevşeme yanıtından farklı bulunmamıştır (sırasıyla; E_{maks} : % $93.49\pm 3,36$, $n=8$ ve % 94.45 ± 1.57 , $n=12$, $p>0.05$).

4.5.3.1.ii. L-Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalı İnhibitörü Nifedipinin Etkisi

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile prekontrakte izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı gevşeme yanıtı alındıktan sonra retinal arterler ve retina dokusu L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının inhibitörü nifedipin (Nif. 10^{-6} M, 30 dk.) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından retinal arterler $PGF_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile tekrar

prekontrakte edilmiş ve üzerine retina dokusu yerleştirilmiştir. Nifedipin inkübasyonu, retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtının ilk fazında artma, ikinci fazında ise azalma oluşturmuş ancak toplam (maksimum) gevşemeyi değiştirmemiştir. Buna karşın, nifedipin $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile oluşturulan prekontraksiyon düzeylerinde aynı dokudaki kontrolü ile (inkübe edilmemiş retinal arter ve retina dokusu) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Retinaya bağlı olarak görülen gevşemenin oluşma sürelerinde ise anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır (Şekil 25, Tablo 16 ve 17).

4.5.3.2. SERCA İnhibitörü Siklopiyazonik Asidin Etkisi

Retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtında SERCA'nın (sarkoplazmik/endoplazmik retikulum kalsiyum ATP_{az}) rolü bu pompanın spesifik inhibitörü siklopiyazonik asit (CPA) kullanılarak test edilmiştir. İlk olarak kümülatif CPA (10^{-8} - 10^{-5}M) uygulanması ile retinal arterlerin CPA'ya karşı reaktivitesi incelenmiştir. Retinal arterlere kümülatif olarak CPA (10^{-8} - 10^{-5}M) uygulanması herhangi bir yanıtı neden olmamıştır (Şekil 26). Ardından $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte izole sıgır retinal arterlerinde retinaya bağlı kontrol gevşeme yanıtı alındıktan sonra retinal arterler ve retina dokusu SERCA inhibitörü CPA (10^{-6}M , 30 dk.) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda retinal arterler $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile tekrar benzer düzeyde prekontrakte edilerek retinanın etkisi incelenmiştir. CPA inkübasyonu, retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtlarında ve yanıtın oluşma sürelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır (Şekil 27, Tablo 16 ve 17)

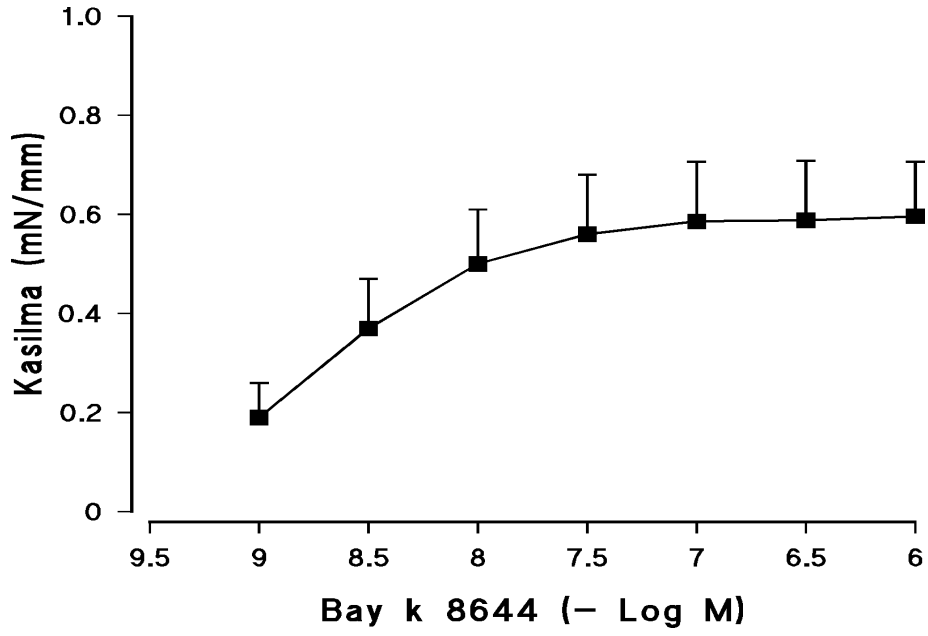
4.5.4. Kalsiyuma Karşı Duyarlılığın İncelenmesi

Kalsiyumsuz ortamda (kalsiyumsuz Krebs Ringer bikarbonat solüsyonu) dengelenen ve KCl 20 mM ile depolarize edilen retinal arterler üzerine kümülatif olarak CaCl_2 (10^{-7} - 10^{-2}M) uygulanması konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtlarına neden olmuştur. Buna karşın, üzerine bir parça retina dokusu yerleştirilerek 20 dakika

süreyle bekletilen retinal arterlerde CaCl_2 'nin kastırıcı etkisi tamamen inhibe olmuştur (Şekil 28, 29). Öte yandan, CaCl_2 ile prekontrakte retinal arterlerin üzerine bir parça retina dokusunun yerleştirilmesi ise akut başlayan ve bifazik karakter gösteren tam bir gevşeme yanıtına neden olmuştur (Şekil 28).

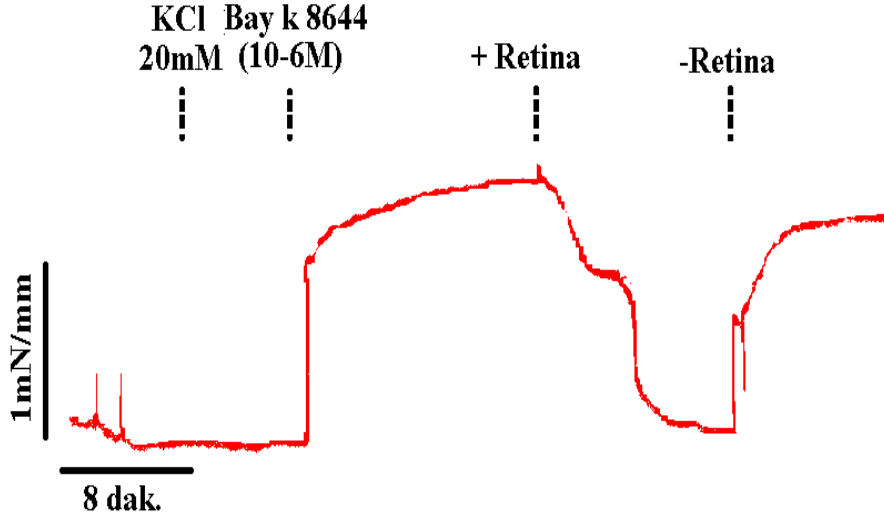
4.5.5. Ekstraselüler Kalsiyumun Uzaklaştırılmasının Etkisi

Kalsiyumsuz ortamda (kalsiyumsuz Krebs Ringer bikarbonat solüsyonu) 30 dakika süreyle dengelendirildikten sonra $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi akut başlayan ve genellikle bifazik karakter gösteren gevşeme yanıtına neden olmuştur (Şekil 29). Gevşeme yanıtının profili ve maksimum düzeyi, kalsiyumlu ortamda elde edilen kontrolleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (Şekil 30, Tablo18 ve 19).

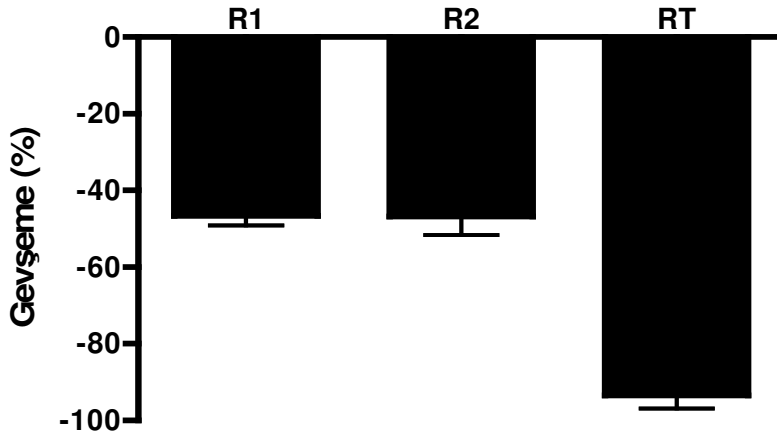


Şekil 23: İzole sığır retinal arterlerinde L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal agonisti Bay k 8644'ün konsantrasyon-yanıt eğrisi.

A)



B)

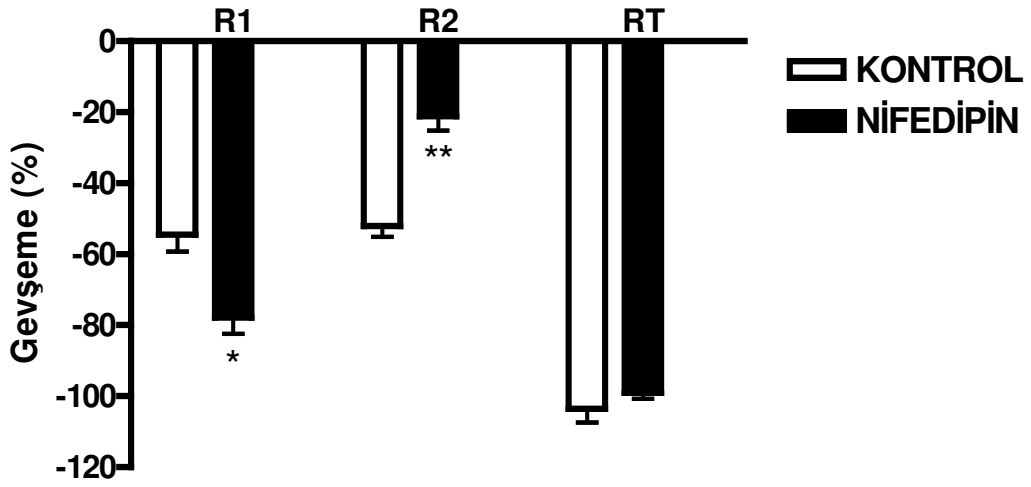


Şekil 24: L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal agonisti Bay k 8644 ($10^{-6}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinanın gevşetici etkisinin orijinal trase (A) ve bar grafik (B) olarak gösterimi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.



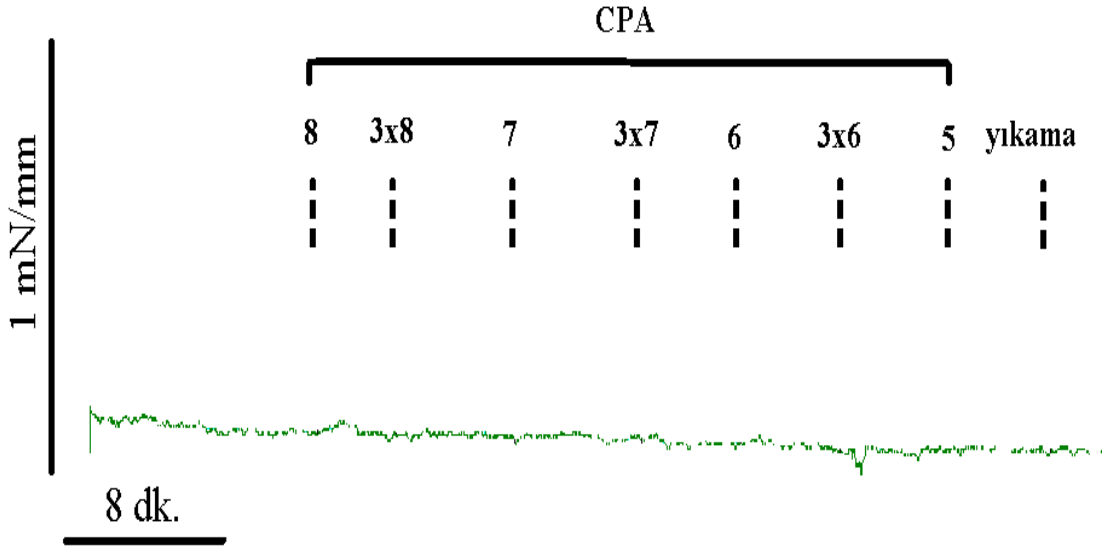
Şekil 25: Retinaya bağlı olarak görülen gevşetici etkide L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalı inhibitörü nifedipinin ($10^{-7}M$) etkisi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

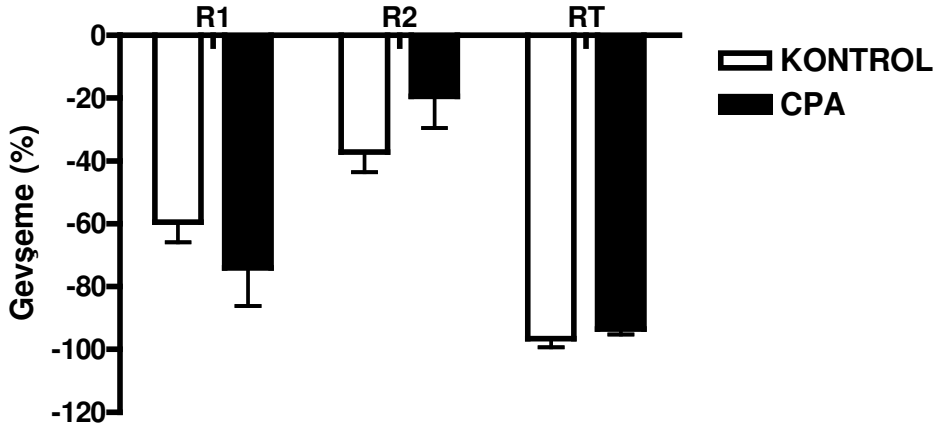
R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.



Şekil 26: İzole sığır retinal arterlerinde SERCA inhibitörü CPA' nın (10^{-8} - 10^{-6} M) etkisi (orijinal trase).



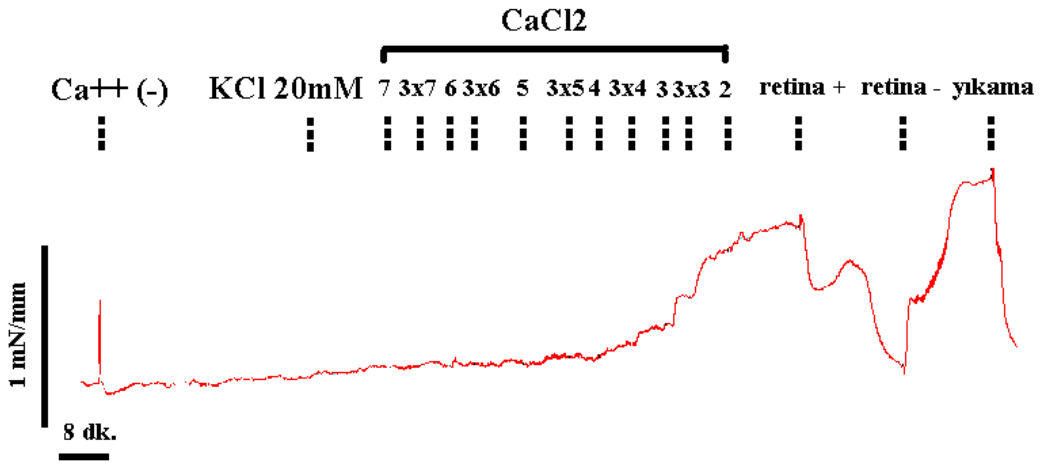
Şekil 27: Retinaya bağlı olarak görülen gevşetici etkide SERCA inhibitörü CPA' nın (10^{-6} M) etkisi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

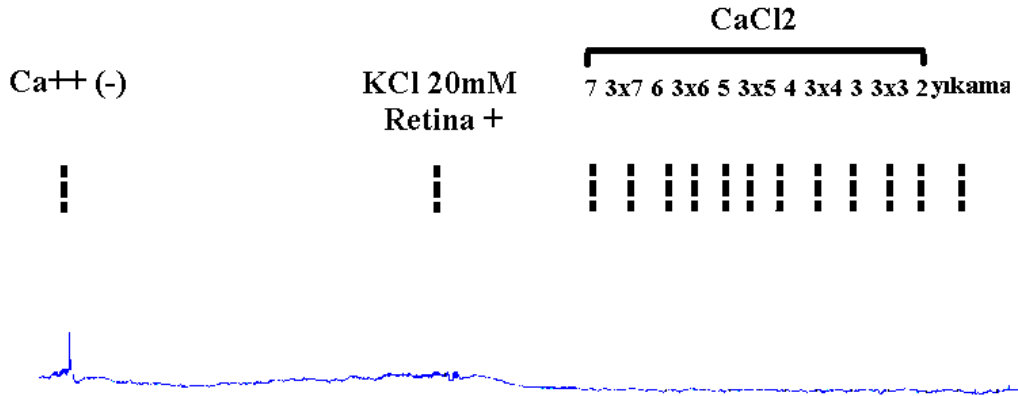
R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

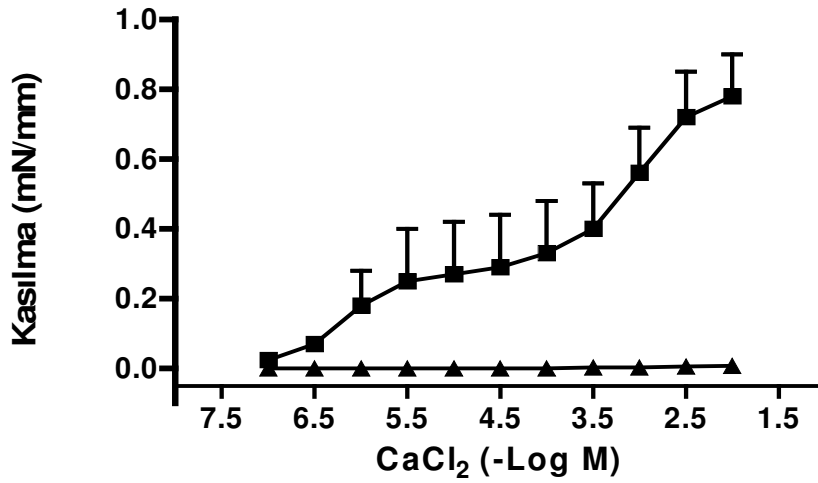
A)



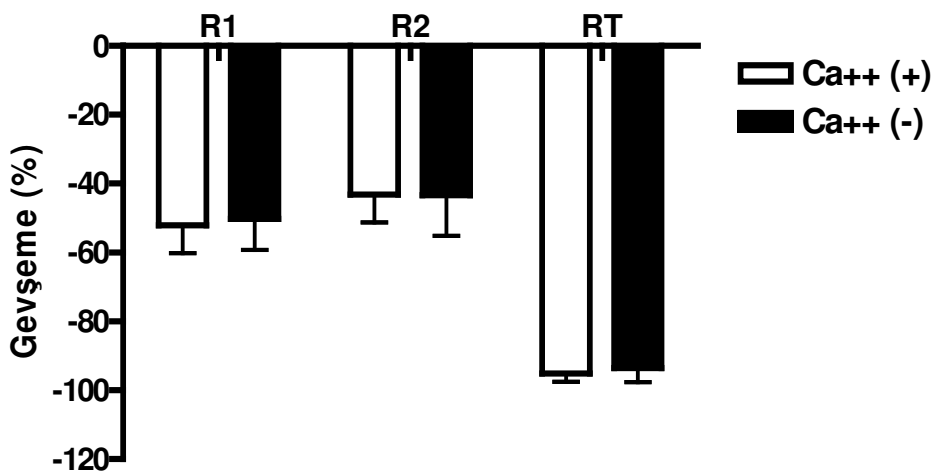
B)



Şekil 28: Kalsiyumsuz ortamda üzerine retina dokusu yerleştirilmemiş (A) ve yerleştirilmiş (B) izole sıgır retinal arterlerinde CaCl₂'nin (10⁻⁷-10⁻²M) konsantrasyon-yanıt ilişkisi (orijinal trase).



Şekil 29: Kalsiyumsuz ortamda üzerine retina dokusu yerleştirilmemiş (■) ve yerleştirilmiş (▲) izole sığır retinal arterlerinde CaCl₂'ün (10^{-7} - 10^{-2} M) konsantrasyon-yanıt eğrileri.



Şekil 30: Kalsiyumlu [Ca⁺⁺(+)] ve kalsiyumsuz [Ca⁺⁺(-)] ortamda PGF_{2α} (sırasıyla; 3×10^{-6} M ve 3×10^{-5} M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinanın gevşetici etkisi.

Tablo 14: L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal antagonisti nifedipin (Nif. 10^{-6} M) veya SERCA inhibitörü CPA (10^{-6} M) ile inkübe edilen izole sığır retinal arterlerinin uzunlukları, iç çapları ve prekontraksiyon düzeyleri.

	Uzunluk (mm)	İç çap (μ m)	Prekontraksiyon (mN/mm)	n
Kontrol	1.73 \pm 0.02	242.47 \pm 5.33	1.36 \pm 0.12	9
+Nif. (10^{-6}M)			0.99 \pm 0.09*	9
Kontrol	1.55 \pm 0.10	218.78 \pm 10.68	1.28 \pm 0.12	6
+CPA (10^{-6}M)			1.10 \pm 0.19	6

n: retinal arter sayısı

***p<0.001:** Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

Tablo 15: Kalsiyumlu [Ca^{++} (+)] ve kalsiyumsuz [Ca^{++} (-)] ortamlarda $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinin uzunlukları, iç çapları ve prekontraksiyon düzeyleri.

	Uzunluk (mm)	İç çap (μ m)	Prekontraksiyon (mN/mm)	n
$PGF_{2\alpha}$				
Ca^{++} (+)	1.67 \pm 0.05	224.55 \pm 13.85	1.04 \pm 0.14	12
Ca^{++} (-)	1.73 \pm 0.02	233.32 \pm 6..2	1.13 \pm 0.15	6

n: Retinal arter sayısı

p>0.05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

Tablo 16: L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal antagonisti nifedipin (Nif. 10^{-6} M) veya SERCA inhibitörü CPA (10^{-6} M) varlığında retinaya bağılı gevşeme yanıtları.

	R1 (%)	R2 (%)	n	RT (%)	n
Kontrol	54.41±4.80	52.04±3.06	4	103.58±3.86	9
+Nif. (10^{-6}M)	77.35±4.63**	21.17±4.03*	4	99.03±1.69	9
Kontrol	59.41±6.41	37.19±6.35	6	96.60±2.62	6
+CPA (10^{-6}M)	74.03±12.13	19.32±10.10	3	93.45±1.81	6

R1: Retinaya bağılı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağılı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağılı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

n: Retinal arter sayısı.

****p<0.01; *p<0.05:** Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

Tablo 17: L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal antagonisti nifedipin (Nif. 10^{-6} M) veya SERCA inhibitörü CPA (10^{-6} M) varlığında retinaya bağılı gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.

	T1 (dk.)	T2 (dk.)	n	TT (dk.)	n
Kontrol	5.12±0.40	8.51±1.14	4	14.18±1.00	9
+Nif. (10^{-6}M)	4.53±1.15	11.70±2.21	4	11.48±1.66	9
Kontrol	4.19±0.43	6.37±0.61	6	10.72±0.83	6
+CPA (10^{-6}M)	3.88±1.48	6.05±1.11	3	11.48±1.54	6

T1: Retinaya bağılı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi.

T2: Retinaya bağılı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi.

TT: Retinaya bağılı olarak görülen toplam (maksimum) gevşeme yanıtının (T_{maks}) dakika cinsinden oluşma süresi.

n: Retinal arter sayısı.

p>0.05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

Tablo 18: Kalsiyumlu [$\text{Ca}^{++}(+)$] ve kalsiyumsuz [$\text{Ca}^{++}(-)$] ortamlarda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı gevşeme yanıtları.

	R1 (%)	R2 (%)	n	RT (%)	n
$\text{PGF}_{2\alpha}$					
$\text{Ca}^{++}(+)$	45.84±4.38	49.24±4.02	11	94.45±1.57	12
$\text{Ca}^{++}(-)$	50.24±9.03	43.31±11.86	6	93.54±4.12	6

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

n: Retinal arter sayısı.

p>0.05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

Tablo 19: Kalsiyumlu [$\text{Ca}^{++}(+)$] ve kalsiyumsuz [$\text{Ca}^{++}(-)$] ortamlarda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde retinaya bağlı gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.

	T1 (dk.)	T2 (dk.)	n	TT (dk.)	n
$\text{PGF}_{2\alpha}$					
$\text{Ca}^{++}(+)$	5.19±0.72	9.14±1.31	11	13.72±1.86	12
$\text{Ca}^{++}(-)$	3.91±0.87	6.08±1.03	6	10.12±1.61	6

T1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi.

T2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının dakika cinsinden oluşma süresi.

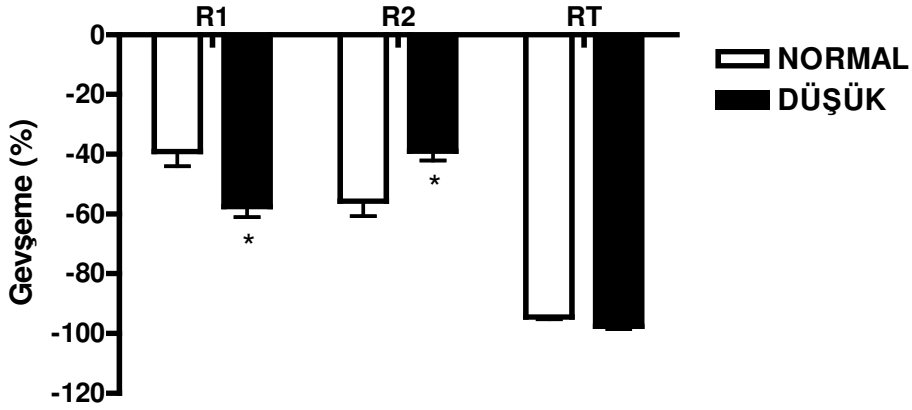
TT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam gevşeme yanıtının (T_{maks}) dakika cinsinden oluşma süresi.

n: Retinal arter sayısı.

p>0.05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

4.6. Düşük Prekontraksiyon Düzeyinde Retinaya Bağlı Gevşetici Etkinin İncelenmesi

Bazı inhibitörler ile inkübasyonun (ör. Nifedipin) ya da deendotelizasyonun retinal arterlerde, $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile oluşturulan prekontraksiyon düzeyinde kısmen azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Her iki durumda da retinaya bağlı maksimum gevşetici etki değişmemiş ancak ilk ve ikinci faz gevşemelerde istatistiksel olarak anlamlı benzer farklılıkların olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, bir grup sığır retinal arterlerinde $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile daha düşük prekontraksiyon düzeyi oluşturularak retina kaynaklı gevşetici etkinin prekontraksiyon düzeyinin azalmasına bağlı olarak değişip değişmediği incelenmiştir. Bu amaçla, öncelikle maksimal konsantrasyonda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen retinal arterlerde retina dokusuna bağlı kontrol gevşeme yanıtı elde edilmiş ve retinal arterler bir saat dinlenmeye bırakılmıştır. Ardından retinal arterler daha düşük düzeyde kasılma oluşturacak $\text{PGF}_{2\alpha}$ dozu ($3 \times 10^{-6} \text{M}$) ile tekrar kastırılmış ve retinaya bağlı gevşeme yanıtı elde edilmiştir. $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile oluşturulan iki farklı prekontraksiyon düzeyinde retina ile elde edilen gevşeme yanıtları karşılaştırılmıştır. Retinaya bağlı gevşeme yanıtının maksimum düzeyi ve oluşma süresinin retinal arterin prekontraksiyon düzeyinin azalmasına bağlı olarak değişiklik göstermediği görülmüştür. Bununla birlikte, retinaya bağlı ilk faz gevşeme yanıtının düşük prekontraksiyon düzeyinde arttığı, ikinci faz gevşeme yanıtının ise azaldığı gözlenmiştir (Şekil 31 ve 32, Tablo 20 ve 21). Retina kaynaklı gevşeme yanıtında görülen bu değişiklikler nifedipin uygulanması ve deendotelize edilen retinal arterlerdeki değişiklikler ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 31: Düşük prekontraksiyon düzeyinde retinanın gevşetici etkisi.

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

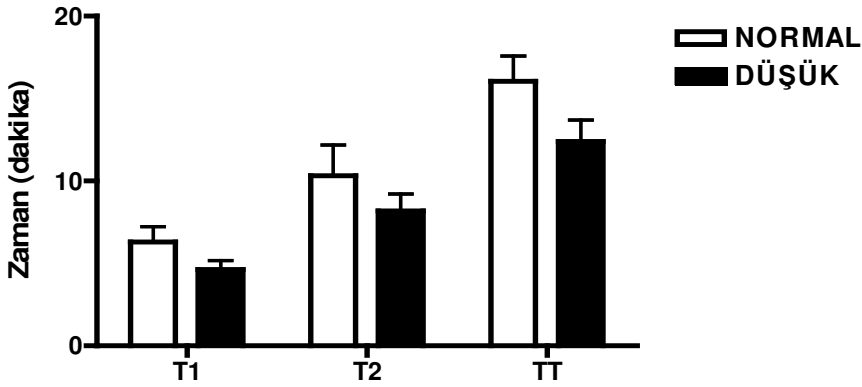
R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

*** $p < 0.01$:** Normal prekontraksiyon düzeyinde kastırılmış retinal arterlerde elde edilen retinal gevşemelere kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Normal: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile oluşturan prekontraksiyon düzeyi.

Düşük: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$) ile oluşturan prekontraksiyon düzeyi.



Şekil 32: Düşük prekontraksiyon düzeyinin retinaya bağlı oluşan gevşetici etkinin oluşma sürelerine etkisi.

T1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının oluşma süresi.

T2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının oluşma süresi.

TT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam gevşeme yanıtının (T_{maks}) oluşma süresi.

$p > 0.05$: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

Normal: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile oluşturan prekontraksiyon düzeyi..

Düşük: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-6}M$) ile oluşturan prekontraksiyon düzeyi.

Tablo 20: İzole sığır retinal arterlerinin normal ($\text{PGF}_{2\alpha}$; $3 \times 10^{-5} \text{M}$) ve düşük ($\text{PGF}_{2\alpha}$; $3 \times 10^{-6} \text{M}$) prekontraksiyon düzeylerinde elde edilen retinaya bağlı gevşeme yanıtları.

	Prekontraksiyon	R1	R2	n	RT	n
	(mN/mm)	(%)	(%)		(%)	
Normal	1.52±0.07	39.19±4.88	55.72±5.03	5	94.58±0.71	7
Düşük	1.16±0.10**	57.90±6.20*	37.82±5.56*	5	97.61±1.28	6

R1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

R2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının % cinsinden değeri.

RT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam gevşeme yanıtının (E_{maks}) % cinsinden değeri.

n: Retinal arter sayısı.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$: Normal prekontraksiyon düzeyinde kastırılmış retinal arterlerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Tablo 21: İzole sığır retinal arterlerinin normal ($\text{PGF}_{2\alpha}$; $3 \times 10^{-5} \text{M}$) ve düşük ($\text{PGF}_{2\alpha}$; $3 \times 10^{-6} \text{M}$) prekontraksiyon düzeylerinde elde edilen retinaya bağlı gevşeme yanıtlarının oluşma süreleri.

	T1 (dk.)	T2 (dk.)	n	TT(dk.)	n
Normal	6.30±0.93	10.33±1.84	5	16.05±1.52	7
Düşük	4.64±0.54	8.19±1.02	5	12.39±1.30	7

T1: Retinaya bağlı olarak görülen ilk faz gevşeme yanıtının oluşma süresi.

T2: Retinaya bağlı olarak görülen ikinci faz gevşeme yanıtının oluşma süresi.

TT: Retinaya bağlı olarak görülen toplam gevşeme yanıtının (T_{maks}) oluşma süresi.

n: Retinal arter sayısı.

$p > 0.05$: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

4.7. Rho Kinaz Yolağının Rolünün İncelenmesi

Bu grup deneylerde çalışılan retinal arterlerin uzunlukları, prekontraksiyon düzeyleri, iç çap ölçüleri ve birbiriyle uyumluluk göstermektedir (Tablo 22).

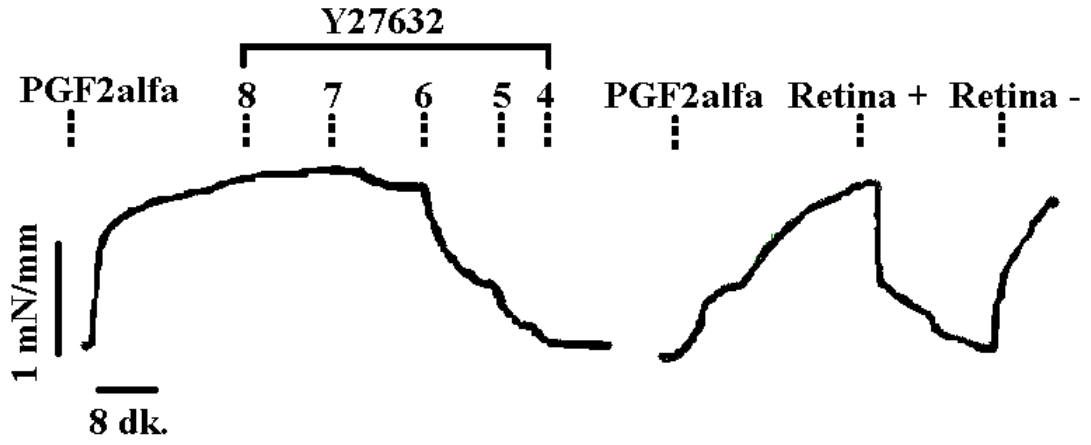
4.7.1. PGF_{2α} ile Prekontrakte Edilen İzole Sığır Retinal Arterlerinde Rho Kinaz İnhibitörü Y27632'nin Etkisi

Prostaglandin F_{2α} (3x10⁻⁵M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerine kümülatif olarak rho kinaz inhibitörü Y27632'nin (10⁻⁸-10⁻⁴M) uygulanması konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtlarına neden olmuştur (Şekil 33, ve 34; Tablo 23). Elde edilen maksimum gevşeme yanıtı düzeyi retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtı ile benzerlik göstermektedir (E_{maks}; Y27632: %98.78 ± 2.58 ve Retina: %94.45 ± 1.57; p>0.05).

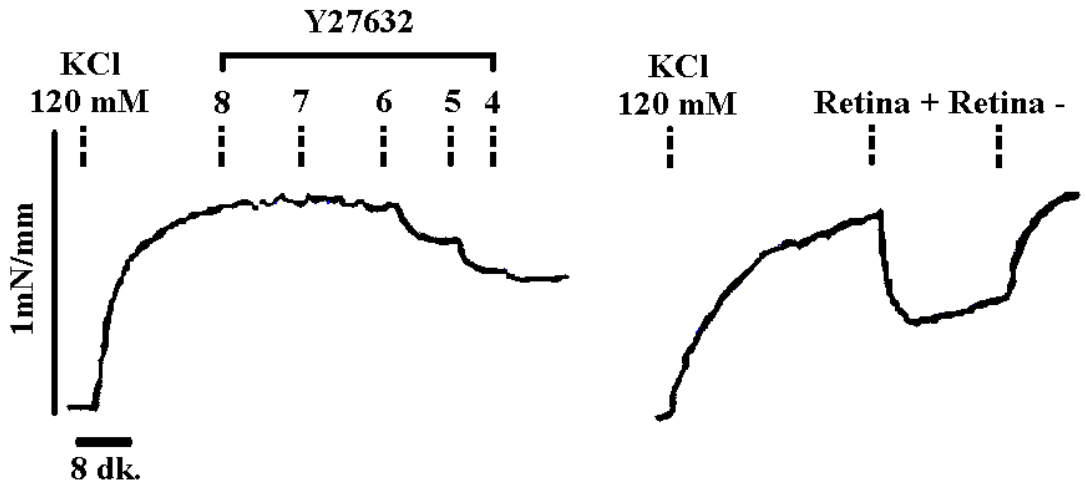
4.7.2. KCl ile Prekontrakte Edilen İzole Sığır Retinal Arterlerinde Rho Kinaz İnhibitörü Y27632'nin Etkisi

Potasyum klorür (120mM) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerine kümülatif olarak rho kinaz inhibitörü Y27632'nin (10⁻⁸-10⁻⁴M) uygulanması konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtlarına neden olmuştur. Ancak, elde edilen gevşetici etkinin maksimum düzeyi PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile prekontrakte edilen retinal arterlerle karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur (Şekil 33 ve 34, Tablo 23). Buna karşın rho kinaz inhibitörü Y27632 ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtı KCl ile prekontrakte edilen retinal arterlerde retinaya bağlı olarak görülen gevşeme yanıtı ile benzerlik göstermektedir (E_{maks}; Y27632: %55.23 ± 5.85 ve Retina: %48.30 ± 2.70; p>0.05).

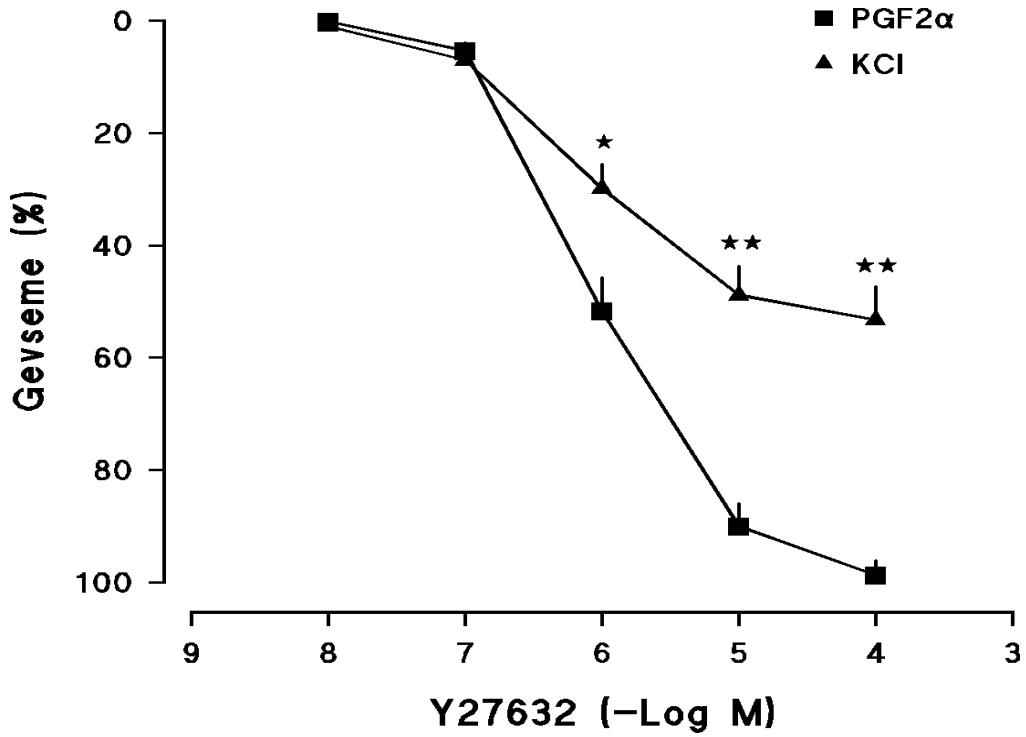
A)



B)



Şekil 33: (A) PGF_{2α} ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ve (B) KCl (120 mM) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde rho kinaz inhibitörü Y27632'nin (10^{-8} - 10^{-4}M) ve retinanın gevşetici etkisi (orijinal trase).



Şekil 34: PGF_{2α} ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ve KCl (120 mM) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde rho kinaz inhibitörü Y27632'nin (10^{-8} - 10^{-4}M) konsantrasyon-yanıt eğrisi.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$: PGF_{2α} ile prekontrakte retinal arterlerde elde edilen gevşemelerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

Tablo 22: PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ve KCl (120mM) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinin uzunlukları, iç çapları ve prekontraksiyon düzeyleri.

	Uzunluk (mm)	İç çap (μm)	Prekontraksiyon (mN/mm)	n
PGF _{2α}	1.60±0.07	223.06±7.01	1.17±0.13	8
KCl	1.63±0.08	217.77±3.89	0.73±0.15	7

n: Retinal arter sayısı

p>0.05: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

Tablo 23: PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ve KCl (120 mM) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde rho kinaz inhibitörü Y27632'nin oluşturduğu maksimum gevşeme yanıtı (E_{maks}) ve pD₂ değerleri.

	pD ₂	E _{maks} (%)	n
PGF _{2α}	5.99±0.10	98.78±2,58	8
KCl	6.07±0.09	55.23±5.85*	7

pD₂: Maksimum kasılma yanıtının %50'sini oluşturan konsantrasyonun (-) logaritma değeri (- log EC₅₀).

E_{maks} : Yüzde (%) cinsinden maksimum gevşeme yanıtı.

n : İzole sığır retinal arter sayısı.

***p<0.0001:** PGF_{2α} ile prekontrakte retinal arterlerde elde edilen gevşeme ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Retinal arterlerin tonüsü retina ve/veya endotel kaynaklı çeşitli vazoaaktif maddeler (nitrik oksit, prostasiklin, endotelin-1 vb.) aracılığıyla lokal olarak düzenlenmektedir (11,12,18,19,29). İzole sığır retinal arterleri ve retinasında yapılan bir çalışmada retinadan yeni bir gevşetici faktörün salıverildiği ve retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde rolünün olabileceği bildirilmiştir (26). Çalışmamızda, yapısı ve etki mekanizması henüz aydınlatılamamış olan bu retina kaynaklı yeni gevşetici faktörün (RRF) etkisini ve muhtemel etki mekanizmasını incelemeyi hedefledik. Elde ettiğimiz bulgular, retinadan retinal arteri gevşeten bir faktörün salıverildiği görüşünü desteklemiş, önceki araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermiş ve retina kaynaklı gevşetici etkinin mekanizmasına ışık tutacak yeni sonuçları ortaya koymuştur.

Çalışmamızda ilk olarak sığır retinal arterinin çeşitli spazmojen ajanlara karşı reaktivitesi, endotel fonksiyonu ve düz kas gevşeme kapasiteleri incelenmiştir. İzole sığır retinal arterlerine kümülatif olarak NA, tromboksan A₂ analogu U46619, ET-1 ve PGF_{2α}'nın uygulanması konsantrasyon-bağımlı kasılma yanıtlarına neden olmuştur. ET-1 ve U46619 ile retinal arterlerde elde edilen maksimum kasılma yanıtlarının, NA ve PGF_{2α} ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği gözlenmiştir. Bununla birlikte ET-1'in, diğer spazmojen ajanlarla, U46619'un ise NA ve PGF_{2α} ile karşılaştırıldığında daha potent olduğu belirlenmiştir. Spazmojen ajanlarla elde ettiğimiz bu bulgular retinal arterin reaktivitesini inceleyen diğer in vitro çalışmaların sonuçları ile uyumluluk göstermektedir (17,25,26,34,82). Bu çalışmalarda da endotelin-1, retinal arterlerin en çok duyarlı olduğu spazmojen ajan olarak tanımlanmıştır. Retinal arterlerin otonom sinir sistemi tarafından innerve edilmediği bilinmektedir (11,12). Ancak izole sığır retinal arterleri üzerinde NA'in diğer spazmojen ajanlara yakın düzeyde kasılma oluşturması retinal arterlerde adrenerjik reseptörlerinin bulunduğunu göstermektedir. Daha önce sığır retinal arterlerinde yapılan bir çalışmada da adrenerjik reseptörlerinin bulunduğu bildirilmiştir (17).

Retinanın etkisi, spazmojen ajanlar ile benzer düzeyde kastırılmış sığır retinal arterlerinde incelenmiştir. Ancak, çalışılan spazmojen ajanlardan NA ile oluşturulan prekontraksiyon düzeyinin stabil kalmadığı gözlenmiştir. NA, 30mM KCl ile kombine edildiğinde ise retinal arterlerde stabil bir prekontraksiyon düzeyi elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, 30 mM KCl'nin retinaya bağlı gevşeme yanıtını değiştirmedığı bildirilmiştir (38). Biz de ön deneylerimizde NA (10^{-4} M) ile KCl 30mM'in kombine (NAK) edilmesinin retinanın gevşetici etkisini değiştirmedığını gözlemledik. Bu nedenle, retinanın NA ile prekontrakte damarlardaki etkisi KCl (30mM) varlığında test edilmiştir. Ayrıca, bu kastırıcı ajanlardan farklı olarak reseptör aracısız bir mekanizma ile kasılma oluşturan KCl (120mM) ile prekontrakte edilen retinal arterlerde de retina dokusunun etkisi incelenmiştir. KCl, retinal arterlerde diğer kastırıcı ajanlara göre daha zayıf bir kasılma yanıtına neden olmaktadır (26). Bizim çalışmamızda da KCl'nin düşük konsantrasyonları retinal arterlerde güçlü bir kasılma yanıtı oluşturmamıştır. Bu nedenle, KCl yüksek konsantrasyonda (120mM) uygulanmış ve böylece diğer spazmojen ajanlar ile benzer düzeyde kasılma yanıtı elde edilmiştir.

Noradrenalin ve potasyum klorür kombinasyonu (NAK), tromboksan A_2 analogu U46619, ET-1 veya $PGF_{2\alpha}$ ile benzer kasılma düzeyine prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterleri üzerine bir parça retina dokusunun yerleştirilmesi akut başlayan ve genellikle bifazik karakter gösteren tam bir gevşeme yanıtına neden olmuştur. Retina kaynaklı gevşetici etkiyi gösteren ilk çalışmalardan farklı olarak bulgularımız, bu gevşetici etkinin iki fazda gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Retinaya bağlı gevşeme yanıtı, retina dokusu retinal arter üzerinden kaldırıldığında tamamen geriye dönmekte ve tekrarlanabilir özellik göstermektedir. Aynı retinanın ilk ve sonraki uygulamaları arasında elde edilen gevşeme yanıtlarının profili, yüzdeleri ve oluşma süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Sıçan (37) ve fare (38) retinalarında yapılan çalışmalarda da retinaya bağlı gevşeme yanıtının tekrarlanabilir özellikte olduğu bildirilmiştir.

Retinaya bağlı gevşeme yanıtı mekanik bir etki sonucunda ortaya çıkmamaktadır. Çünkü, prekontrakte retinal arterler üzerine retina ile benzer büyüklükte koroid dokusunun yerleştirilmesi retina ile benzer profilde ve düzeyde bir gevşetici

etkiye neden olmamıştır. Ayrıca prekontrakte edilen retinal arterler de retina ile her zaman gevşeme yanıtı alınırken koroid ile bazen zayıf bir gevşeme bazen de kasılma yönünde etkiler elde edilmiştir. Retina kaynaklı gevşetici etkiyi gösteren ilk çalışma da koroidin retinal arter üzerindeki etkisinin retinadan farklı olduğunu göstermektedir (26).

Çeşitli spazmojen ajanlarla prekontrakte edilen retinal arterlerde retinaya bağlı gevşeme yanıtları profil ve maksimum açısından farklılık göstermemiştir. Ancak, KCl (120 mM) ile prekontrakte retinal arterlerde retinanın gevşetici etkisinin daha düşük düzeyde ve tek fazlı olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu, RRF'in ortaya konulduğu ilk çalışma ile de uyumluluk göstermektedir (26). NA, U44619, ET-1 ve $PGF_{2\alpha}$, damar düz kasında reseptör aracılı kalsiyum kanallarını, KCl ise yaptığı depolarizasyon sonucu voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını açarak kasılma yanıtı oluşturan spazmojen ajanlardır. KCl ile prekontrakte edilen retinal arterlerde retina kaynaklı gevşetici etkinin daha düşük olması, KCl ile oluşturulan depolarizasyonun retinadan RRF'in serbestlenmesini ve/veya retinal arterlerin RRF'e duyarlılığını azaltmış olabileceğini düşündürmektedir.

Spazmojen ajanlar ile prekontrakte edilen izole sıgır retinal arterleri üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi, akut başlayan ve genellikle 4-6 dakika içinde stabil olan gevşemeye neden olmakta ardından bu ilk faza göre daha uzun sürede sonlanan ve yine hızla başlayan ikinci bir gevşeme fazı oluşturarak kasılmayı tamamen geri çevirmektedir. Çalışmamızda ilk kez ortaya konulan bu bifazik gevşeme profili, retinanın gevşetici etkisini iki farklı mekanizma ya da faktör aracılığıyla gösterdiğini düşündürmektedir. İlginç olarak NAK ile yapılan 7, $PGF_{2\alpha}$ ile yapılan 12, U46619 ile yapılan 6 deneyden birer tanesinde, ET-1 ile yapılan 7 deneyden ise iki tanesinde retinaya bağlı gevşeme yanıtı bifazik karakter göstermemiş ve maksimum gevşeme yanıtı tek fazda meydana gelmiştir. Bu durum çalışmamızın ilerleyen aşamalarında da benzer sıklıkta gözlenmiş ve bazı deneylerde retinaya bağlı gevşeme yanıtı tek fazda elde edilmiştir. Ancak, KCl (120mM) ile prekontrakte edilen retinal arterlerde de retina her zaman tek fazlı bir gevşeme yanıtına neden olmuştur. Çalışmamızda kullandığımız retinal arterler ve retina genellikle aynı bölgeden izole edilerek deneylerin standardize edilmesine özen gösterilmiştir. Ancak, retinaya bağlı gevşeme yanıtının, genellikle iki

faz halinde meydana gelirken bazı dokularda tek fazlı olması, dokusal veya bölgesel varyasyonların olabileceğini de düşündürmektedir.

Retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde NO'nun önemli bir rolünün olduğu ortaya konmuştur (29,30). NO, L-argininden NO sentetaz enzimini aracılığıyla sentez edilmekte ve sentezlenen NO, guanilat siklaz enzimini aktive ederek sGMP aracılığıyla damar düz kasında gevşemeye neden olmaktadır. L-NOARG, NO sentetaz enzimini inhibe etmekte ve NO oluşumunu engellemektedir. ODQ ise guanilat siklazı inhibe ederek sGMP oluşumunu engellemektedir. İzole sıgır retinal arterlerinin ve retina dokusunun NO sentaz inhibitörü L-NOARG ve guanilat siklaz inhibitörü ODQ ile inkübasyonu, retinaya bağlı gevşetici etkide istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu sonuçlar, RRF'in NO'dan farklı olduğunu ve etki mekanizmasında guanilat siklaz enziminin aktivasyonunun rolünün olmadığını düşündürmektedir. Bulgularımız sıgır, sıçan ve fare retinasında yapılan ilk çalışmalar ile de benzerlik göstermektedir (26,37,38).

Retinal arterlerin endotel ve düz kas gevşeme kapasitelerinin zayıf olduğu bildirilmektedir (13,14,15). İzole sıgır retinal arterlerinde Ach ve SNP ile elde ettiğimiz zayıf gevşeme yanıtları da bu görüşü desteklemektedir. Ach ve SNP, sGMP aracılığıyla gevşeme oluşturan sırasıyla, endotel aracılı ve direkt etkili vazodilatör ajanlardır. Sıgır retinal arterlerinde retinanın gevşetici etkisinin bu ajanların etkilerinden farklı olarak tam olması RRF' in etkisinde NO ve guanilat siklaz aracılı mekanizmaların rol almadığı görüşünü desteklemektedir. Ayrıca, retinal arterlerde Ach ve SNP kısmen gevşeme oluştururken, retinanın tam gevşemeye neden olması da RRF' in farklı bir mekanizma ile etki ettiğini göstermektedir.

Vazodilatör prostaglandinlerin izole sıgır retinal arterler üzerine gevşetici etkilerinin olduğu bilinmektedir (25). Retinal arterlerin ve retina dokusunun, siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10^{-5} M) ile inkübasyonunun retinanın gevşetici etkisinde bir değişikliğe neden olmaması, RRF' in prostasiklin gibi siklooksijenaz yolağı ürünü gevşetici bir madde olmadığını göstermektedir (26,37). Ayrıca

prostasiklinin izole sığır retinal arterleri üzerinde gösterilen gevşetici etkisinin (25) retina kaynaklı gevşetici etki ile karşılaştırıldığında daha düşük olması da bu bulgumuzu desteklemektedir.

Retinanın oluşturduğu gevşetici etki deendotelize edilen izole sığır retinal arterlerinde incelenmiş ve maksimum gevşetici etkinin endoteli intakt preparatlarda elde edilen yanıtlardan farklı olmadığı belirlenmiştir. Çalışmamızın bu aşamasında elde ettiğimiz bulgular, retinanın gevşetici etkisinin endotel ile ilgili olmadığını gösteren ve gevşetici faktörün NO ve prostasiklin dışında bir vazodilatör olduğunu bildiren diğer çalışmalar ile de paralellik göstermektedir (26,38,39). Ancak ilginç olarak, deendotelize edilen izole sığır retinal arterlerinde, retinaya bağlı ilk faz gevşeme yanıtının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı, ikinci faz gevşeme yanıtının ise azaldığı gözlenmiştir. Bu nedenle, deendotelize preparatlardaki gevşeme yanıtının fazlarında elde ettiğimiz bu farklılığın başka bir mekanizma ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu arada, deendotelize edilen izole sığır retinal arterlerinde $PGF_{2\alpha}$ ile oluşturulan prekontraksiyon düzeyinin endoteli intakt preparatlarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bunun üzerine, düşük prekontraksiyon düzeyinde kastırılan retinal arterlerde yaptığımız bir grup deneyde, retinaya bağlı gevşeme yanıtının deendotelize damarlardakine benzer bir şekilde değiştiği, ilk fazının arttığı, ikinci fazının ise azaldığı, gözlenmiştir. Bu sonuç, deendotelize retinal arterlerde retinanın gevşetici etkisinde görülen bu değişikliğin prekontraksiyon düzeyinin azalması ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Potasyum kanallarının açılmasının damar düz kasında hiperpolarizasyona neden olarak gevşemeye aracılık ettiği bilinmektedir (44,83-85). Retina kaynaklı gevşetici etkide bu kanalların aktivasyonunun da rol oynayabileceği düşünülmüş ve K^+_{ATP} ve $K^+_{Ca^{++}}$ kanalı inhibitörleri varlığında retinanın etkisi incelenmiştir. Retinal arterler ve retina dokusunun K^+_{ATP} kanalı inhibitörü glibenklamid ve nonspesifik $K^+_{Ca^{++}}$ kanalı inhibitörü, TEA ile inkübasyonu retinanın gevşetici etkisinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır. Bununla birlikte, $K^+_{Ca^{++}}$ kanallarının temelde iki farklı alt tipinin olması (44,48,85), TEA'nın bu kanallara nonspesifik (86) olarak etki göstermesi nedeniyle retinanın gevşetici etkisi $BK^+_{Ca^{++}}$ ile $SK^+_{Ca^{++}}$ kanallarının spesifik

inhibitörleri varlığında incelenmiştir. Retinanın gevşetici etkisinin $BK^{+}_{Ca^{++}}$ kanalı inhibitörü CTX, $SK^{+}_{Ca^{++}}$ kanalı inhibitörü apamin veya CTX ile apaminin kombinasyonu varlığında da değişiklik göstermemesi TEA ile elde edilen bulguları desteklemiştir. Bu bulgular retinanın gevşetici etkisinde K^{+}_{ATP} ve $K^{+}_{Ca^{++}}$ kanallarının aktivasyonunun rolünün olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda retinanın gevşetici etkisinde kalsiyum ile ilişkili mekanizmaların etkisi de ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu amaçla hücre içine kalsiyum girişi, hücre içinde kalsiyum depolanması, düz kasın kalsiyuma karşı duyarlılığı, ekstraselüler kalsiyumun rolü ve kalsiyum duyarlılaşması ile ilişkili mekanizmaların retina kaynaklı gevşetici etkideki olası rolleri araştırılmıştır.

Hücre içine kalsiyum girişine aracılık eden temel mekanizmalardan birisi L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının açılmasıdır (50,51). Bu kanalların kapanması hücre dışından kalsiyum girişini engelleyerek damarlarda gevşemeye neden olmaktadır. Retinanın gevşetici etkisinde bu kanalların kapatılmasının rolü olabileceği düşünülmüş ve bu kanalların spesifik agonisti ya da antogonisti varlığında retinaya bağlı gevşetici etki incelenmiştir. KCl (20mM) ile depolarize edilmiş izole sığır retinal arterlerine kümülatif olarak L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının spesifik agonisti Bay k 8644 (86-88) uygulanması, konsantrasyon-bağımlı kasılma yanıtına neden olmuştur. Retinaya bağlı gevşetici etki, Bay k 8644'ün maksimum kasılma oluşturan konsantrasyonu ile prekontrakte edilen retinal arterlerde incelenmiştir. Bay k 8644 ile prekontrakte edilen retinal arterlerin üzerine retina dokusunun yerleştirilmesi, $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen arterlere benzer şekilde, akut başlayan ve bifazik karakter gösteren tam bir gevşeme yanıtına neden olmuştur. Bu durumda, retinanın gevşetici etkisinin Bay k 8644 ve KCl ile prekontrakte edilmiş retinal arterlerde farklılık gösterdiği görülmektedir. Bay k 8644'ün L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını doğrudan, KCl'nin ise depolarizasyon oluşturarak açtığı bilinmektedir (87,88). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda KCl'nin hem depolarizasyon oluşturarak hem de kalsiyum duyarlılaşmasına neden olarak kasılma oluşturduğu bildirilmiştir (69-72). İlginç olarak, kalsiyumsuz ortamda yaptığımız ön deneylerde Bay k 8644'ün herhangi bir kasılmaya neden olmadığı KCl'nin ise kalsiyum içeren ortamdakine yakın kasılma oluşturduğu

gözlenmiştir (veriler gösterilmemiştir). Bu durum, Bay k 8644 ve KCl'nin retinal arterleri kastırıcı etkisinde farklılıklar olabileceğini, KCl'nin kalsiyum duyarlılaşmasına, Bay k 8644'ün ise ekstrasellüler kalsiyuma bağımlı bir mekanizma aracılığı ile kasılma oluşturduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, gerek retinal arterde gerekse diğer damar yataklarında Bay k 8644 ile oluşturulan kasılmaları sadece bu kanalları kapatarak etki gösteren ajanların değil nitrovazodilatörler gibi başka mekanizmaların aracılığı ile düz kası gevşeten ajanlarında etkin olarak geriye döndürdüğü görülmektedir (87). Buna göre, retinal arterlerde Bay k 8644 ile oluşturulan kasılmanın retina ile tamamen geriye döndürülmesi, RRF'in bu kanalları kapatarak etki gösterdiğini tam olarak ortaya koymamaktadır.

Retinanın gevşetici etkisinde L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının rolü, daha ayrıntılı olarak incelenmek üzere bu kanalların spesifik inhibitörü nifedipin (50,52,89) varlığında incelenmiştir. Retina dokusunun ve retinal arterlerin nifedipin ile inkübasyonu, retinaya bağlı maksimum gevşeme yanıtını değiştirmemiştir. Ancak, gevşeme yanıtının ilk fazında artmaya, ikinci fazında ise azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, nifedipin inkübasyonunun retinal arterlerin $PGF_{2\alpha}$ ile oluşturulan prekontraksiyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olduğu da gözlenmiştir. Düşük prekontraksiyon düzeyinde retinanın gevşetici etkisini incelediğimiz deneylerin sonuçları dikkate alındığında, nifedipin inkübasyonu sonrasında retina yanıtında gözlenen bu değişikliğin prekontraksiyon düzeyinin düşmesiyle ilgili olabileceği görülmektedir. Buna göre bulgularımız, retinanın gevşetici etkisinde L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının bir rolünün olmadığını düşündürmektedir. Bulgularımız sıçan retinasında elde edilen sonuçları (37) desteklemektedir.

Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum, hücre içinde kalsiyum deposu olarak görev yapan bir organeldir. Çeşitli agonistler veya kalsiyum iyonu bu depodan kalsiyum serbestlenmesine neden olarak kasılma oluşturmaktadır. Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum membranında bulunan SERCA pompası ise hücre içindeki kalsiyumun bu organel içinde depolanmasını sağlamaktadır (87,90). Retinanın gevşetici etkisinde SERCA pompasının aktivasyonunun bir rolü olabileceği düşünülmüş ve bu pompanın

spesifik inhibitörü varlığında retinanın etkisi incelenmiştir. Çalışmamızda retina dokusunun ve retinal arterlerin SERCA inhibitörü CPA (87,90) ile inkübasyonu RRF'in gevşetici etkisinde herhangi bir farklılığa neden olmamıştır. Bu bulgu, retinanın gevşetici etkisine bu pompanın aracılık etmediğini göstermekte ve sıçan retinasında yapılan çalışmayı da desteklemektedir (37). Ayrıca, izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak CPA'nın uygulanması retinal arterlerde kasılma yanıtına neden olmamıştır. İzole sığır retinal arterinde SERCA pompasının rolü üzerine yapılmış çalışmalar sınırlıdır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada CPA'nın femoral, mezenterik ve karotid arterlerinde akut başlayan ve hızla geriye dönen bir kasılma yanıtına neden olduğu gösterilmiştir (90). CPA'nın kastırıcı etkisinin karotid arterlerde diğerlerine göre daha düşük olması SERCA'nın karotid arterlerdeki fonksiyonel rolünün femoral ve mezenterik arterler ile karşılaştırıldığında daha düşük olması ile yorumlanmıştır (90). Çalışmamızda, CPA'nın izole sığır retinal arterlerinde herhangi bir kasılmaya neden olmaması, sarkoplazmik retikulumun kalsiyum depolayıcı etkisinin bu arterde düşük olduğunu düşündürmekte ve retinanın gevşetici etkisinde SERCA pompasının rolünün olmadığı görüşünü güçlendirmektedir.

Retinanın gevşetici etkisinde ekstraselüler kalsiyumun önemi de araştırılmıştır. Ekstraselüler kalsiyumun ortamdaki uzaklaştırılması ile retinanın gevşetici etkisinde herhangi bir azalmanın olmadığı gözlenmiştir. Gevşeme yanıtının profili ve maksimum düzeyi, kalsiyumlu ortamda elde edilen kontrolleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır. Bu bulgu, retina kaynaklı gevşetici etkinin ekstraselüler kalsiyuma bağımlı olmadığını ortaya koymaktadır.

Çeşitli vazoaaktif ajanların, düz kasta kontraktıl proteinlerin kalsiyuma karşı duyarlılığını azaltarak gevşemeye neden olduğu bildirilmiştir (91,92). Retina kaynaklı gevşetici faktörün, retinal arterlerde kontraktıl proteinlerin kalsiyuma karşı duyarlılığı azaltarak gevşemeye neden olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle retinal arterlerde, ekstraselüler kalsiyumun yokluğunda, $CaCl_2$ ile oluşturulacak kasılmaların retina varlığındaki değişimi incelenmiştir. Kalsiyumsuz ortamda dengelenirilen ve KCl (20 mM) ile depolarize edilen retinal arterler üzerine kümülatif olarak $CaCl_2$ uygulanması konsantrasyon-bağımlı kasılma yanıtları oluşturken üzerine bir parça retina dokusu

yerleştirilen retinal arterlerde CaCl_2 'nin kastırıcı etkisinin tamamen inhibe olduğu gözlenmiştir. Öte yandan, CaCl_2 ile prekontrakte retinal arterlerin üzerine bir parça retina dokusunun yerleştirilmesi yine, akut başlayan ve bifazik karakter gösteren gevşeme yanıtına neden olmuş ve CaCl_2 kasılmasını tamamen geriye döndürmüştür. Bu bulgular doğrultusunda retinanın, düz kasta kontraktıl proteinlerin kalsiyuma karşı duyarlılığının azaltarak gevşemeye neden olduğu ileri sürülebilir.

Çalışmamızda retina kaynaklı gevşetici etkinin kalsiyum duyarlılaşması ile ilgili mekanizmalardan birisi olan rho kinaz yolağı ile ilişkisi de araştırılmıştır. Rho kinaz enziminin aktivasyonunun düz kaslarda, hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artıştan bağımsız bir mekanizma ile kasılmaya neden olduğu ortaya konmuştur (60,63). Buna bağılı olarak çeşitli çalışmalarda rho kinaz enzimin inhibe edilmesinin düz kaslarda gevşetici etkiye aracılık ettiği gösterilmiştir (64,93). Çalışmamızda, rho kinaz enziminin spesifik inhibitörü Y27632'nin izole sığır retinal arterlerindeki etkisi incelenmiş ve retina kaynaklı gevşetici etki ile karşılaştırılmıştır. $\text{PGF}_{2\alpha}$ veya KCl ile prekontrakte edilen retinal arterler üzerine kümülatif olarak rho kinaz inhibitörü Y27632'nin uygulanması konsantrasyon-bağımlı gevşemelere neden olmuştur. Y27632, retinal arterlerde $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile oluşturulan kasılmaları tamamen, KCl ile oluşturulan kasılmaları ise kısmen geriye döndürmüştür. Y27632'nin retinal arterleri gevşetici etki profiline retinanın gevşetici etkisi ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bu bulgular, retina kaynaklı gevşetici etkinin rho kinaz yolağının inhibisyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak izole sığır retinal arterlerinde yapılan bu çalışma, retinanın gevşetici etkisini ortaya koymaktadır. Bulgularımız retina kaynaklı gevşetici etki gösteren kısıtlı sayıdaki çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermekte ve RRF'in varlığını desteklemektedir. Çalışmamızda özgün olarak, retina kaynaklı gevşetici etkinin bifazik bir karakter gösterdiği ortaya konmuştur. Retinanın gevşetici etkisinde damar endotelinin ve endotel kaynaklı vazoaktif maddelerin rolü incelenmiş ve önceki çalışmalara paralel olarak retina kaynaklı gevşetici etkide, endotelden bağımsız mekanizmanın rol oynadığı ve NO, prostasiklin gibi endojen vazodilatör maddelerin aracılık etmediği gösterilmiştir. Ayrıca, K^+_{ATP} ve $\text{K}^+_{\text{Ca++}}$ kanallarının açılmasının,

SERCA pompasının aktivasyonunun ya da L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının kapanmasının retina kaynaklı gevşetici etkide rol oynamadığı belirlenmiştir. Retina kaynaklı gevşetici etkinin ekstraselüler kalsiyuma ihtiyaç duymadığı gözlenmiş ancak düz kasın kalsiyuma karşı duyarlılığını azalttığı belirlenmiştir. İlginç olarak, retina kaynaklı gevşetici etkinin rho kinaz enzimini inhibe eden bir ajanın oluşturduğu gevşetici etki ile benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz tüm bu bulguların doğrultusunda retinanın retinal arterdeki gevşetici etkisine, düz kasın kontraktıl proteinlerinin kalsiyuma karşı duyarlılığını azaltmasının ve/veya rho kinazı inhibe ederek düz kasta kalsiyum duyarlılaşmasının engellemesinin aracılık ettiği düşünülmektedir. Çalışmamızın bundan sonraki aşamasında, retinanın gevşetici etkisinde rho kinaz ile ilişkili mekanizmaların daha ayrıntılı olarak incelenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışma bilinen vazodilatörlerden farklı bir maddenin retinadan salıverilerek retinal arterlerin tonüsünü regüle ettiğini göstermektedir. Çalışmamızın RRF'in yapısının ve patofizyolojik öneminin araştırılmasına yönelik birçok yeni çalışmaya da aracılık edeceğini düşünmekteyiz. Bu doğrultuda biz de göz ile ilişkili ya da gözü etkileyebilecek diyabet, hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıklarda bu yeni gevşetici faktörün etkinliğini incelemeyi planlamaktayız.

KAYNAKLAR

1. Yıldırım M. *İnsan Anatomisi*. İstanbul: 5. baskı Nobel Kitab Evleri LTD ŞTİ; 2000.
2. Putz R ve Pabst R editörler. *12th English ed. Sobotta Atlas of Human Anatomy*. Münih, Almanya: Williams & Wilkins;1997.
3. Lang G.K. *Türkçe çeviri, Göz hastalıkları El Kitabı-Atlas*. Ankara: Palme Yayıncılık;2001.
4. Riorda-Eva P. içinde Tierney LM, McPhee SJ ve Papadakis MA editörler. *Current Medical Diagnosis & Treatment*. 44th ed. USA; The McGraw-Hill Companies;2005:pp148-177.
5. Trick GL ve Berkowitz BA. Retinal Oxygenation and Retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 2005;**24**:259-274.
6. Hayreh SS. Prevalent Misconceptions About Acute Retinal Vascular Occlusive Disorders. *Prog. Retin. Eye Res.* 2005;**24**:493-519.
7. Hayreh SS, Zimmerman MB, Kimura A ve Sanon A. Central Retinal Artery Occlusion. Retinal Survival Time. *Exp. Eye Res.* 2004;**78**:723-736.
8. Yoneya S, Saito T, Nishiyama Y, Deduchi T, Takasu M, Gil T ve Horn E. Retinal Oxygen Saturation Levels in Patients with Central Retinal Vein Occlusion. *Ophthalmol.* 2002;**109**:1521-1526.
9. Aiello LM. Perspectives on Diabetic Retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 2003;**136**:122-135.
10. Buckley CH, Hadoke PWF ve O'Brien CJ. Use of Isolated Ocular Arteries In Vitro to Define the Pathology of Vascular Changes in Glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* 1997;**81**:599-607.
11. Delaey C ve Van de Voorde J. Regulatory Mechanisms in Retinal and Choroidal Circulation. *Ophthalm. Res.* 2000;**32**:249-256.

12. Yu DY, Su EN, Cringle SJ ve Yu PK. Isolated Preparations of Ocular Vasculature and Their Applications in Ophthalmic Research. *Prog. Retin. Eye Res.* 2003;**22**:135-169.
13. Benedito S, Prieto D, Nielsen PJ ve Nyborg NCB. Role of the Endothelium in Acetylcholine-Induced Relaxation and Spontaneous Tone of Bovine Isolated Retinal Small Arteries. *Exp. Eye Res.* 1991;**52**:575-579.
14. Delaey C ve Van de Voorde J. The Effect of NO Donors on Bovine Retinal Small Arteries and Posterior Ciliary Arteries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998;**39**:1642-1646.
15. Benedito S, Prieto D, Nielsen PJ ve Nyborg NCB. Histamine Induces Endothelium-Dependent Relaxation of Bovine Retinal Arteries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1991;**32**:32-38.
16. Jeppesen P, Aalkjaer C ve Bek T. Bradykinin Relaxation in Small Porcine Retinal Arterioles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002;**43**:1891-1896.
17. Nyborg NCB ve Nielsen PJ. Trombin Contracts Isolated Bovine Retinal Small Arteries In Vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1990;**31**:2307-2313.
18. Haefliger IO, Flammer J, Beny JL ve Lüscher T. Endothelium-Dependent Vasoactive Modulation in the Ophthalmic Circulation. *Prog. Retin. Eye Res.* 2001;**20**:209-225.
19. Brown SM ve Jampol LM. New concepts of Regulation of Retinal Vessel Tone. *Arch. Ophthalmol.* 1996;**114**:199-204.
20. Lee EJ, Kim KY, Gu TH, Moon J-II, Kim, IB, Lee MY ve ark. Neuronal Nitric Oxide Synthase is Expressed in the Axotomized Ganglion Cells of the Rat Retina. *Brain Res.* 2003;**986**:174-180.
21. Berguada A, Scrödl F ve Neuhuber WL. Vasoactive Intestinal and Calcitonin Gene-Related Peptides, Tyrosine Hydroxylase and Nitrergic Markers in the Innervation of the Rat Central Retinal Artery. *Exp. Eye Res.* 2003;**77**:367-374.
22. Ichikawa M, Okada Y, Asai Y, Hara H, Ishi K ve Araie M. Effects of Topically Instilled Bunazosin, an α_1 -Adrenoceptor Antagonist, on Constrictions Induced

- by Phenylephrine and ET-1 in Rabbit Retinal Arteries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004;**45**:4041-4048.
23. Polak K, Luksch A, Frank B, Jandrasits K, Polska E ve Schemetterer L. Regulation of Human Retinal Blood Flow by Endothelin-1. *Exp. Eye Res.* 2003;**76**:633-640.
24. Er H, Evereklioglu C, Cumurcu T, Türköz Y, Özerol E, Şahin K ve Doganay S. Serum Homocysteine Level is Increased and Correlated with Endothelin-1 and Nitric Oxide in Behçet's Disease. *Br J Ophthalmol.* 2002;**86**:653-657.
25. Nielsen PJ ve Nyborg NCB. Contractile and Relaxing Effects of Arachidonic Acid Derivatives on Bovine Retinal Resistance Arteries. *Exp. Eye Res.* 1990;**50**:305-311.
26. Delaey C ve Van de Voorde J. Retinal Arterial Tone is Controlled by a Retinal-Derived Relaxing Factor. *Circ. Res.* 1998;**83**:714-720.
27. Nyborg NCB ve Nielsen PJ. Angiotensin-II Contracts Isolated Human Posterior Ciliary Arteries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1990;**31**:2471-2473.
28. Nyborg NCB, Nielsen PJ, Prieto D ve Benedito S. Angiotensin-II Does Not Contract Bovine Retinal Resistance Arteries In Vitro. *Exp. Eye Res.* 1990;**50**:469-474.
29. Dorner GT, Garhofer G, Kiss B, Polska E, Polak K, Riva C ve Schmetterer L. Nitric Oxide Regulates Retinal Vascular Tone in Humans. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; **285**:H631-H636.
30. Nagaoka T, Sakamoto T, Mori T, Sato E ve Yoshida A. The Effect of Nitric Oxide on Retinal Blood Flow During Hypoxia in Cats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002;**43**:3037-3044.
31. Neufeld A, Hernandez MR, Gonzalez M ve Geller A. Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 in the Human Optic Nerve Head. *Exp. Eye Res.* 1997;**65**:739-745.
32. Gadea A, Lopez E, Hernandez-Cruz A ve Lopez-Colome AM. Role of Ca²⁺ and Calmodulin-Dependent Enzymes in the Regulation of Glycine Transport in Müller Glia. *J. Neurochem.* 2002;**80**:634-645.

33. Boussery K, Delaey C ve Van de Voorde J. Influence of Adrenomedullin on Tone of Isolated Bovine Retinal Arteries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004;**45**:552-559.
34. Prieto D, Benedito S, Nielsen PJ ve Nyborg NCB. Calcitonin Gene-Related Peptide is a Potent Vasodilator of Bovine Retinal Arteries In Vitro. *Exp. Eye Res.* 1991;**53**:399-405.
35. Boussery K, Delaey C ve Van de Voorde J. The Vasorelaxing Effect of CGRP and Natriuretic Peptides in Isolated Bovine Retinal Arteries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005;**46**:1420-1427.
36. Kaley G. Novel Vasodilator Released by Retinal Tissue. *Circ. Res.* 1998;**83**:772-773.
37. Boussery K, Delaey C ve Van de Voorde J. Rat Retinal Tissue Releases a Vasorelaxing Factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002;**43**:3279-3286.
38. Boussery K, Franki AS, Delaey C ve Van de Voorde J. A Vasorelaxing Factor Released From Mouse Retinal Tissue. *Ophthalmic Res.* 2002;**34**:172-177.
39. Delaey C, Boussery K ve Van de Voorde J. A Retinal-Derived Relaxing Factor Mediates the Hypoxic Vasodilation of Retinal Arteries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;**41**:3555-3560.
40. Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP ve Gopalakrishnan M. Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases and Therapeutic Opportunities. *Pharmacol. Rev.* 2000;**52**:55-593.
41. Jackson WF. Ion Channels and Vascular Tone. *Hypertension* 2000;**35**:173-178.
42. Thorneloe KS ve Nelson MT. Ion Channels in Smooth Muscle: Regulators of Intracellular Calcium and Contractility. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2005;**83**:215-242.
43. Nelson MT ve Quayle JM. Physiological Roles and Properties of Potassium Channels in Arterial Smooth Muscle. *Am. J. Physiol.* 1995;**268**:C799-C822.
44. Ding H ve Triggle CR. Contribution of EDHF and Role of Potassium Channels in the Regulation of Vascular Tone. *Drug Develop. Res.* 2003;**58**:81-89.

45. Kaczorowski GJ ve Garcia ML. Pharmacology of Voltage-Gated and Calcium-Activated Potassium Channels. *Current Op. Chem. Bio.* 1999;**3**:448-458.
46. Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X ve O'Rourke ST. Large-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels: Structural and Functional Implications. *Pharmacol. Ther.* 2006;**110**:103-116.
47. McNeish AJ, Wilson WS ve Martin W. Dominant Role of an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)-Like Vasodilator in the Ciliary Vascular Bed of the Bovine Isolated Perfused Eye. *Br. J. Pharmacol.* 2001;**134**:912-920.
48. Quignard JF, Feletou M, Edwards G, Duhault J, Weston AH ve Vanhoutte PM. Role of Endothelial Cell Hyperpolarization in EDHF-Mediated Responses in the Guinea-Pig Carotid Artery. *Br. J. Pharmacol.* 2000;**129**:1103-1112.
49. Quayle JM, Nelson MT ve Standen NB. ATP-Sensitive and Inwardly Rectifying Potassium Channels in Smooth Muscle. *Physiol. Rev.* 1997;**77**:1165-1232.
50. Orallo F. Regulation of Cytosolic Calcium Levels in Vascular Smooth Muscle. *Pharmacol. Ther.* 1996;**69**:153-171.
51. Karakı H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano KI, Harada KI ve ark. Calcium Movements, Distribution and Functions in Smooth Muscle. *Pharmacol. Rev.* 1997;**49**:157-230.
52. Mooren FC ve Kinne RKH. Cellular Calcium in Health and Disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998;**1406**:127-151.
53. Laporte R ve Laher I. Sarcoplasmic Reticulum-Sarcolemma Interactions and Vascular Smooth Muscle Tone. *J. Vasc. Res.* 1997;**34**:325-343.
54. Triggle DJ. The Pharmacology of Ion Channels: With Particular Reference to Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. *E. J. P.* 1999;**375**:311-325.
55. McFadzean I ve Gibson A. The Developing Relationship Between Receptor-Operated and Store-Operated Calcium Channels in Smooth Muscle. *Br. J. Pharmacol.* 2002;**135**:1-13.
56. Hermsmeyer K ve Miyagawa K. Novel Concepts in Ca⁺⁺ Channel Selectivity. *J. Hypertens.* 1997;**15**:S5-S10.

57. Johnson D ve Snyder CH. Calcium Regulation of Smooth Muscle Contractile Proteins. *Adv. Sec. Messeng. Phosphopro. Res.* 1995;**30**:153-174.
58. Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I ve Kitabatake A. Thapsigargin and Cyclopiazonic Acid Induced Endothelium-Dependent Hyperpolarization in Rat Mesenteric Artery. *Br. J. Pharmacol.* 1995;**115**:987-992.
59. Somlyo AP ve Somlyo AV. Signal Transduction and Regulation in Smooth Muscle. *Nature* 1994;**372**:231-236.
60. Somlyo AP ve Somlyo AV. Signal Transduction by G-Proteins, Rho-Kinase and Protein Phosphatase to Smooth Muscle and Non-muscle Myosin II. *J. Physiol.* 2000;**522**:177-185.
61. Somlyo AP ve Somlyo AV. Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G-Proteins, Kinases and Myosin Phosphatase. *Physiol. Rev.* 2003;**83**:1325-1358.
62. Nobe K ve Paul RJ. Distinct Pathways of Ca²⁺ Sensitization in Porcine Coronary Artery Effects of Rho-Related Kinase and Protein Kinase C Inhibition on Force and Intracellular Ca²⁺. *Circ. Res.* 2001;**88**:1283-1290.
63. Fukata Y, Amano M ve Kaibuchi K. Rho-Rho-Kinase Pathway in Smooth Muscle Contraction and Cytoskeletal Reorganisation of Non-Muscle Cells. *TRENDS. Pharmacol. Sci.* 2001;**22**:32-39.
64. Martinez MC, Randriamboavonjy V, Ohlmann P, Komasa N, Duarte J, Schneideler F ve ark. Involvement of Protein Kinase C, Tyrosine Kinases and Rho kinase in Ca²⁺ Handling of Human Small Arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000;**279**:H1228-H1238.
65. Ito K, Shimomura E, Iwanaga T, Shiraishi M, Shindo K, Nakamura J ve ark. Essential Role of Rho Kinase in the Ca²⁺ Sensitization of Prostaglandin F_{2α}-Induced Contraction of Rabbit Aortae. *J. Physiol.* 2003;**546**:823-836.
66. Buus CL, Aalkjaer C, Nilsson H, Juul B, Møller JV ve Mulvany MJ. Mechanisms of Ca²⁺ Sensitization of Force Production by Noradrenaline in Rat Mesenteric Small Arteries. *J. Physiol.* 1998;**510**:577-590.

67. Shimokawa H ve Takeshita A. Rho-kinase is Important Therapeutic Target in Cardiovascular Medicine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;**25**:1767-1775.
68. Rolfe BE, Worth NF, World CJ Campbell JH ve Campbell GR. Rho and Vascular Disease. *Atherosclerosis* 2005;**183**:1-16.
69. Ratz PH, Berg KM, Urban NH ve Miner AS. Regulation of Smooth Muscle Calcium Sensitivity: KCl as a Calcium-Sensitizing Stimulus. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005;**288**:C769-C783.
70. Urban NH, Berg KM, ve Ratz PH. K⁺ Depolarization Induces RhoA Kinase Translocation to Caveolae and Ca²⁺ Sensitization of Arterial Muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003;**285**:C1377-C1385.
71. Ratz PH. Dependence of Ca²⁺ Sensitivity of Arterial Contractions on History of Receptor Activation. *Am. J. Physiol.* 1999;**277**:H1661-H1668.
72. Sakurada S, Takuwa N, Sugimoto N, Wang Y, Seto M, Sasaki Y ve Takuwa Y. Ca²⁺ Dependent Activation of Rho and Rho Kinase in Membrane Depolarization-Induced and Receptor Stimulation-Induced Vascular Smooth Muscle Contraction. *Circ. Res.* 2003;**93**:548-556.
73. Wettschureck N ve Offermanns S. Rho/Rho-Kinase Mediated Signaling in Physiology and Pathophysiology. *J. Mol. Med.* 2002;**80**:629-638.
74. Hirooka Y ve Shimokawa H. Therapeutic Potential of Rho-Kinase Inhibitors in Cardiovascular Diseases. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 2005;**5**:31-39.
75. Budzyn K, Marley PD ve Sobey CG. Targeting Rho and Rho-Kinase in the Treatment of Cardiovascular Disease. *TRENDS. Pharmacol. Sci.* 2006;**27**:97-104.
76. Nyborg NCB, Baandrup U, Mikkelsen EO ve Mulvany MJ. Active, Passive and Myogenic Characteristics of Isolated Rat Intramural Coronary Resistance Arteries. *Pflügers Arch.* 1987;**410**:664-670.
77. Nyborg NCB ve Nielsen PJ. The Level of Spontaneous Myogenic Tone in Isolated Human Posterior Ciliary Arteries Decreases With Age. *Exp. Eye Res.* 1990;**51**:711-715.

78. Delaey C ve Van de Voorde J. Pressure-Induced Myogenic Responses in Isolated Bovine Retinal Arteries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;**41**:1871-1875.
79. Mulvany MJ ve Halpern W. Contractile Properties of Small Arterial Resistance Vessels in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats. *Circ. Res.* 1977;**41**:19-26.
80. Nunes HPL ve Guimaraes S. The Influence of the Wall Tension on the Contractile Responses of Arteries. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1999;**13**:193-197.
81. Delaey C, Boussery K ve Van de Voorde J. Contractility Studies on Isolated Bovine Choroidal Small Arteries: Determination of Active and Passive Wall Tension-Internal Circumference Relation. *Exp. Eye Res.* 2002;**75**:243-248.
82. Nyborg NCB, Prieto D, Benetido S B ve Nielsen PJ. Endothelin-1 Induced Contraction of Bovine Retinal Small Arteries Is Reversible and Abolished by Nitrendipine. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1991;**32**:27-31.
83. Reslerova M ve Loutzenhiser R. Divergent Mechanisms of ATP-Sensitive K⁺ Channel-Induced Vasodilation in Renal Afferent and Efferent Arterioles. *Circ. Res.* 1995;**77**:1114-1120.
84. Khan SA, Mathews WR ve Meisheri KD. Role of Calcium-Activated K⁺ Channels in Vasodilation Induced by Nitroglycerine, Acetylcholine and Nitric Oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993;**267**:1327-1335.
85. Dong H, Waldron GJ, Cole WC ve Triggle CR. Roles of Calcium-Activated and Voltage-Gated Delayed Rectifier Potassium Channels in Endothelium-Dependent Vasorelaxation of the Rabbit Middle Cerebral Artery. *Br. J. Pharmacol.* 1998;**123**:821-832.
86. Cox RH, Lozinskaya I, Matsuda K ve Dietz NJ. Ramipril Treatment Alters Ca²⁺ and K⁺ Channels in Small Mesenteric Arteries From Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats. *Am. J. Hypertens.* 2002;**15**:879-890.
87. Asano M ve Nomura Y. Ca²⁺ Buffering Action of Sarcoplasmic Reticulum on Bay k 8644-Induced Ca²⁺ Influx in Rat Femoral Arterial Smooth Muscle. *E.J.P.* 1999;**366**:61-71.

88. Eatman D, Stallone JN, Rutecki GW ve Whittier FC. Sex Differences in Extracellular and Intracellular Calcium-Mediated Vascular Reactivity to Vasopressin in Rat Aorta. *E. J. P.* 1998;**361**:207-216.
89. Tanko LB, Simonsen U, Frobert O, Gregersen H, Bagger JP ve Mikkelsen EO. Vascular Reactivity to Nifedipine and Ca^{2+} In Vitro: The role of Preactivation, Wall Tension and Geometry. *E. J. P.* 2000;**387**:303-312.
90. Nomura Y ve Asano M. Ca^{2+} Uptake Function of Sarcoplasmic Reticulum During Contraction of Rat Arterial Smooth Muscle. *E.J.P.* 2000;**404**:315-326.
91. Buluc M ve Demirel-Yılmaz E. Resveratrol Decreases Calcium Sensitivity of Vascular Smooth Muscle and Enhances Cytosolic Calcium Increase in Endothelium. *Vasc. Pharmacol.* 2006;**44**:231-237.
92. Pacher P, Ungvari Z, Kecskemeti V ve Koller A. Serotonin Reuptake Inhibitor, Fluoxetine, Dilates Isolated Skeletal Muscle Arterioles. Possible Role of Altered Ca^{2+} Sensitivity. *Br. J. Pharmacol.* 1999;**127**:740-746.
93. Ito K, Shimomura E, Iwanaga T, Shiraishi M, Shindo K, Nakamura J ve ark. Essential Role of Rho Kinase in the Ca^{2+} Sensitization of Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Induced Contraction of Rabbit Aortae. *J. Physiol.* 2003;**546**:823-836.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Selçuk	Soyadı	Takır
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	09/02/1976
Uyruğu	TC	TC Kim No	34684514386
Email	stakir@istanbul.edu.tr	Tel	212 527 18 25 (iş) 212 553 62 38 (ev)

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji	2006
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji	2000
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	1998
Lise	Ankara Atatürk Anadolu Lisesi	1993

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görv.	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji	1998-devam ediyor
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		
Almanca	Orta	Zayıf	Zayıf		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	64.468		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office	Çok iyi

Yayımları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası Makaleler:

- Relaxant Effects of Pravastatin, Atorvastatin and Cerivastatin on Isolated Rat Aortic Rings. B. Sönmez Uydeş-Doğan, Gökçe Topal, **Selçuk Takır**, F. İlkay Alp, Deniz Kaleli, Osman Özdemir. *Life Sci.* 2005; **76**:1771-1776.
- The Comparison of the Relaxant Effects of Two Methoxylated Flavones in Rat Aortic Rings. B. Sönmez Uydeş-Doğan, **Selçuk Takır**, Osman Özdemir, Ufuk Kolak, Gülçatı Topçu, Ayhan Ulubelen. *Vasc. Pharmacol.* 2005;**43**: 220-226.

Ulusal Makaleler:

- Statin Türevi Hipolipidemik İlaçlar **Selçuk Takır**. Havan Eczacılık Dergisi. 2000;**2**:30-32.

Yazım Aşamasında Olan Çalışmalar:

- The Effects of Hypoxia on Human Isolated Bypass Graft Materials Internal Mammary Artery (IMA), Radial Artery and Saphenous Vein (SV).
- The Effects of Atorvastatin on Human Isolate Bypass Graft Materials Internal Mammary Artery (IMA) and Saphenou Vein (SV).
- The Effects of Newly Found Retina Derived Relaxant Factor (RRF) on Isolated Bovine Retinal Artery; It's Relationship With Nitric Oxide and Cylooxygenase Pathway.
- The Effects of Newly Found Retina Derived Relaxant Factor (RRF) on Isolated Bovine Retinal Artery; It's Relationship With Ca⁺⁺ and K⁺ Channels.

Sözlü Sunumları:

- Effects of L-type Calcium Channel blokade and Removal of Extracellular Ca^{++} on Retina Induced Relaxation in Bovine Retinal arteries. **S Takır**, B.S. Uydeş-Doğan, O. Özdemir. 11th International Vascular Neuroeffector Mechanisms and Cardiovascular Pharmacology and Medicine Symposia, Shanghai-Suzhou 26-29 June 2006. Abstract Book ;p16.

Poster Sunumları:**Uluslararası:**

- Retina Derived Relaxations are not Mediated by K^+_{ATP} and $K_{Ca^{++}}$ Channels in Isolated Bovine Retinal Arteries. **S Takır**, B.S. Uydeş-Doğan, O. Özdemir. XVth World Congress of Pharmacology 2-7 July 2006, Beijing, China. Acta Pharmacologica Sinica Abstract Book. 2006; suppl. 1:p172..
- Retinal Tissue Produces Acute and Bifasic Relaxations on Isolated Bovine Retinal Arteries. **S Takır**, B.S. Uydeş-Doğan, O. Özdemir. Symposium on Mechanisms of. Vasodilation and EDHF. Antwerp, Belgium, May 31-June 4, 2005. J Vascular Research Vol 42, Suppl 1, 2005, Abstract Book; P 79.
- Do Prostacyclin Release or K_{ATP} Channel Activation Play a Role in the Altered Responsiveness of Human Isolated IMA Under Hypoxia? **S.Takır**, B.S. Uydeş Doğan, M.Güden, E.Sağbaş, B.Akpınar, O. Özdemir. 12th International Conference on Advances in Prostaglandin, Leucotriene and Other Bioactive Lipid Research Basic Science and Clinical Applications Istanbul Turkey August 25-29 2002 Abstract Book p 99.
- The Investigation of Vascular Effects of Salvigenin on Isolated Rat Aorta. O. Özdemir, **S. Takır**, S.U. Doğan, U. Kolak, G. Topçu. 62th Congress of FIP. Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 31 August-5 September 2002 Nice France Abstract Book MCN – P-081 p 37.
- Responsiveness of Human Isolated Arterial Bypass Grafts to Vasodilator and Vasoconstrictor Substances in Hypoxia. B.S. Uydeş-Doğan, **S. Takır**, B. Akpınar, T. Terzioğlu, M Güden, E.Sağbaş, O. Özdemir. Vascular Endothelium;

Source and Target of Inflammatory Mediators June 24-July 3 2000. Crete, Greece. NATO Science Series. Series: Life and Behavioural Sciences –Vol330 p387.

- Relaxing Effects of HMG CoA Reductase Inhibitor Atorvastatin on Isolated Rat Aorta. G. Topal, B.S. Uydeş Doğan, **S. Takır**, O. Özdemir. Vascular Endothelium; Source and Target of Inflammatory Mediators June 24-July 3 2000. Crete, Greece. NATO Science Series. Series: Life and Behavioural Sciences –Vol330 p385.
- The Effects of HMG CoA Reductase Inhibitor Atorvastatin on Human Isolated Bypass Graft Materials. B.S. Uydeş Doğan, **S. Takır**, M. Güden, B. Akpınar, E. Sağbaş, O. Özdemir. Nitric Oxide; Basic Research and Clinical Applications 7-17 September 2000. Erice, Italy. NATO Science Series. Series A: Life Sciences –Vol.317 p 201.
- Effects of Hypoxia on the Vascular Reactivity of Human Internal Mammary Artery. O. Özdemir, B. Akpınar, **S. Takır**, B.S. Uydeş Doğan. Fundamental & Clinical Pharmacology p 168s (PS156) Vol. 13/Suppl 1 1999, 2nd European Congress of Pharmacology Budapest, Hungary 3-7 July 1999.
- Vascular Effects of Pravastatin and Simvastatin on Human Isolated Internal Mammary Artery and Saphenous Vein. B.S. Uydeş Doğan, **S. Takır**, B. Akpınar, O. Özdemir. Fundamental & Clinical Pharmacology p 241s (PM166) Vol. 13/Suppl 1 1999. 2nd European Congress of Pharmacology Budapest, Hungary 3-7 July 1999.

Ulusal:

- Retinal Gevşetici Faktörün Etkisinde Nitric Oksit ve Siklooksijenaz Yolağının Rolünün İncelenmesi. **S.Takır**, B.S. Uydeş Doğan, O. Özdemir. 18. Türk Farmakoloji Derneği Kongresi. 28 Eylül-1 Ekim 2005, İzmir/Türkiye. Özet Kitabı; p127.

- Hipoksinin Koroner Bypass Graft Materyalleri Üzerinde Etkilerinin İncelenmesi **S.Takır**, B.S. Uydeş Doğan, B. Akpınar, T. Terzioğlu, M. Güden, E. Sağbaş, O. Özdemir. 15. Türk Farmakoloji Derneği Kongresi. 1-5 Eylül 1999 Manavgat, Antalya/ Türkiye. Özet Kitabı; p 08-34.
- HMG KoA Redüktaz İnhibitörü Pravastatinin İzole Sıçan Aortası Üzerinde Etkilerinin İncelenmesi. A. Eraslan, B.S. Uydeş Doğan, **S. Takır**, O. Özdemir. 15. Türk Farmakoloji Derneği Kongresi. 1-5 Eylül 1999 Manavgat, Antalya/ Türkiye. Özet Kitabı; p 08-33.

Kongre ve Sempozyum Katılımları:

- XVth World Congress of Pharmacology 2-7 Temmuz 2006, Pekin, Çin Halk Cumhuriyeti.
- 11th International Vascular Neuroeffector Mechanisms and Cardiovascular Pharmacology and Medicine Symposia. 26-29 Haziran 2006, Şangay-Suzhou Çin Halk Cumhuriyeti.
- Symposium on Mechanisms of. Vasodilation and EDHF. 31 Mayıs - 4 Haziran, 2005, Antwerp, Belçika.
- 18. Türk Farmakoloji Derneği Kongresi. 28 Eylül-1 Ekim 2005 İzmir/ Türkiye.
- 12th International Conference on Advances in Prostaglandin, Leucotriene and Other Bioactive Lipid Research: Basic Science and Clinical Applications İstanbul Türkiye 25-29 Ağustos 2002.
- 3rd EPSA Summer University, Haziran 2001, İstanbul/Türkiye.
- 15. Türk Farmakoloji Derneği Kongresi. 1-5 Eylül 1999 Manavgat, Antalya/ Türkiye.