

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİTRO VE İN SİTU VASKÜLER MODELLERDE VAZOAKTİF
MADDELER İLE OLUŞTURULAN KONSANTRASYON-YANIT
İLİŞKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

102785

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DENEYİM MANTASYON MERKEZİ

Farmakoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eczacı Yasemin TULUM

Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. Metiner TOSUN

İZMİR-2001

ÖNSÖZ

Araştırmamın gerçekleşmesi için her türlü olanağı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Aslı Özer'e,

Çalışmalarımın her aşamasında sonsuz sabrı, değerli bilgi ve yardımlarıyla beni her konuda yönlendiren ve destekleyen tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Metiner Tosun'a,

Tezimin oluşumunda yardımlarını esirgemeyen başta Prof. Dr. Levent Üstünes olmak üzere tüm değerli hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
I. Genel: Vasküler tonusun düzenlenmesi	3
A. Ca⁺²-kontraksiyon keneti	4
1. Elektromekanik kenetlenme	4
2. Farmakomekanik kenetlenme	6
B. İntraselüler kalsiyum konsantrasyonundaki değişimlerden bağımsız vasküler düz kas kontraksiyonu mekanizması	8
C. Çapraz köprü hareketinin direkt regülasyonu	10
D. Kalsiyum duyarlığında artış ve azalma	12
II. İntraselüler kalsiyum iyonunun kaynağı	13
A. İyon kanalları	13
B. Na⁺/Ca²⁺ değiştokuşu	16
C. Sarkoplazmik retikulum	17
D. Mitokondri	19
III. Nonkontraktil inraselüler kompartman	19
DENEYSEL BÖLÜM	21
I. Materyal ve yöntem	21
A. Tavşan perfüze tüm kulak preparatı (PTK)	21
B. Perfüze merkezi arter (PMA)	23
C. İzole merkezi arter (İMA)	23
D. Araştırmada kullanılan ilaçlar	27

E. İlaç çözeltilerinin hazırlanması	27
F. Fizyolojik tuz çözeltileri	29
G. İstatistiksel Analiz	29
BULGULAR	30
I. İn situ (PTK ve PMA preparatı) ve in vitro (İMA) deney modellerinde agoniste bağlı kademeli konsantrasyon-yanıt ilişkisinin incelenmesi	30
A. PTK preparatında NA konsantrasyon-yanıt ilişkisi	30
B. PMA preparatında NA konsantrasyon-yanıt ilişkisi	33
C. İMA preparatında NA konsantrasyon-yanıt ilişkisi	33
II. Sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} pompasının (SR Ca^{+2} -ATPaz) inhibisyonunun tavşan İMA kontraksiyonlarındaki rolü	37
A. CPA'nın KCl yanıtlarına etkisi	37
B. CPA'nın NA yanıtlarına etkisi	39
C. CPA'nın 5-HT yanıtlarına etkisi	39
TARTIŞMA VE SONUÇ	45
I. İn situ (PTK ve PMA preparatı) ve in vitro (İMA) deney modellerinde agoniste bağlı kademeli konsantrasyon-yanıt ilişkilerinin incelenmesi	45
II. SR Ca^{+2} -ATPaz inhibisyonunun tavşan İMA kontraksiyonlarındaki rolü	47
ÖZET	52
SUMMARY	54
KAYNAKLAR	56
KISALTMALAR	62

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1	Düz kasta kasılma-gevşeme olaylarının, miyozin fosforilasyon/defosforilasyonu ile düzenlenmesi	5
Şekil 2	Düz kasta elektromekanik kenetlenme mekanizmaları	7
Şekil 3	Düz kasta farmakomekanik kenetlenme mekanizmaları	9
Şekil 4	Kalsiyum iyonundan bağımsız PKC aracılığı ile gerçekleşen kontraksiyon	11
Şekil 5	Miyozin fosforilasyonunda Ca^{+2} duyarlılığının değişim mekanizmaları	14
Şekil 6	İzole perfüze kulak preparatının şeması	22
Şekil 7	Perfüze tüm kulak preparatında Fenilefrin (FE)-Asetilkolin (Ach) konsantrasyon-yanıt ilişkisini gösteren bir deney kaydı	24
Şekil 8	Perfüze tüm kulak preparatında (PTK) endotelsizleştirme sonucu oluşturulan FE-ACh konsantrasyon-yanıt ilişkisini gösteren bir deney kaydı	25
Şekil 9	PTK preparatında NA konsantrasyon-yanıt ilişkisi	31
Şekil 10	PTK preparatında endotel varlığında (E+), NOS inhibisyonunda (+L-NNA) ve endotel yokluğunda (E-) NA yanıtları	32
Şekil 11	PMA preparatında NA konsantrasyon-yanıt ilişkisi.	34
Şekil 12	PMA preparatında endotel varlığında (E+), NOS inhibisyonunda (+L-NNA) ve endotel yokluğunda (E-) NA yanıtları (mmHg)	35
Şekil 13	PTK, PMA ve İMA preparatlarında NA konsantrasyon-yanıt ilişkisi	36
Şekil 14	İMA preparatında KCl kontraksiyonu üzerine verapamilin etkisini gösteren deney kaydı	38

Şekil 15: İMA preparatında KCl kontraksiyonu üzerine CPA'nın ve verapamilin (VER) etkilerini gösteren bir deney kaydı	41
Şekil 16: İMA preparatında NA kontraksiyonu üzerine CPA'nın ve verapamilin etkilerini gösteren bir deney kaydı	42
Şekil 17: İMA preparatında 5-HT kontraksiyonu üzerine CPA'nın ve verapamilin (VER) etkilerini gösteren bir deney kaydı	43
Şekil 18: KCl (30mM), NA (100 nM) ve 5-HT (300 nM) maksimum plato kontraksiyon yanıtları üzerine CPA'nın etkisi	44
Şekil 19 Vasküler düz kas hücresinde reseptör-efektör sistemlerinin sitozolik kompartmanlarla olan ilişkisini öneren model	48



GİRİŞ

Aynı bireyde farklı dokularda bulunan vasküler düz kas hücrelerinde reseptör dağılımları ve reseptör alttıplerindeki farklılıklar nedeniyle vasküler tonusunu düzenleyen mekanizmaların çeşitliliği aynı ajana karşı farklı damar yataklarında değişik yanıtların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bunlara ek olarak, farklı çaptaki damarların hücresel morfolojileri de farklılık göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı, periferik damarlar üzerinde etkinlik gösteren ilaçların etkilerinin araştırılmasında, periferik sistemi en iyi temsil edebilen bir modelin avantajları yanında olası eksikliklerinin bilinerek kullanılması önem kazanmaktadır. Tüm bunlara ek olarak, istenmeyen periferik vazospastik olguların dolaşım sisteminin bütünlüğünü olumsuz açıdan etkilemesi nedeniyle periferdeki damar düz kas hücrelerinde bulunan mekanizmaların tam olarak açıklığa kavuşması önemlidir. Özetle, bu tez çalışmasının genel amacı aşağıdaki iki sorunun yanıtlanması doğrultusundadır:

1) Periferik damar sistemini arterlerden venlere kadar bir bütün olarak temsil edebilme özelliği taşıyan izole perfüze tavşan kulak preparatı basit ve güvenilir bir deney modeli midir?

Vazoaktif bir ajan olan noradrenalinin konsantrasyon-yanıt verileri doğrultusunda arterlerden venlere kadar tüm periferik vasküler sistemi içeren perfüze kulak preparatı ile venöz dönüşü elimine edilmiş ancak yine bir *in situ* preparat olan perfüze merkezi kulak arter preparatı endotelli, nitrik oksit sentezi inhibe edilmiş veya endotelsizleştirilmiş koşullarda test edilmektedir. Ayrıca, bu iki preparat kullanılarak elde edilen veriler organ banyoları kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalarda elde edilen yanıtlarla karşılaştırılmaktadır.

2) Periferik bir damar olan tavşan merkezi kulak arterinde kapasitatif Ca^{+2} girişi kontraksiyonla kenetli midir?

Sıçan torasik aortası gibi büyük bir arterde fonksiyonel varlığı gösterilmiş olan kontraktıl aparat içermeyen ve sınırları sıkı bir şekilde korunmuş subsarkolemmal kompartmanların periferik bir damarda da işlevsel olup olmadığı bu çalışmada araştırılmaktadır.



GENEL BİLGİLER

Damar düz kasının kontraksiyonu intraselüler kalsiyum konsantrasyonu ($[Ca^{+2}]_i$) ve kontraktıl elementlerin Ca^{+2} duyarlılığındaki değışiklikler ile düzenlenir. $[Ca^{+2}]_i$ ise humoral ve mekanik faktörlerle kontrol edilir. Normal fizyolojik koşullar altında duyarlı bir şekilde damar duvar bütünlüğünü sağlayan ve kan basıncındaki patolojik yükselmelere engel olan sözkonusu faktörler anormal koşullarda istenmeyen vazospazmla ilişkili olguların (hipertansiyon, angina pectoris, konjestif kalp yetmezliği, ateroskleroz, Raynoud hastalığı, felç gibi) ortaya çıkmasına neden olur. Humoral faktörler ve intraselüler sinyal iletimindeki artış vazospastik olguların oluşumunun ve sürekliliğinin sağlanmasında önemli bir rol oynayan damar duvarı kalınlığının ve vasküler gerilimin artmasına neden olur. Oksidatif stresin yanı sıra birbiriyle etkileşen birden fazla faktör vasküler düz kas hücrelerinin kasılma ve çoğalmasını modüle eden kompleks sinyal yollarını uyarır.

I. Genel: Vasküler tonusun düzenlenmesi

İntraselüler serbest kalsiyum iyon konsantrasyonunun ve kontraktıl elementlerin kalsiyum iyonuna olan duyarlılığındaki değışikliklerin kontrol edildiğı vasküler tonusun ayarlanmasında iki aşama gözlenir. İlk aşamada nörotransmitter ve hormonlar gibi endojen maddelerin spesifik reseptörleri ile etkileşmesi sonucu farklı iyon kanalları ve enzimlere kenetli olan GTP-bağlayıcı G proteinlerinin çeşitli tipleri aktive olur. İkinci aşama $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerini ayarlayan mekanizmaları içerir. Vasküler düz kas hücresinde $[Ca^{+2}]_i$ artışındaki ana mekanizma ekstraselüler kalsiyumun hücre içine girişidir. Bu mekanizma voltaja duyarlı L-tipi Ca^{+2} kanalları, nonselektif katyon kanalları, intraselüler Ca^{+2} depolarından Ca^{+2} salıverilişinin aktive ettiği Ca^{+2} girişi (kapasitatif Ca^{+2} girişi) ve Na^+/Ca^{+2} değıştokuşçusunu içerir. Sarkoplazmik retikulumdan (SR) Ca^{+2} salıverilişi de hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu artırır. İntraselüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki azalmada

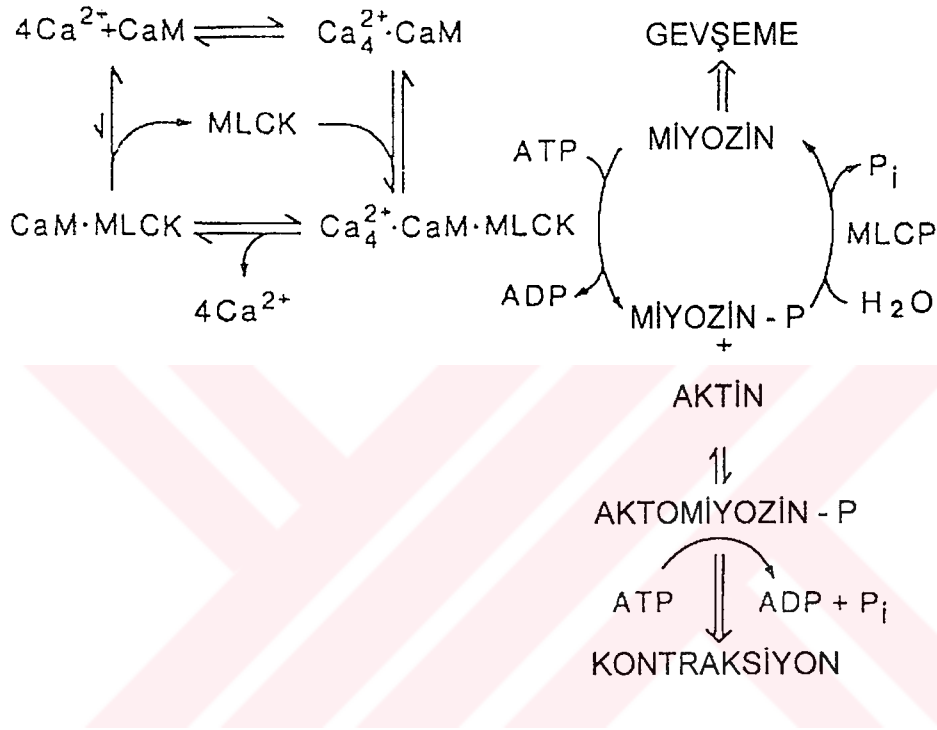
SR Ca^{+2} sekestrasyonu ve membran Ca^{+2} pompaları, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiştokuşçusu ile kalsiyum iyonunun hücre dışına atılımı rol oynar. İkinci ulaklar (IP_3 , DAG, cAMP ve cGMP) bu mekanizmaları etkileyerek intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunu değiştirir.

A. Ca^{+2} -kontraksiyon keneti

Damar düz kas tonusu, genel olarak miyozin fosforilasyonunun düzeyini belirleyen intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişimler ile düzenlenir. Kasın sinirsel ya da humoral stimülasyonu sonucunda $[\text{Ca}^{+2}]_i$ artar. Ca^{+2} kalmoduline (CaM) bağlanır ve oluşan kalsiyum kalmodulin kompleksi ($\text{Ca}^{+2}\cdot\text{CaM}$) miyozin hafif zincir kinazı (Myosin Light Chain Kinase, MLCK) aktive eder. Aktif $\text{Ca}^{+2}\cdot\text{CaM}\cdot\text{MLCK}$ kompleksi miyozinin 20-kDa hafif zincirlerinin (Light Chain, LC_{20}) fosforilasyonunu katalize eder. Bu fosforilasyon reaksiyonu miyozin başlarının aktin filamentleriyle etkileşmesini (çapraz köprü) tetikler ve kasılma meydana gelir. Serbest Ca^{+2} konsantrasyonunun sarkoplazmadan uzaklaştırılmasıyla (hücre dışına atılması ya da SR içine alınması), $[\text{Ca}^{+2}]_i$ dinlenme düzeylerine düşer ve $\text{Ca}^{+2}\cdot\text{CaM}\cdot\text{MLCK}$ kompleksi ayrışır ve MLCK inaktif hale gelir. Miyozin, miyozin hafif zincir fosfataz (Myosin Light Chain Phosphatase, MLCPaz) ile defosforile olur ve aktinden ayrılır. Bu süreç sonucunda da düz kas gevşer (Şekil 1) (44).

1. Elektromekanik kenetlenme

Hücre membranı (sarkolemma) depolarizasyonunun voltaja duyarlı L-tipi Ca^{+2} kanallarını (Voltage-dependent Ca^{+2} channels, VDCC) aktive etmesi sonucunda, Ca^{+2} ekstraselüler alandan konsantrasyon gradiyentine bağlı olarak hücre içine geçer. Ekstraselüler $[\text{Ca}^{+2}]$ yaklaşık 1.5-2 mM iken dinlenme durumundaki düz kasın $[\text{Ca}^{+2}]_i$ yaklaşık 120-270 nM'dir. Hücre membranının iki tarafındaki bu 10^5 kat Ca^{+2} konsantrasyon farkı aktif bir şekilde sarkolemmal Ca^{+2} pompası (SL CaATPaz), ve $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ ile sağlanır. Bu aktif sistemlerin de sağlıklı bir şekilde çalışabilmesi için membran potansiyelinin Na^+/K^+ -ATPaz ile ayarlanması gereklidir. Kalsiyum kanallarının açılması sonucunda $[\text{Ca}^{+2}]_i$ yaklaşık olarak 500-700 nM'ye yükselir ve bu konsantrasyon



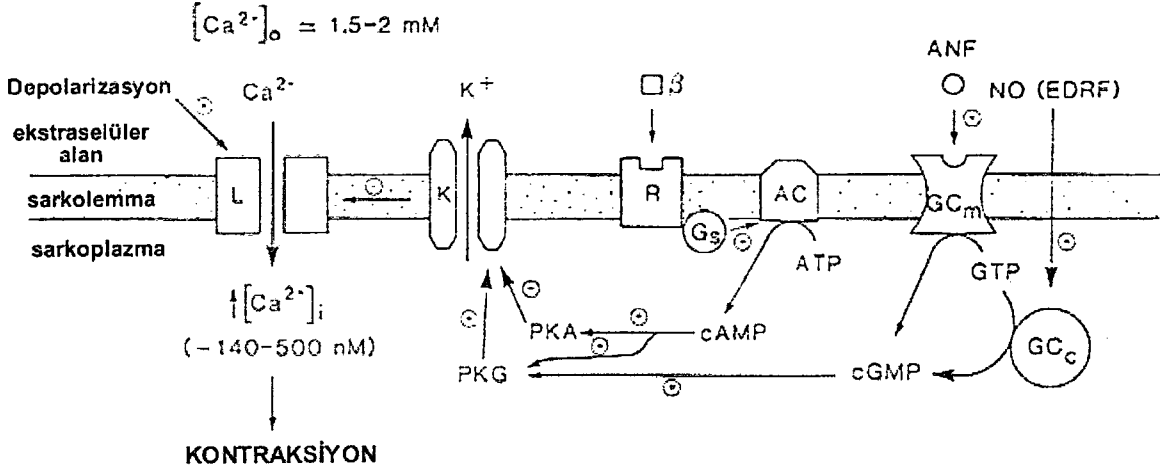
Şekil 1: Düz kasta kasılma-gevşeme olaylarının, miyozin fosforilasyon/ defosforilasyonu ile düzenlenmesi (44).

miyozin fosforilasyonunun tetiklenmesi ve kasın kontraksiyonu için yeterlidir.

β -adrenerjik ajanlar, atriyal natriüretik faktör (ANF) ve endotel kaynaklı gevşetici faktör (Endothelium Derived Relaxing Factor, EDRF= nitrik oksit, NO) L-tipi Ca^{+2} kanalları aracılığıyla Ca^{+2} girişini azaltarak gevşemeye neden olabilir. β -adrenerjik agonistler, β -adrenoseptörlerle etkileşerek G_s proteininin α_s ve β/γ alt birimlerine ayrılmasına neden olur. α_s alt biriminin adenilat siklaza (Adenylate Cyclase, AC) bağlanarak onu aktive etmesi ATP'nin cAMP'ye dönüşümünü katalize eder. cAMP, cAMP-bağımlı protein kinaza (PKA) bağlanır ve onu aktive eder. ANF'nin membrana bağlı guanilat siklaz (Guanylate Cyclase, GC), EDRF'nin de sitozolik GC'yi aktive etmesi GTP'den siklik GMP (cGMP) oluşumuna neden olur. PKA ve cGMP bağımlı protein kinaz (PKG) aracılığı ile K^+ kanallarının fosforile olarak açılması, hücrenin daha çok pozitif yük kaybederek hiperpolarize olmasına, dolayısı ile voltaja duyarlı L-tipi Ca^{+2} kanallarının kapanarak Ca^{+2} girişinin azalmasına neden olur. Sonuç olarak $[Ca^{+2}]_i$ azalır ve kas gevşer (Şekil 2).

2. Farmakomekanik kenetlenme

Bu mekanizma intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunu membran potansiyelinden bağımsız olarak düzenler. Asetilkolin, anjiyotensin, vazopresin, bradikinin, histamin, tromboksan A_2 ve adrenalın reseptörleri spesifik olarak bir G proteini alt tipi olan G_q aracılığı ile fosfolipaz C'ye (PLC) kenetlidirler. Ligand-reseptör etkileşimi sonucu membran fosfoinositidlerini, özellikle fosfatidilinozitol 4,5-bifosfatı hidrolize eden PLC izoenzimi olan PLC- β aktif hale gelir. Bunun sonucunda iki adet ikinci ulak meydana gelir. Bunlar protein kinaz C'yi aktive eden 1,2-diaçilgliserol (DAG) ve inozitol 1,4,5-trifosfattır (IP_3). IP_3 sarkoplazmaya difüze olur ve SR membranında lokalize olan IP_3 reseptörüne (IPR) bağlanır. Bu reseptör aynı zamanda Ca^{+2} saliverici kanaldır ve IP_3 ile bu reseptörün etkileşmesi sonucunda kanal açılır ve Ca^{+2} SR lümeninden sarkoplazmaya doğru difüze olur ve kontraksiyonu tetikler. Farklı bir SR Ca^{+2} saliverici kanal olan ryanodin reseptörü (RR), artan $[Ca^{+2}]_i$ ile aktive olur. Bu yolak kalsiyum iyonunun



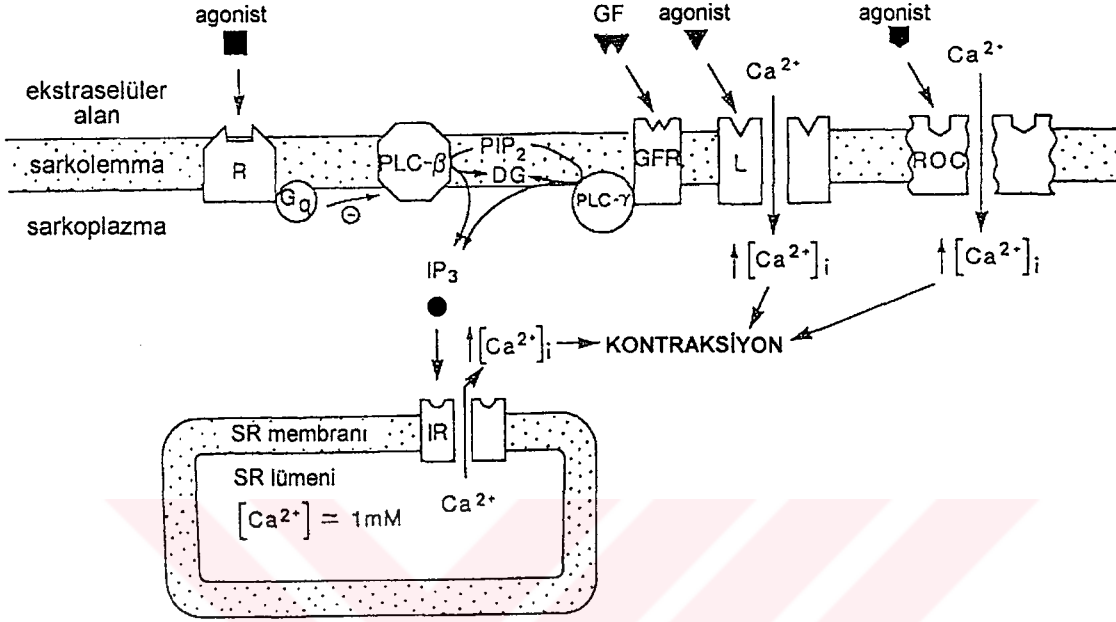
Şekil 2: Düz kasta elektromekanik kenetlenme mekanizmaları. (i) Hücre membran depolarizasyonunun neden olduğu voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarından Ca^{+2} girişi aracılığı ile gerçekleşen kontraksiyon ve (ii) β -adrenerjik ajanlar, ANF ve NO gibi agonistler, hücre membranının hiperpolarizasyonu ve K^{+} kanalı aktivasyonu ile gevşemeye neden olurlar. $[\text{Ca}^{+2}]_0$, ekstraselüler Ca^{+2} konsantrasyonu; $[\text{Ca}^{+2}]_i$, intraselüler serbest Ca^{+2} konsantrasyonu; L, L-tipi Ca^{+2} kanalı; K, K^{+} kanalı; β , β -adrenerjik agonistler; R, β -adrenerjik reseptör; G_s , adenil siklazı (AC) stimüle eden GTP'ye bağlı protein; ANF, atriyal natriüretik faktör; EDRF, endothelium-derived relaxing factor, nitrik oksit (NO); GC_m ve GC_c , sırasıyla guanil siklazın membrana bağlı ve sitozolik formları; PKA, cAMP bağımlı protein kinaz; PKG, cGMP bağımlı protein kinaz (44).

indüklediği Ca^{+2} salıverilişi (Ca^{+2} -Induced Ca^{+2} Release, CICR) olarak tanımlanır. Bu reseptör Ca^{+2} , kafein ve ryanodinin mikromolar konsantrasyonlarıyla aktive olurken fizyolojik olarak ileri düzeyde artan $[Ca^{+2}]_i$, deneysel olarak da rutenyum kırmızısı ile inaktive olur. Kontraktil agonistler sabit membran potansiyelinde L-tipi Ca^{+2} kanalları ya da reseptör aracılı nonspesifik iyon kanalları (Pürinerjik reseptör iyon kanalı P_{2x}) aracılığı ile de Ca^{+2} girişine neden olabilirler. Damar düz kasında $[cAMP]_i$ artması Ca^{+2}_i konsantrasyonunu azaltarak gevşemeye neden olur. β -adrenerjik ajanlar damar düz kas hücrelerinde cAMP konsantrasyonunu artırarak, PKA aracılı K^+ kanalının fosforilasyonu ile hiperpolarizasyona ve Ca^{+2} girişinin azalmasına neden olarak gevşeme oluşturur. Bu ajanlar hem SR hem de sarkolemmal Ca^{+2} pompalarının (Ca^{+2} - Mg^{2+} ATPaz) aktivasyonunu tetikleyebilir. SR membranındaki Ca^{+2} pompasının regülasyonu ise küçük bir protein olan fosfolamban (PLB) ile sağlanır. Bu protein normalde pompayı inhibe eder, PKA ve PKG fosforilasyonu ise bu inhibisyonu ortadan kaldırır. Sonuç olarak pompanın aktive olmasıyla $[Ca^{+2}]_i$ azalır ve gevşeme meydana gelir (Şekil 3).

B. İntraselüler kalsiyum konsantrasyonundaki değişimlerden bağımsız vasküler düz kas kontraksiyonu mekanizması

Damar düz kas hücrelerinde kalsiyum konsantrasyonunda değişim olmaksızın da vasküler tonus düzenlenebilir. Bu, kontraktil elementlerin kalsiyum iyonuna olan duyarlılığı değiştirilerek gerçekleşebilir. Forbol esterleri PKC'yi aktive ederek damar düz kasında yavaş gelişen sürekli bir kontraksiyona neden olabilir. PKC'ler aktivasyon gereksinimleri bakımından üç sınıfta incelenirler:

1. *Klasik ya da konvansiyonel PKCler (cPKCler):* Alfa, beta, gama (α , β_1 , β_2 ve γ) alttipleri bulunur. Ca^{+2} , fosfatidilserin (PS) ve diaçilgliserol (DAG) ya da forbol esterleri ile aktive olurlar.
2. *Yeni PKCler (nPKCler):* Delta, eta, nü, teta (δ , ϵ , η , θ) alttipleri bulunur. PS ve DAG ya da forbol esterleri ile aktive olurlar fakat kalsiyum iyonuna gereksinim duymazlar.



Şekil 3: Düz kasta farmakomekanik kenetlenme mekanizmaları. (i) ekstraselüler sinyaller (örneğin, bazı α_1 -adrenerjik agonistler) fosfoinozitide spesifik fosfolipaz C'ye (özellikle PLC β izoenzimleri) kenetlenirler ve IP₃ meydana gelir. IP₃, SR'den Ca⁺² salıverilişini indükleyerek kontraksiyona neden olur; (ii) belirli büyüme faktörleri tirozin kinaz reseptörü aracılığı ile PLC- γ izoenzimlerini aktive ederek IP₃ oluşumuna neden olur ve SR'den Ca⁺² salıverilişi gerçekleşir; (iii) diğer sinyaller membran potansiyelinde değişiklik yapmaksızın L-tipi Ca⁺² kanallarından ya da reseptör-kontrollu Ca⁺² kanallarından düz kas hücrelerine Ca⁺² girişini aktive eder. R, reseptör; G_q, fosfoinozitide spesifik PLC- β izoenzimlerini stimüle eden GTP bağımlı proteinlerinin bir alttipi; PIP₂, fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat; DG, 1,2-diaçilgliserol; IP₃, inositol 1,4,5-trifosfat; IR, SR IP₃ reseptörü Ca⁺² kanalı; ROC, reseptör kenetli iyon kanalı (44).

3. *Atipik PKCler (aPKCler): zeta (ζ)*. PS'ye gereksinir fakat DAG, forbol esterleri ve kalsiyum iyonundan etkilenmezler. λ ise henüz karakterize edilmemiştir.

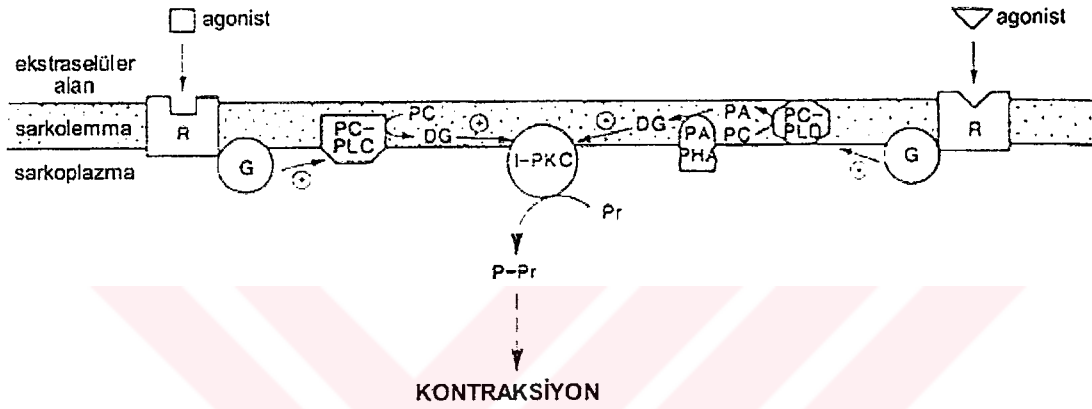
İntraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunda değişiklik olmadan forbol esterleriyle meydana gelen ya da fenilefrinin neden olduğu Ca^{+2} komponentinden bağımsız kontraksiyonlar, kalsiyum iyonundan bağımsız PKC izoenzimleri üzerinden gelişebilir.

Ligandın reseptör ile etkileşmesiyle aktive olan PLC, membran lipidlerinin hidrolizi sonucu IP_3 'ün yanısıra DAG de oluşturur. DAG, Ca^{+2}_i konsantrasyonunda değişiklik olmaksızın meydana gelen bu ikinci ulak spesifik olarak kalsiyum iyonundan bağımsız PKC izoenzimlerini aktive eder. Fakat DAG, cPKC'lerin kalsiyum iyonuna olan duyarlılığını artırır. Böylelikle bu izoenzimlerin biri ya da daha fazlası $[Ca^{+2}]_i$ dinlenme seviyesindeyken aktive edilebilir. Henüz tam olarak açıklığa kavuşmamış olsa da, bazı substrat proteinlerinin fosforilasyon sonucunda kontraksiyona neden oldukları düşünülmektedir (Şekil 4).

C. Çapraz köprü hareketinin direkt olarak düzenlenmesi

Düzenleyici yolakta diğer bir basamak fosforile olmuş miyozin çapraz köprülerinin aktinle etkileşmesidir.

Kaldesmon. Bir ince filament proteini olan kaldesmon (CaD) (kalmodulin bağlayan protein) kalsiyum iyonundan bağımsız bir şekilde aktin, miyozin ve troponinle, kalsiyum iyonuna bağımlı olarak CaM ile etkileşir. CaD, miyozin fosforilasyonunu etkilemeksizin MLCK, CaM, miyozin, tropomiyozin ve aktin kontraktıl sistemini yeniden oluşturan ve aktin ile aktif hale geçen miyozin- Mg^{2+} ATPaz aktivitesini inhibe eder. CaD C-terminal aktin bağlama fragmenti ile aktine bağlanmak için miyozinle yarışarak aktomiyozin ATPaz'ı inhibe eder. Aktinin N-terminali CaD için bağlanma bölgesi iken bu bölge aynı zamanda miyozin başını da bağlar. CaD aktin filamentlerin hareketini de inhibe ederek onları hareketsiz kılar.



Şekil 4: Kalsiyum iyonundan bağımsız PKC aracılığı ile gerçekleşen kontraksiyon. R, α_1 -adrenerjik agonistin etkilediği reseptör; G, GTP bağlayan heterotrimetrik protein; PC-PLC, fosfatidilkoline spesifik fosfolipaz C; PC, fosfatidilkolin; DG, Diaçil gliserol; I-PKC, kalsiyum iyonundan bağımsız PKC izoenzimleri; Pr, substrat proteinleri; PC-PLD, fosfatidilkoline spesifik fosfolipaz D, PA-PHA, fosfatidat fosfohidrolaz (44).

CaD, CaMKII, PKC, kazein kinaz II, cdc2 kinaz ve mitojen tarafından aktive olan protein kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase, MAPK) ile fosforile olur. Fosforilasyon bölgeleri, N-terminalinde miyozin bağlama bölgesi ve C-terminalinde aktin bağlama bölgesidir. CaM kinaz II ya da PKC ile C-terminal bölgesindeki fosforilasyon kaldesmonun aktomiyozin ATPaz inhibisyonunu azaltır (13, 44).

Kalponin. Kalponin (CaP) (kalmodulin-bağlayıcı, troponin T-benzeri protein) kalın filamentle birleşik, hemen hemen sadece düz kasta sentezlenen düzenleyici bir proteindir. CaP aktin tarafından aktive edilen miyozin-Mg²⁺ATPaz'ı miyozin fosforilasyonunu etkilemeksizin %80 oranında inhibe eder. CaP *in vitro* ortamda CaMKII ve PKC ile fosforile olur. Fosforilasyon kalponinin aktin ile etkileşmesini önler ve sonuç olarak aktomiyozin ATPaz'ı inhibe etme yeteneği azalır. Fosforile CaP tip 2A protein fosfataz (PPIIA) ile defosforile olur. Sonuç olarak, dinlenim durumundaki kasta [Ca⁺²]_i düşük, miyozin defosforile, çapraz köprüler aktinden ayrı ve kas gevşemiş haldedir. Bu durumda aktin filamenti ile beraber olan CaP düşük hızdaki çapraz köprü hareketini inhibe eder. Kasın stimülasyonunu takiben [Ca⁺²]_i artar ve Ca⁺²•CaM ile MLCK aktivasyonu tetiklenir. Fosforile miyozin tek başına çok düşük ATPaz aktivitesine sahiptir fakat aktin varlığında belirgin şekilde aktive olur. CaP aktin filamenti ile beraber olduğu sürece çapraz köprü hareketi hızı inhibe olur. Bu inhibisyon kalponinin CaMKII ya da PKC ile fosforilasyonu ve/veya CaP'nin aktinden ayrılıp Ca⁺² kaltropin (CaM familyasından, CaP afinitesi kalmadulininkinden daha fazla olan bir protein) kompleksinin bağlanmasıyla inhibe olur. Bu etkiler PPIIA tarafından defosforilasyon ya da kalsiyum iyonunun kaltropinden ayrılmasıyla tersine çevrilir. İntraselüler Ca⁺² konsantrasyonunun, defosforile miyozin : akto-fosforile myozin : CaP•akto-fosforile miyozin kompleksi oranının hassas olarak ayarlanması, aktomiyozin ATPaz aktivitesinin duyarlı bir şekilde düzenlenerek vasküler düz kasa normal fizyolojik işlevi için gerekli olan esnekliği sağlar (13, 44).

D. Kalsiyum duyarlığında artış ve azalma

[Ca⁺²]_i ve kontraksiyon oluşumu arasında görülen farklılık duyarlık artışı (sensitizasyon) mekanizmalarından kaynaklanmaktadır. Örneğin, agonistin neden olduğu

farmakomekanik kenetlenme, regülatör ve/veya kontraktıl aparatların kalsiyum iyonuna olan duyarlığını değiştirerek damar düz kasının kontraktılitesini ayarlayabilir. Bu modülasyon genel olarak G-proteini ile kenetli fosforilasyon olayları aracılığıyla gerçekleşir. Fosforilasyon olayları kalın filamente bağlı CaD ve CaP proteinlerinin regülasyonunu kapsar. Ca⁺² sensitizasyonuna miyozin LC₂₀ fosforilasyonundaki artışın eşlik ettiği ve buna MLCP inhibisyonunun değil MLCK aktivasyonunun neden olduğu gösterilmiştir (15, 16). MLCP, G proteinin aracılık ettiği PLA₂'nin aktive olmasıyla membran lipidlerinden oluşan araşidonik asit (AA) ile inhibe edilebilir. AA'nın neden olduğu sensitizasyon [Ca⁺²]_i değişimlerinden bağımsızdır.

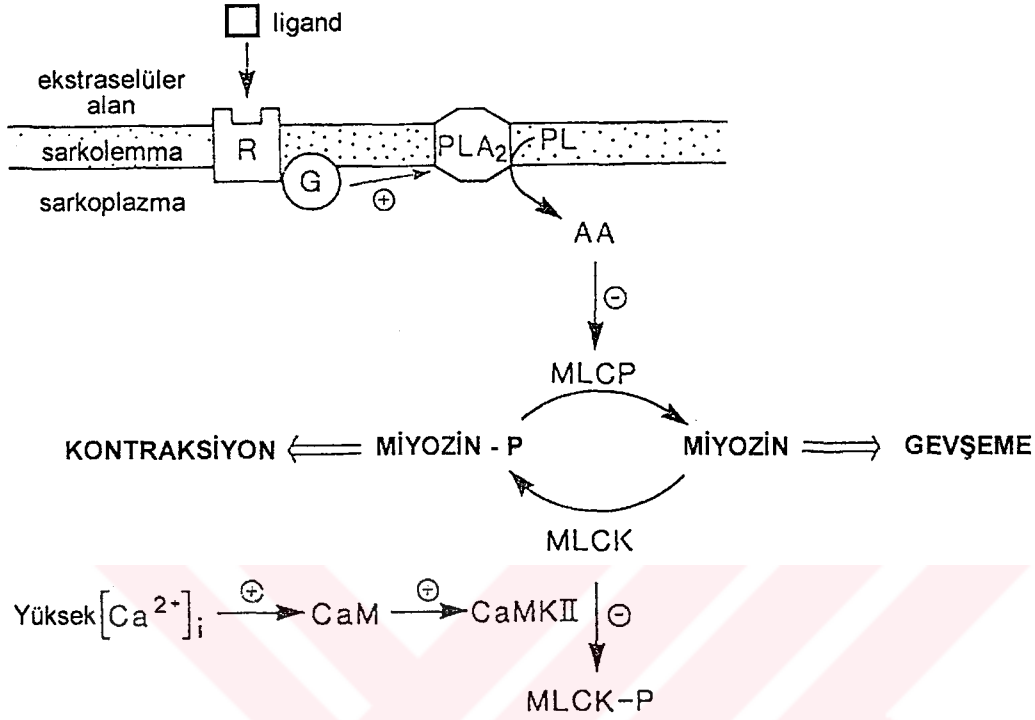
Eğer düz kas hücresi yüksek [Ca⁺²]_i ile etkileşmişse kontraktıl yanıt kalsiyum iyonuna karşı duyarsızlaşabilir (desensitizasyon). Bu mekanizma olasılıkla CaMKII aktivasyonundan kaynaklanabilir. CaMKII'nin kalsiyum iyonuna olan afinitesi MLCK'den daha düşüktür. İnraselüler kalsiyum iyonu konsantrasyonunun 1 µM'ye artması CaMKII'yi aktive eder ve bu da MLCK'nin aktivitesini azaltan MLCK fosforilasyonuna neden olur. Böylelikle düz kas yüksek [Ca⁺²]_i varlığında gevşeyebilir. Bu yüzden MLCK/MLCP aktivite oranı Ca⁺² sensitizasyon/desensitizasyon açısından önemlidir (Şekil 5).

II. İntraselüler kalsiyum iyonunun kaynağı

A. İyon kanalları

1. Voltaja duyarlı Ca⁺² kanalları

Voltaja duyarlı Ca⁺² kanalları (VDCC) L, N, P, Q, R ve T olmak üzere altı alt tipten oluşur. Düz kas L-tipi Ca⁺² kanalı, Ca⁺² girişinde ana yolaktır. Bu kanal membran depolarizasyonu ile aktive olur ve konvansiyonel Ca⁺² kanal blokörleriyle inhibe edilir. Agonistler, nonselektif katyon kanalını aktive ederek, K⁺ kanalını inhibe ederek ve/veya Cl⁻ kanalını aktive ederek hücre membranının depolarize olmasına neden olurlar ve bu kanalı açarlar. Agonistler Ca⁺² kanallarının açılma olasılıklarını direkt ya da G-proteinleri aracılığıyla membran depolarizasyonunun olmadığı durumlarda da düzenleyebilirler.



Şekil 5: Miyozin fosforilasyonunda Ca⁺² duyarlılığını değiştiren mekanizmalar. (i) Ca⁺² sensitizasyonu. α_1 -adrenerjik ve muskarinik agonistler gibi ekstraselüler sinyal molekülleri reseptörlerle (R) etkileşerek, GTP'ye bağlı protein (G) aracılığı ile fosfolipaz A₂ (PLA₂) enzimine kenetlenirler. Ligand-reseptör etkileşmesi PLA₂'yi aktive eder. Aktif PLA₂, membran fosfolipidlerini (PL) (fosfatidilkolin) araşidonik asite (AA) hidroliz eder. AA, miyozin light chain fosfatası (MLCP) inhibe ederek MLCK'yi aktive eder. MLCK miyozini fosforile ederek kontraksiyona neden olur. (ii) Ca⁺² desensitizasyonu. Hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunun, CaM kinazı aktive edecek kadar yükseldiği durumda MLCK, CaMKII tarafından fosforile edilir. Fosforile MLCK'nin Ca⁺²/CaM'ye afinitesi düşüktür. Sonuç olarak MLCP, miyozini defosforile eder ve kasın gevşemesine neden olur (44).

L-tipi Ca^{+2} kanalları sürekli depolarizasyona bağılı olarak hızlı bir şekilde desensitize olur. Fakat yüksek K^{+} 'nin indüklediği depolarizasyon, intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunda sürekli bir artışa ve kontraksiyona neden olur. Elektrofizyolojik çalışmalar depolarizasyonun, Ca^{+2} akımını artırdığını ve 10 ms'de tepe noktasına ulaştırdığını, daha sonra çok düşük seviyeye geldiğini göstermiştir. Ca^{+2} kanal blokörü verapamil K^{+} 'nin indüklediği kontraksiyon ve $[Ca^{+2}]_i$ artışını doza bağılı olarak inhibe eder. Verapamil aynı zamanda noradrenalinin neden olduğu intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışı da doza bağılı olarak azaltır. Bu sonuçlar NA ve diğer agonistlerin, yüksek K^{+} 'nin yaptığı gibi verapamile duyarlı aynı L-tipi Ca^{+2} kanalını açtığını ve bu kanalın düz kasta ana Ca^{+2} giriş yolağı olduğunu gösterir (14).

2. Nonselektif katyon kanalı ve kapasitatif Ca^{+2} girişi

Agonistin neden olduğu intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışın büyük bir kısmı Ca^{+2} kanal blokörleriyle inhibe edilse de bir kısmı etkilenmemiştir (41). Yüksek potasyum iyonunun neden olduğu intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışı tamamen inhibe edebilen verapamil konsantrasyonu, NA'nın neden olduğu artışı tümüyle inhibe edememiştir. Verapamil varlığında, NA intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunda geçici bir artışı takiben küçük sürekli bir artışa neden olmuştur. Ryanodin ve SR Ca^{+2} pompası inhibitörü tapsigargin veya siklopiazonik asit ile etkileştirilmiş dokularda agoniste-bağılı intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki hızlı ve geçici artış inhibe edilebildiği için bu artış verapamile duyarlı olmayan SR Ca^{+2} salıverilişinin bir sonucudur. Buna karşılık intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki küçük ve sürekli artış (verapamile duyarsız) lantanın mikromolar konsantrasyonlarıyla inhibe olmuştur. Ca^{+2} kanal blokörlerinin L-tipi Ca^{+2} kanalını selektif olarak, lantan iyonunun ise her iki L-tipi ve non-L-tipi Ca^{+2} kanallarını inhibe etmesinden dolayı agonist-aracılı $[Ca^{+2}]_i$ artışı, L- ve non-L-tipi Ca^{+2} kanallarından Ca^{+2} girişinin bir sonucu olabilir (14, 30, 41).

SR'nin tamponlama kapasitesi Ca^{+2} girişini düzenleyebilir. Sarkolemma üzerinden giren kalsiyum iyonunun kısmen ya da tamamen boş olan yüzeysel Ca^{+2} depoları tarafından hızlı bir şekilde alınarak yüzeysel bir tampon bariyeri oluşturduğu önerilmiştir (43). Bu depolar dolu iken Ca^{+2} , plazma membranı ile sınırlı kompartmana doğru pompalanır ve Ca^{+2}

buradan da ekstrasellüler alana hücre membranındaki Ca^{+2} -ATPaz'ın yaptığı gibi $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiştokuşçusu aracılığı ile ekstrasellüler alana atılır (6). Ca^{+2} kanal blokörleriyle inhibe edilemeyen diğer bir Ca^{+2} giriş yolağı, Ca^{+2} salıverilişinin aktive ettiği kapasitatif Ca^{+2} girişidir. Bunlar aynı zamanda "store-operated Ca^{+2} kanalı" (SOC) olarak da bilinir. Elektrofizyolojik çalışmalarda bu kanalın açılması ile belirlenen akım I_{CRAC} (Ca^{+2} release-activated Ca^{+2}) olarak tanımlanmıştır. Ca^{+2} depolarının doygunluk hali de plazma membranından Ca^{+2} girişini aktive edebilir ve düzenleyebilir (5). Kapasitatif Ca^{+2} girişinde Ca^{+2} depolarının boşalması ile başlayan sinyal yolağı hücre membranındaki Ca^{+2} kanallarını (Human transient receptor potential, Htrp3) aktive eder (30, 31).

Yukarıda anlatılan her iki model de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ dağılımının homojen olmadığını göstermektedir. VanBreemen'in yüzeysel tampon engeli (Superficial Buffer Barrier, SBB) modeli global intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunu azaltma ve periferel Ca^{+2} konsantrasyonunu artırma görevi gösterebilir. Kapasitatif Ca^{+2} giriş modeli de Ca^{+2} depoları boş iken periferel Ca^{+2} konsantrasyonunu artırma görevi gösterebilir. Bu subsarkolemmal bölgelerdeki Ca^{+2} , kontraktıl aparatla etkileşmemektedir. Bu durum Ca^{+2}_i konsantrasyonundaki artışla kontraksiyon oluşumu arasındaki farklılığı açıklayabilir. Damar düz kas hücrelerinin subsarkolemmal bölgelerindeki Ca^{+2} kompartmantalizasyonu, selektif SR Ca^{+2} -ATPaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalarla desteklenmektedir. SR Ca^{+2} -ATPaz inhibisyonu nedeniyle Ca^{+2} deposunun boşalması sonucunda henüz açıklanamayan bir sinyal transdüksiyon mekanizması aracılığıyla Ca^{+2} girişi meydana gelir. Ca^{+2} depolarının boşalması ile oluşan Ca^{+2} girişi olasılıkla sarkolemmadaki Htrp3 kanalların açılmasıyla gerçekleşmektedir (7, 46).

B. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiştokuşu

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiştokuşçusunun rol aldığı Ca^{+2} girişi bazı düz kas tiplerinde kontraksiyona neden olmaktadır. Na^+ içermeyen çözelti tek başına sürekli bir kontraksiyona neden olmuştur. Ca^{+2} taşıma kapasitesi SL Ca^{+2} -ATPaz'a göre 3-6 kat daha fazla olan $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiştokuşçusu daha çok kalsiyumun ekstrasellüler alana atılımı için önem taşıyabilir (14).

C. Sarkoplazmik retikulum

Düz kasta SR'den Ca^{+2} salıverilişinde iki tip mekanizma rol oynamaktadır. Bunlar kalsiyum iyonunun neden olduğu Ca^{+2} salıverilişi (Ca^{+2} -Induced Ca^{+2} Release, CICR) ve IP_3 'ün neden olduğu Ca^{+2} salıverilişidir (IP_3 -Induced Ca^{+2} Release, IICR). CICR, Ca^{+2} ile aktive olurken IICR IP_3 ile aktive olur. Fakat IICR, IP_3 'e ilaveten Ca^{+2} ile de aktive olmaktadır. L-tipi Ca^{+2} kanalı aracılığıyla Ca^{+2} girişi CICR'yi aktive eder. CICR selektif olarak kafein ile aktive olurken ryanodin ile inhibe olur. IICR ise heparin ile inhibe edilebilir. Dinlenme durumundaki Ca^{+2} girişi kontraksiyonla kenetli değildir. Hücrede iki tip Ca^{+2} deposunun olduğu düşünülmektedir, bazı depolar kafein ve agoniste duyarlı ($S\alpha$) iken diğer depolar kafein, tapsigargine duyarlı agoniste duyarsızdır ($S\gamma$) (14). SR'den Ca^{+2} salıverilişi agonistin neden olduğu sürekli kontraksiyonun sadece ilk kısmından sorumludur çünkü;

- NA ve diğer agonistler eksternal Ca^{+2} yokluğunda sadece geçici bir kontraksiyona neden olmaktadır.
- Agonistin neden olduğu IP_3 kısa zamanda metabolize edilir.
- SR fonksiyon inhibitörleri agonistin neden olduğu kontraksiyonların ilk kısmını inhibe ederken sürekli kısmını inhibe edemez.
- Agonistin neden olduğu plato $[Ca^{+2}]_i$ artışı Ca^{+2} kanal blokörleri ile güçlü bir şekilde inhibe olur (14).

SR lümeni Ca^{+2} -bağlayıcı proteinleri (kalsekestrin, kalretikülin). SR, damar düz kas hücrelerinde subsarkolemmal alanda (periferal SR, subsarkolemmal SR) ve nükleusa yakın bölgelerde (merkezi SR) lokalize olmuştur. Periferdeki küçük damarlarda periferal SR daha yoğun halde bulunurken aorta gibi büyük damarlarda merkezi SR daha fazladır. (8). SR'deki Ca^{+2} -bağlayıcı proteinlerin sekestrasyon işlemi dışındaki fonksiyonları henüz yeterince aydınlatılamamıştır. Kalsekestrin (CSQ) ve kalretikülin (CR) farklı dağılım gösteren Ca^{+2} tamponlayıcı iki moleküldür. Merkezi SR'de CSQ/CR oranı yaklaşık 1:1 iken periferdeki SR'de bu oran yaklaşık 5:1'dir. CSQ'nin Ca^{+2} bağlama kapasitesi CR'den daha fazladır. CSQ, periferik SR'nin Ca^{+2} depolama yeteneğini artırır (13.)

Sarkolemmal ve SR Ca⁺² pompaları. Diğer hücrelerde olduğu gibi vasküler düz kas hücresinde de biri hücre membranında (sarkolemmal, SL) diğeri sarkoplazmik retikulum (SR) membranında olmak üzere herbiri farklı genler tarafından ifade edilen iki tip Ca⁺² pompası bulunur (sırasıyla, SLCa⁺²-ATPaz ve SRCa⁺²-ATPaz). SLCa⁺²-ATPaz aktivitesi, Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesine göre 4 kat daha fazladır. Na⁺/Ca⁺² değıştokuş mekanizması ile gerçekteşen Ca⁺² çıkışı, sonuçta Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi ile sınırlanabildiği için SLCa⁺²-ATPaz, Ca⁺² çıkışında Na⁺/Ca⁺² değışimine göre daha önemli rol oynamaktadır. Forbol esterleri, ATPaz fosforilasyonunun eşlik ettiği ATPaz aktivitesini stimüle eder. Damar düz kasındaki SL Ca⁺²-ATPaz PKC ile aktive olur.

SR Ca⁺²ATPaz (SERCA) üç farklı gen tarafından ifade edilir. İskelet kasında SERCA-1, kalpte SERCA-2a, düz kasta ise SERCA-2b sentezlenir. SERCA-3 ise düz kas ve kas içermeyen dokularda bulunur. SERCA-2a, SERCA-2b ve SERCA-3 bitkisel (Umberilliferus) bir alkaloid olan tapsigargin, bakteriyel bir toksin olan siklopiazonik asit (CPA) ve sentetik bir madde olan 2,5-di-(ter-bütıl)-1,4-benzohidrokinon (BHQ) tarafından inhibe edilebilir. Damar düz kas preparatlarında SOC girişi gösterildiği halde bu yolakla gerçekteşen Ca⁺² girişi ile kontraksiyon arasındaki ilişki henüz açıklık kazanmamıştır. SERCA inhibisyonu sonucu kapasitatif Ca⁺² girişinin aktivasyonu ile artan [Ca⁺²]_i kontraksiyondan bağımsızdır. SR Ca⁺²-ATPaz'ın selektif bir inhibitörü olan CPA'nın düşük konsantrasyonları (≤ 1µM) intraselüler Ca⁺² konsantrasyonunu artırırken kontraksiyona neden olmamıştır (27). CPA'nın daha yüksek konsantrasyonları (10 µM) intraselüler Ca⁺² konsantrasyonunu artırmış ve kontraksiyona neden olmuştur (35). Naganobu ve Ito (1994), sıçan mezenterik rezistans arterlerinde, 10 µM CPA'nın intraselüler Ca⁺² konsantrasyonunu artırdığını ve fenilefrinin kontraksiyonlarını potansiyalize ettiğini göstermiştir (25). Bu sonuçlar CPA'nın neden olduğu [Ca⁺²]_i artışının en azından doku tipine bağlı olarak kontraksiyonla kenetli olabileceğini göstermektedir. Potansiyalizasyon ise SR'nin Ca⁺² tamponlama kapasitesinin CPA tarafından inhibe edilmesinin bir sonucu olabileceği ileri sürülmüşse de (25, 44) KCl kontraksiyonlarının CPA varlığında potansiyalize olmaması başka mekanizmaların da katkısını önermektedir (1, 40).

D. Mitokondri

Mitokondri inhibitörleri barsak düz kasında ATP üretimi ve kontraksiyonu azaltırken, damar düz kası ATP içeriğini ve kontraksiyonları azaltmamıştır. Çünkü ATP mitokondri dışında glikoliz ile de oluşturulmaktadır. Oksidatif fosforilasyonun nitrojen gazı, dinitrofenol ile inhibisyonu, geçici kontraksiyonu oluşturmak için mitokondriden Ca^{+2} salıverilişine neden olur. Mitokondriye Ca^{+2} alımının inhibisyonunun kontraksiyona neden oluşu mitokondrinin de kalsiyum iyonunu sitoplazmadan uzaklaştırdığının bir göstergesidir. Hücre içinde bulunan çeşitli organellerin Ca^{+2} “uptake” mekanizmalarının Ca^{+2} afinitelerinde farklılıklar vardır. K_m değeri plazma membranı için 0.91, endoplazmik retikulum için 0.58 iken mitokondri için bu değer 7.1’e kadar yükselir. Yüksek K_m değeri mitokondriyal uptake mekanizmalarının Ca^{+2} afinitesinin normal koşullarda düşük olduğunu göstermektedir. $^{45}Ca^{+2}$ uptake deneyleri yüksek K^+ depolarizasyonunun mitokondriyal $^{45}Ca^{+2}$ alımını artırdığını göstermiştir. Kalsiyum iyonunun fizyolojik olmayan yüksek konsantrasyonlarında ($\geq 10 \mu M$) mitokondriyal $^{45}Ca^{+2}$ alımı artar. Kontraktıl ajanlar intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunu sadece sitoplazmada değil mitokondride de artırabilir. Kontraktıl elementlerinin enerji tüketiminden sonra Ca^{+2} mitokondride ATP üretimini stimüle eder. Mitokondri aynı zamanda Ca^{+2}_i konsantrasyonunun mikromolar konsantrasyonların üzerine çıktığı patolojik koşullar altında Ca^{+2} tamponlayıcı işlev görür (14).

III. Nonkontraktıl intraselüler kompartman

Düz kas hücresindeki en yaygın Ca^{+2} kompartmanı kontraktıl kompartmandır. Bunun yanında SL ve SR arasında, kontraktıl element içermeyen (nonkontraktıl) ve kontraktıl kompartmana oranla daha küçük olduğu düşünülen Ca^{+2} kompartmanlarının bulunma olasılığı yüksektir. Bu iki tip kompartman arasında madde aktarımı sınırlı olduğundan floresan bir Ca^{+2}_i indikatörü olan aequorin bu kompartmanlar arasında serbest olarak hareket edemez. Bu kompartmandaki Ca^{+2} , SR sekestrasyonu ve difüzyon bariyerinden dolayı kontraktıl kompartmana ulaşamaz. CPA ile SR Ca^{+2} pompasının inhibisyonu nonkontraktıl kompartmanda intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunu artırırken kontraktıl kompartmanında küçük bir etki gösterir. Buna karşılık SR’nin ryanodin ve kafein ile

boşaltılması kontraktil kompartmandaki agonistin neden olduğu geçici $[Ca^{+2}]_i$ artışını inhibe ederken nonkontraktil kompartmandaki $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri üzerinde düşük bir etki gösterir (14).



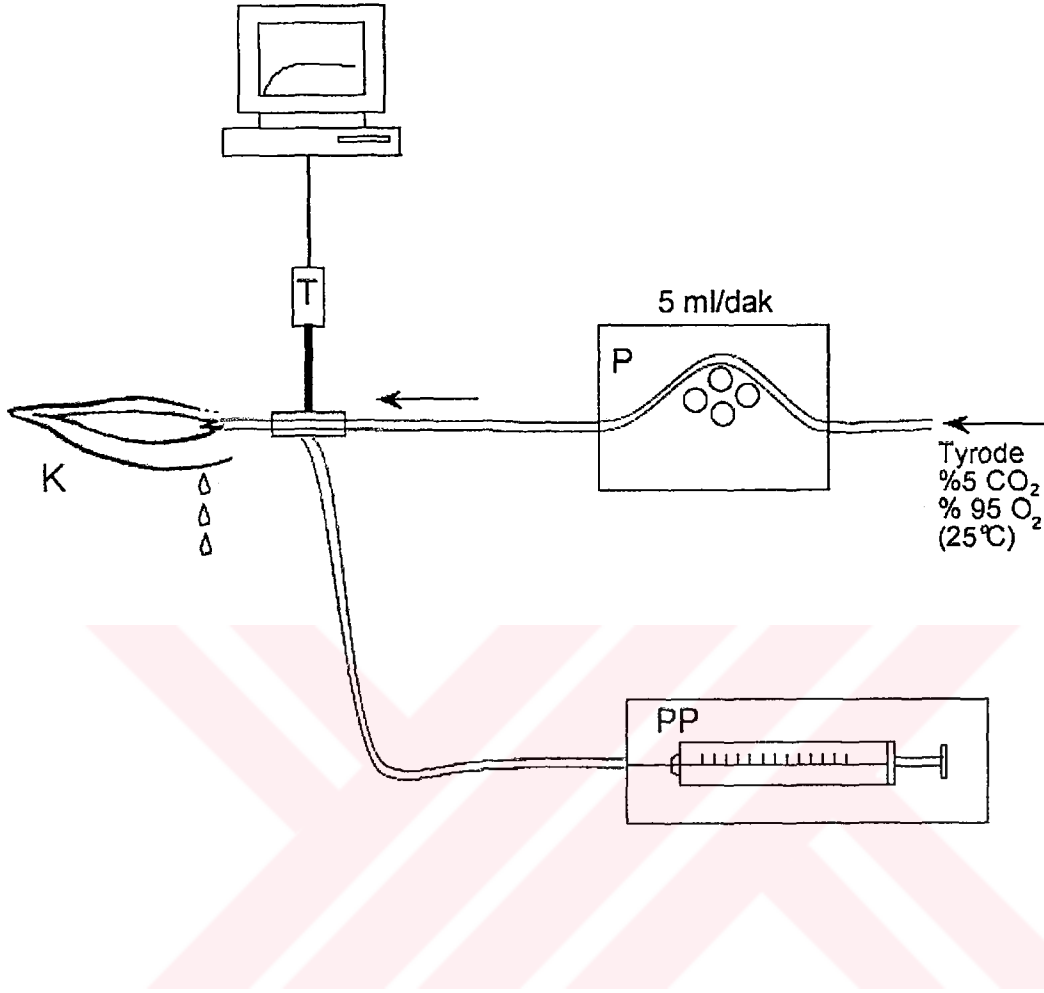
DENEYSEL BÖLÜM

I. Materyal ve yöntem

Çalışmamızdaki amaçlardan biri vazoaktif maddelere karşı gelişen reseptör-aracılı kontraksiyon-yanıt profillerini *in situ* ve *in vitro* deney modellerinde test etmektir. Bu amaçla üç farklı periferik vasküler deney modeli kullanılmıştır. Bunlar sırasıyla perfüze tüm kulak (PTK), perfüze merkezi kulak arteri (PMA) ve de izole merkezi kulak arter ring (İMA) preparatlarıdır.

A. Tavşan perfüze tüm kulak preparatı (PTK)

Çalışmada 2.5-3 kg ağırlığında yetişkin erkek tavşanlar kullanıldı. Tavşanlar %100 CO₂ ile asfiksiye edilmelerini takiben kulakları bistüri ile kesilerek çıkartıldı. Merkezi kulak arteri 24 G numaralı branül (Abbocath) ile kanüle edilerek, akış hızı 5 ml/dk'ye sabit olarak ayarlanmış peristaltik pompa (Desaga STA-Peristaltic pump) sistemine bağlandı ve %5 CO₂+% 95 O₂ ile gazlandırılan Tyrode çözeltisi (mM bileşimi: KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.04, NaHCO₃ 11.9, NaH₂PO₄ 0.42, NaCl 136.9, glikoz 5.55) ile oda sıcaklığında (25°C) perfüze edildi. Tyrode çözeltisine aynı zamanda endojen prostaglandinlerin etkisini elimine etmek için 10 µM indometazin ilave edilmiştir. Peristaltik pompa sistemine bağlı olan kulak Tyrode çözeltisi ile perfüze edilerek 1 saat stabilize edildiler. Perfüzyon basıncındaki değişimler, kulak ile peristaltik pompa arasındaki silikon bağlantı borusuna "Y" şeklinde bir konnektör ile bağlanan bir kan basıncı transdüsrü aracılığıyla izlendi. İlaç çözeltileri perfüzyon pompası (Vial Medical) aracılığı ile izole kulak merkezi arterine yerleştirilmiş olan branüle yakın bir silikon enjeksiyon tübüne 27G'lik kelebek set ile girilerek perfüzyon çözeltisine uygulanmışlardır. İlaç konsantrasyonundaki kademeli artışlar perfüzyon hızının pompa üzerinden kademeli olarak artırılmasıyla elde edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6: İzole perfüze kulak preparatının şeması. P, peristaltik pompa; PP, perfüzyon pompası; T, basınç transdüsörü; K, kulak.

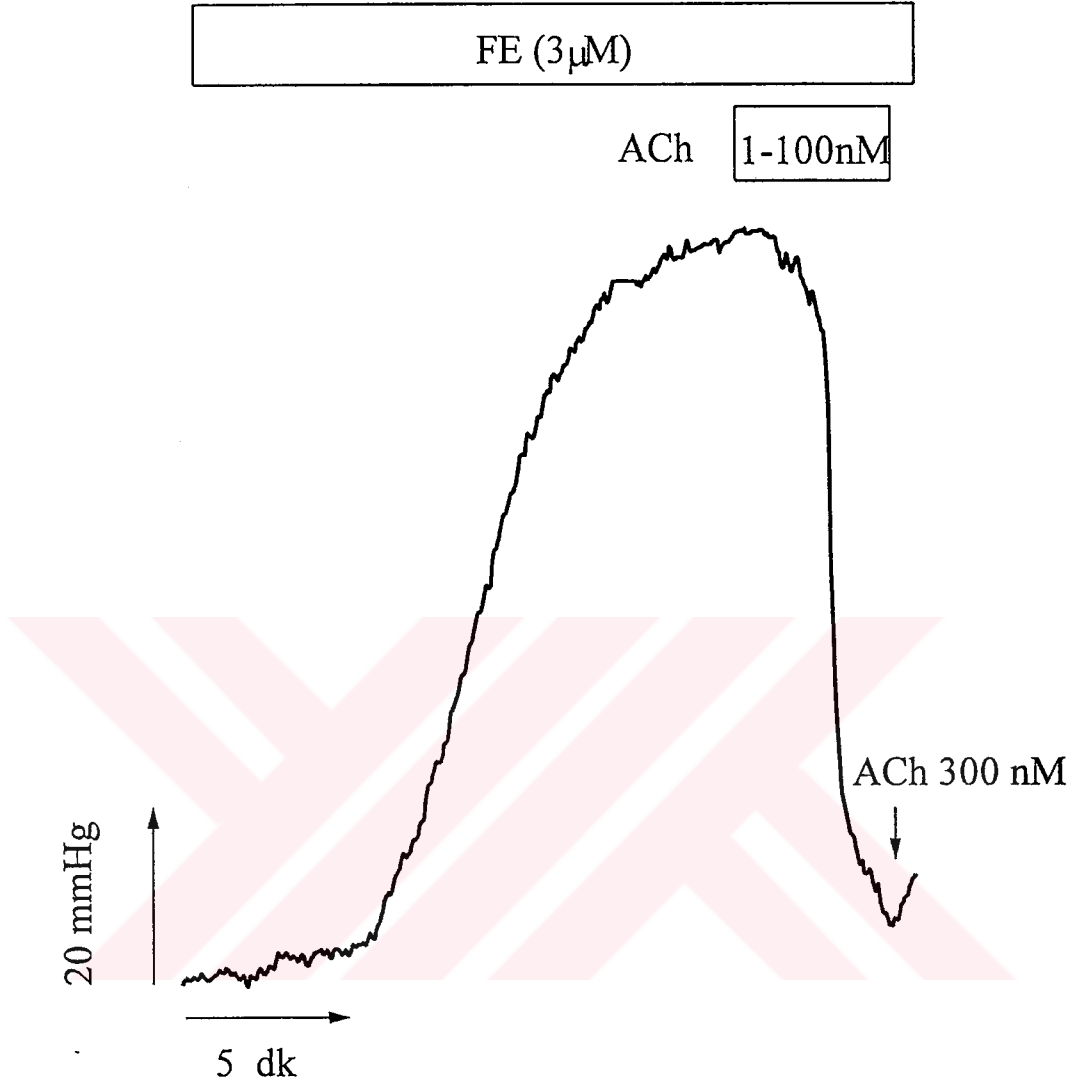
Perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonunda kademeli artışların sağlanması: Kulak damarı lümeni içinde noradrenalinin 10^{-8} ile 10^{-6} M arasında kademeli artışlarını sağlamak için gerekli kademeli enjeksiyon hızı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır: Tyrode çözeltisinin perfüzyon hızının peristaltik pompa aracılığı ile 300ml/saat'te sabit tutulduğu dikkate alınarak, ilaç çözeltisinin perfüzyon çözeltisi içindeki istenen konsantrasyonlarına erişmek için gerekli enjeksiyon hızı (ml/saat) $C1=C2 \times M2/M1$ formülü ile hesaplanmıştır ($C2$ = perfüzyon hızı, 300 ml/saat); $M2$ =erişilmesi istenen ilaç konsantrasyonu; $M1$ =stok ilaç konsantrasyonu). Kulak daha sonra 10^{-4} M L-NNA içeren tyrode çözeltisi ile nitrik oksit (NO) sentezini reversibl olarak inhibe etmek amacıyla 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası normal dokuda olduğu gibi NA kademeli konsantrasyon-yanıt profilleri elde edilmiştir. Üçüncü aşama olarak perfüzyon çözeltisi distile su ile değiştirilmiş ve doku 5 dk distile su geçirilerek endotelsizleştirilmiştir (2). Distile su ile perfüze edilen doku 1 saat Tyrode çözeltisi ile perfüze edilerek yeniden stabilize edilmiştir. Stabilizasyon sonrasında diğer aşamalarda uygulandığı gibi NA kademeli konsantrasyon yanıt traseleri elde edilmiştir. Her aşamada 10^{-5} M fenilefrin (FE) önkastırma sonrası asetilkolin (ACh, 10^{-9} - 10^{-6} M) uygulanmıştır (**Şekil 7,8**).

B. Perfüze merkezi arter

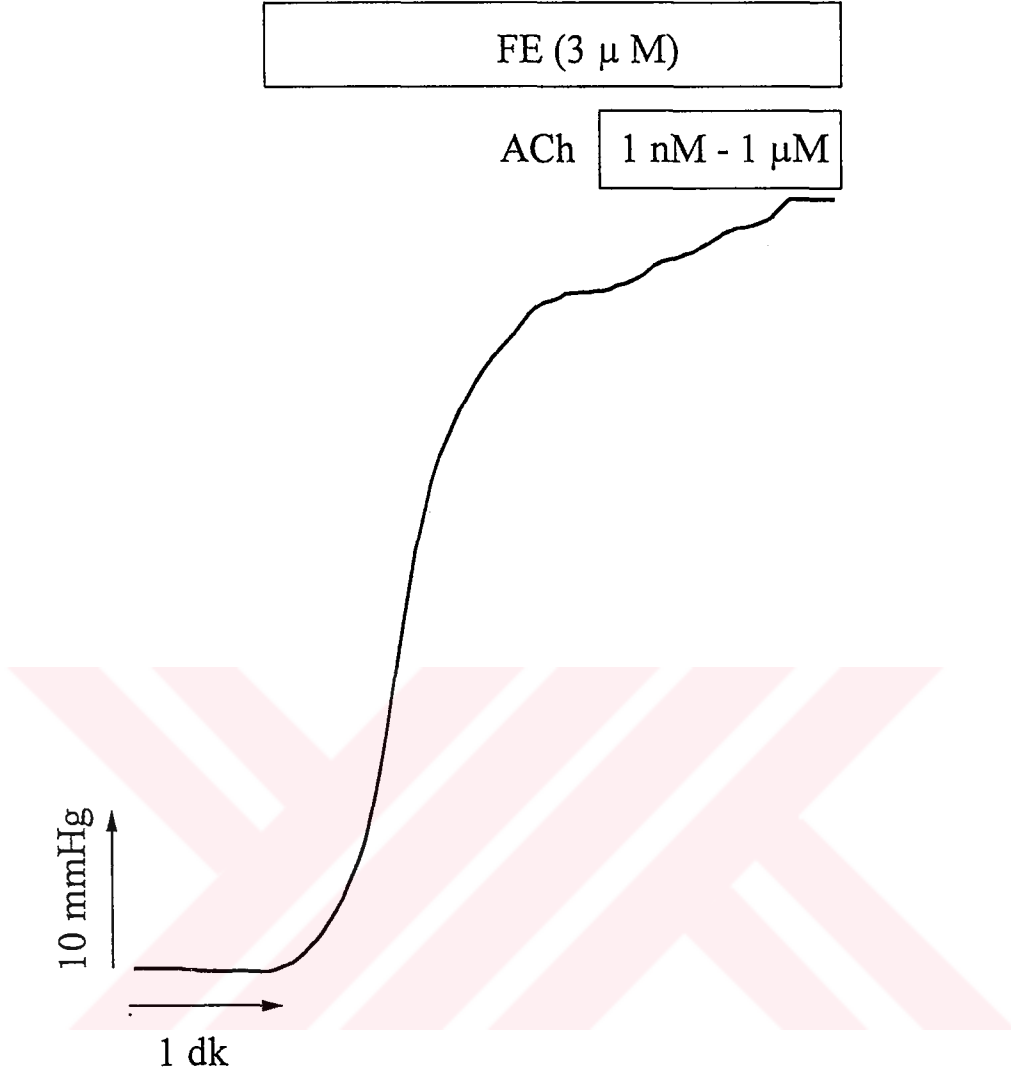
PTK preperatından farklı olarak bu yöntemde merkezi arter kanüle edilen noktanın 3-4 cm ilerisinden ikinci bir branül ile kanüle edilerek damar kulaktan çıkartılmadan, kulak dokusu üzerinde orijinal yerinde perfüze edilmiştir. Perfüze tüm kulak yönteminde uygulanan tüm aşamalar bu yöntemde de uygulanmıştır.

C. İzole merkezi arter (İzole organ banyosu deneyleri)

Tavşan kulağından alınan yaklaşık 3 mm uzunluğundaki merkezi arter ringleri %5 CO_2 +% 95 O_2 ile gazlandırılan, 25 ml hacminde, sıcaklığı $37^\circ C$ 'de sabit tutulan ve fizyolojik tuz çözeltisi (Krebs çözeltisi mM bileşimi: KCl 4.7, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.17, $NaHCO_3$ 25, KH_2PO_4 1.2, NaCl 118, glikoz 11.1) içeren organ banyosuna alınmışlardır. İnce paslanmaz çelikten uygun biçimde hazırlanmış üçgen şeklindeki tutucular halka (ring) şeklinde kesilmiş damarların lümenleri



Şekil 7: Perfüze tüm kulak preparatında Fenilefrin (FE)-Asetilkolin (ACh) konsantrasyon-yanıt ilişkisini gösteren bir deney kaydı. Endoteli sağlam dokuda FE (3µM) ile gözlenen vazokonstriksiyonun ACh (1-100 nM) ile önlenmesi.



Şekil 8: Perfüze tüm kulak preparatında (PTK) endotelsizleştirme sonucu oluşturulan FE-ACh konsantrasyon-yanıt ilişkisini gösteren bir deney kaydı. 5 dk distile su ile perfüze edilerek endotelsizleştirilmiş PTK preparatında, FE (3 μ M) tarafından oluşturulan vazokonstriksiyonun üzerine ACh (1 nM-1 μ M) etkisi.

içinden geçirilmiştir. Herbir halkanın lümeni içinden geçirilen iki tel tutucudan biri damarı sabitlemek üzere organ banyosunun askısına, diğeri ise uygun uzunluktaki ip aracılığı ile izometrik kuvvet transdüsörüne bağlanmıştır. 15 dakikalık stabilizasyon döneminden sonra, merkezi arterler laboratuvarımızdaki ön çalışmalarla belirlenmiş 750 mg'lık öngerilim düzeyine kademeli olarak gerilmişlerdir. Öngerilim sonrası, damarlar 1 saatlik stabilizasyon süresince 15 dakikalık aralarla Krebs çözeltisi ile yıkanmışlardır. Stabilizasyon sonrası ring preparatları 60 mM KCl ile stimüle edilmişlerdir. Bu uygulama dokuları yalnızca deney protokolu öncesi vazokonstriktif ajanla stimüle etmek amacıyla yapılmıştır.

İzole organ banyosunda izole merkezi arter ringleri ile yapılan deneylerin bir bölümü ayrı bir hayvan grubunda ve farklı bir protokol ile gerçekleştirilmiştir. KCl (10 mM-120mM), 5-HT (10^{-9} - 3.10^{-5} M), NA (10^{-9} - 3.10^{-5} M) ve PDB (10^{-9} - 2.10^{-8} M) kümülatif doz cevap eğrileri alınarak her bir ajanın maksimal doza göre yaklaşık %30'luk kastırma yapan konsantrasyonları tespit edilmiştir. Sırasıyla KCl (35.9 mM), NA (10^{-7} M), 5-HT (3.10^{-7} M) ve PDB (10^{-8} M) ile kastırılan dokulara plato seviyesinde iken CPA (10^{-5} M) uygulandı.

Her konsantrasyon-yanıt eğrisinden sonra dokular 30 dk dinlenmeye bırakılmış ve bu sırada her 15 dakikada bir banyo çözeltisi değiştirilmiştir.

İzole organ banyosu deneylerinde kullanılan aygıtlar

Organ banyosu

Deneyler 25 ml'lik Schuler tipi izole organ banyolarında gerçekleştirilmiştir. Banyolar alttan doldurma ve üstten boşaltma yöntemiyle yıkanmıştır.

Termostatik kontrol

İzole organ banyosu deneyleri boyunca Krebs çözeltisi sıcaklığı, cam organ banyolarının gömlek kısımlarından geçen suyun termostatlı sirkülatör (Nüve SB100, Ankara, Türkiye) yardımıyla sirküle edilmesiyle 37°C sıcaklıkta sabit tutulmuştur.

Transdüsr ve deney kayıtları

Agonist uygulanmasına bağlı olarak damar düz kasının gerilimindeki izometrik değişimler izometrik kuvvet transdüsrü (Grass FT03) ile bir bilgisayar sistemine (IOSlab version 3.23 MS8, EMKA technologies, Paris, Fransa) aktarımı sağlanarak izlenmiş ve kayıtları yapılmıştır.

D. Araştırmada kullanılan ilaçlar

Araştırmada kullanılan ilaçlar aşığıdaki tabloda verilmektedir.

Farmakolojik ajan	Üretici firma
Potasyum klorür	Merck
Noradrenalin	Sigma
Serotonin	Sigma
Fenilefrin HCl	Sigma
Asetilkolin HCl	Merck
İndometazin sodyum	Merck
N ^o -nitro-L-arginin	Acros Organics
Siklopiazonik asit	Sigma
Forbol dibütirat	Sigma
Verapamil HCl	Bayer

E. İlaç çözeltilerinin hazırlanması

Asetilkolin: Stok çözeltili (10^{-1} M), distile su ile taze olarak hazırlanmış, ileri dilüsyonlar %0.9'luk sodyum klorür çözeltilisi ile yapılmıştır.

Fenilefrin HCl: Stok çözeltili (10^{-1} M), distile su ile taze olarak hazırlanmış, ileri dilüsyonlar %0.9'luk sodyum klorür çözeltilisi ile yapılmıştır.

Serotonin: Stok çözelti (10^{-2} M), distile su ile taze olarak hazırlanmış, ileri dilüsyonlar %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile yapılmıştır.

KCl: Stok çözeltisi (2 M) distile su ile taze olarak hazırlanmıştır.

N^o-nitro-L-arginin: Distile suda çözülüp Krebs çözeltisi içerisine banyo final konsantrasyonu 10^{-4} M olacak şekilde katılmıştır.

Noradrenalin (NA): pH=4'te tutulan bir stok çözeltiden taze olarak hazırlanmış ve sulu çözeltideki oksidasyonunun önlenmesi için 10^{-4} M askorbik asit (C vitamini) içermektedir. NA stok çözeltisi bu şekilde 10^{-2} M hazırlanmış ve dilüsyonlar % 0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile taze olarak hazırlanmıştır.

Siklopiazonik asit (CPA): Stok çözeltisi 10^{-2} M olacak şekilde %50 DMSO ile hazırlanmış ve ileri dilüsyonlar distile su ile yapılmıştır.

Forbol dibütirat (PDB): Stok çözeltisi 10^{-3} M olacak şekilde DMSO'nun sudaki %50'lik çözeltisi ile hazırlanmış ileri dilüsyonlar distile su ile yapılmıştır.

Verapamil: Stok çözeltisi 10^{-2} M olacak şekilde distile su ile taze olarak hazırlanmış ve ileri dilüsyonlar distile su ile yapılmıştır.

F. Fizyolojik tuz çözeltileri

İçerik	Krebs(mM)	Tyrode(mM)
NaCl	118	136.9
KCl	4.7	2.7
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.5	1.8
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.17	-
MgCl ₂	-	1.04
KH ₂ PO ₄	1.2	-
NaH ₂ PO ₄	-	0.42
Glukoz	11.1	5.55
NaHCO ₃	25	11.9
Gaz	%5 CO ₂ + %95 O ₂	%5 CO ₂ + %95 O ₂
Temperatür	37°C	Oda sıcaklığı (25°C)

G. İstatistiksel Analiz

İki ve ikiden fazla ortalamalar arasında farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı sırasıyla Eşleştirilmiş Student t testi ve Newman Keul testi ile belirlenmiştir. $P=0.05$ düzeyindeki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Bulgulardaki tüm değerler ortalama \pm OSH (Ortalamanın Standart Hatası) olarak bildirilmiştir. n kullanılan denek sayısını göstermektedir. Maksimum etki (E_{max}) ve %50 maksimum etki oluşturan ilaç konsantrasyonu (EC_{50}) kademeli konsantrasyon yanıt-eğrileri oluşturulduktan sonra en küçük kareler yöntemi ile iterasyon yapan nonlinear eğri yerleştirme programı KaleidaGraph kullanılarak hesaplanmıştır. İstatistiksel karşılaştırmalarda EC_{50} değerlerinin (pD_2 ; %50 maksimal yanıt oluşturan agonist konsantrasyonunun negatif logaritması) geometrik ortalamaları kullanılmıştır.

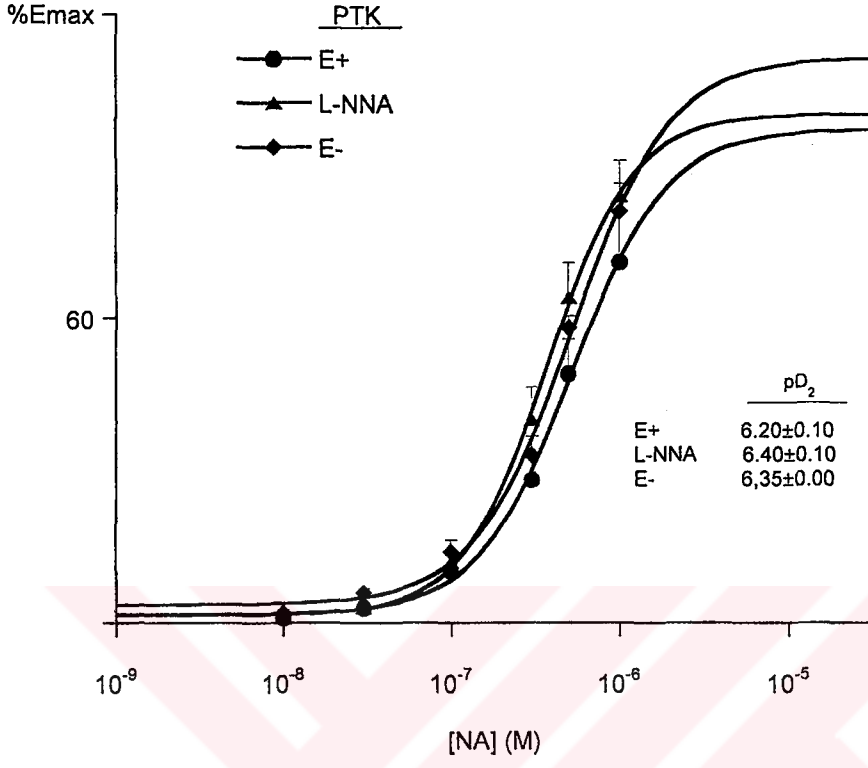
BULGULAR

I. *In situ* (tavşan perfüze tüm kulak, PTK, tavşan perfüze merkezi arter, PMA preparatı) ve *in vitro* (tavşan merkezi izole arter, İMA) deney modellerinde agoniste-bağlı kademeli konsantrasyon-yanıt ilişkisinin incelenmesi

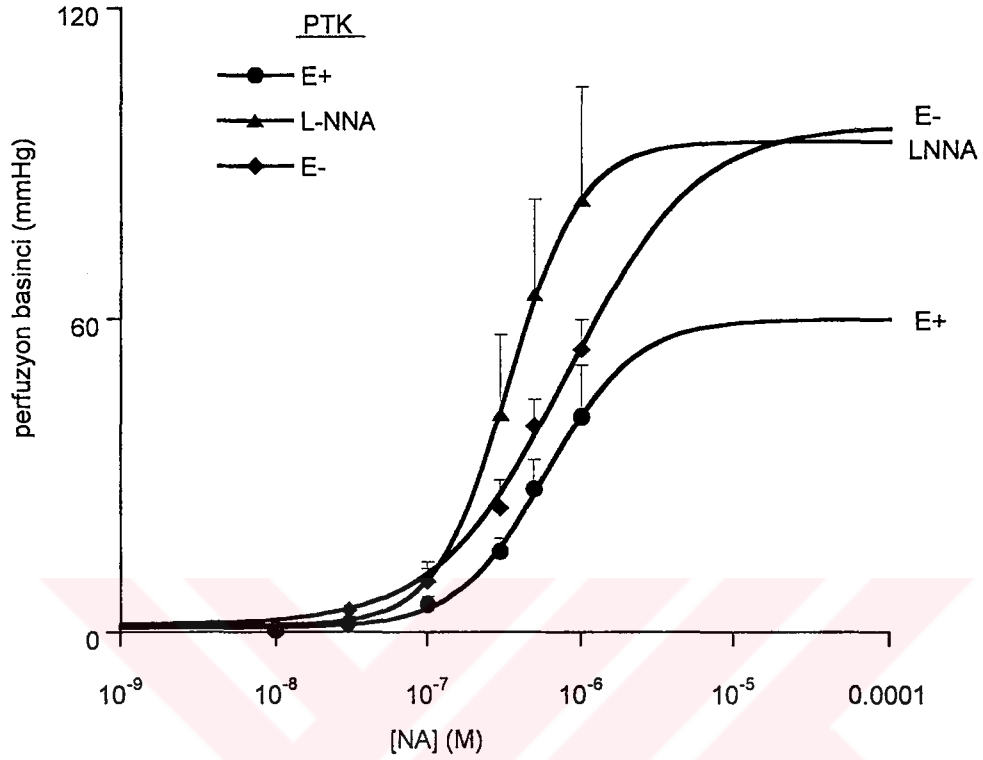
A. PTK preparatında NA konsantrasyon-yanıt ilişkisi

Bu preparatta yapılan çalışmalar üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Deneyin ilk aşamasında, NA (10^{-8} - 10^{-6} M) konsantrasyon-yanıt ilişkisi endoteli sağlam (+E) dokuda test edilmiştir. Bu işlemin ardından aynı preparatta 10^{-4} M L-NNA ile NO sentezi (NOS) inhibe edilerek konsantrasyon-yanıt ilişkisi tekrar oluşturulmuştur. Son aşamada ise PTK preparatı, 5 dk distile su ile perfüze edilerek hipotonisiteye bağlı endotelsizleştirilme işlemi gerçekleştirilmiş ve daha sonra NA kademeli konsantrasyon-yanıt ilişkisi tekrarlanmıştır (Şekil 9). Her üç aşamada da ileri derecede vazokonstriksiyona bağlı olarak damar lümeninden perfüzyon çözeltisinin geçişini mekanik olarak engellendiği için submaksimal yanıt oluşturan NA konsantrasyonunun ($1 \mu\text{M}$) üstüne çıkılamamıştır. Ayrıca, deneyin her aşamasında 10^{-6} M fenilefrin (FE) ile kasılma yanıtı alındıktan sonra asetilkolin (ACh) (10^{-9} - 10^{-6} M) ile gevşeme yanıtları kontrol edilmiştir. Böylelikle NOS inhibisyonu ve endotelin yok edilmesiyle ACh gevşeme yanıtlarının kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 8).

Perfüzyon basıncı (mmHg), NOS inhibisyonunda ve endotel yokluğunda NA'nın kademeli olarak artan herbir konsantrasyonunda (10^{-8} - 10^{-6} M) orantısız olarak artmıştır. NOS inhibisyonu sonucunda ve endotel yokluğunda gerçekleşen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 10). Aynı deney preparatında yapılan 3 ayrı işlem sonucu NA konsantrasyon-yanıt ilişkileri incelendiğinde pD_2 değerleri arasında da anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür (Şekil 9).



Şekil 9: PTK preparatında NA (10^{-8} - 10^{-6} M) konsantrasyon-yanıt ilişkisi. NA konsantrasyon-yanıt ilişkisi. Endotel varlığında, E+ (●); NOS inhibisyonu altında (▲) ve endotel yokluğunda, E- (◆) (n=5). Grafikte görülen her bir değer ayrı ayrı hesaplanan kendi Emaks değeri cinsinden normalize edilmiştir. Grafikte görülen pD_2 değerleri, bireysel olarak hesaplanan pD_2 değerlerinin ortalamasıdır. Değerler ortalama ve ortalamanın standart hatası (Ort±Ort.S.H.) olarak verilmektedir. Not: Perfüze preparatının vasküler yatağında ileri düzeyde vazokonstriksiyona bağlı mekanik tıkanmaya neden olduğu için NA 10^{-6} M'nin üzerinde uygulanamamıştır.



Şekil 10: PTK preparatında endotel varlığında (E+), NOS inhibisyonunda (+L-NNA) ve endotel yokluğunda (E-) NA yanıtları (mmHg). NA konsantrasyon-yanıt eğrisinin 1 μ M'dan sonraki kısmı ekstrapole edilmiştir (n=5).

B. PMA preparatında NA konsantrasyon-yanıt ilişkisi

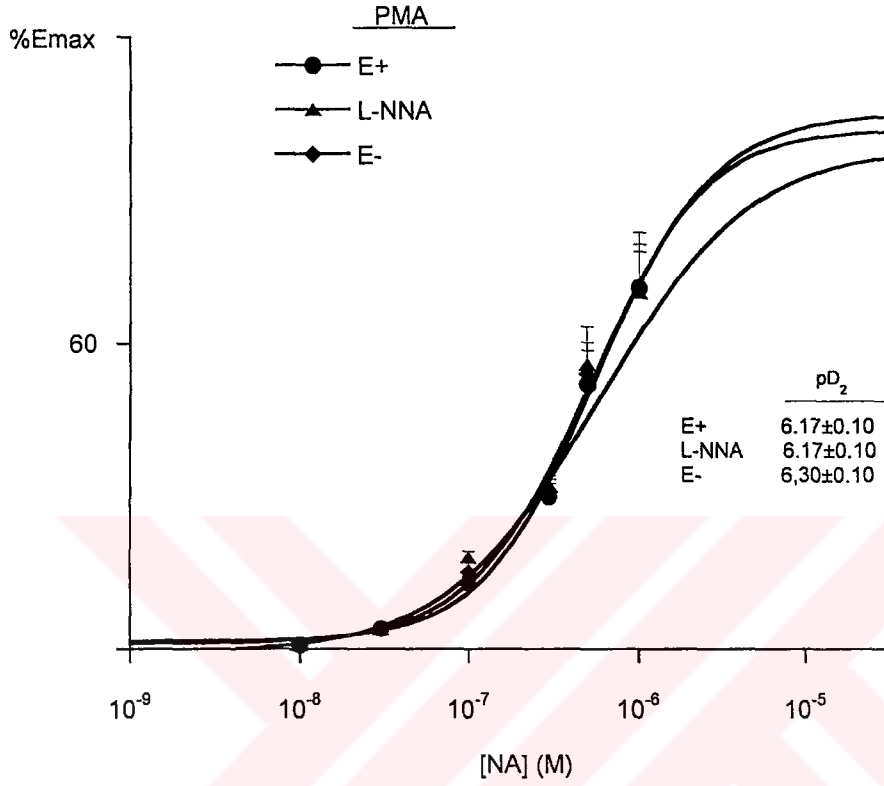
Bu preparatta yapılan çalışmalar üç aşamada gerçekleşmektedir. Deneyin ilk aşamasında, NA konsantrasyon-yanıt ilişkisi endoteli sağlam dokuda test edilmiştir. Bu işlemin ardından aynı preparatta 10^{-4} M L-NNA ile NOS inhibe edilerek konsantrasyon-yanıt ilişkisi tekrar oluşturulmuştur. Son aşamada ise, PMA preparatı 5 dk distile su ile perfüze edilerek endotelsizleştirilme işlemi gerçekleştirilmiş ve daha sonra NA kademeli konsantrasyon-yanıt ilişkisi tekrar oluşturulmuştur (Şekil 11). Ayrıca deneyin her aşamasında 10^{-6} M PE yanıtları üzerinde ACh (10^{-9} - 10^{-6} M) ile gevşeme yanıtları kontrol edilmiştir. Böylelikle, NOS inhibisyonu ve endotelin yok edilmesiyle ACh gevşeme yanıtlarının kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 8).

Perfüzyon basıncı (mmHg), NOS inhibisyonunda ve endotel yokluğunda NA'nın kademeli olarak artan her bir konsantrasyonunda (10^{-8} - 10^{-6} M) orantısız olarak artmıştır. NOS inhibisyonu sonucunda perfüzyon basıncı, özellikle 10^{-7} - 10^{-6} M konsantrasyon aralığında yaklaşık 2-3 kat artmıştır ($P<0.05$, $n=5$). Endotelsiz dokuda gözlenen artış ise istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 12). Aynı deney preparatında yapılan 3 ayrı işlem sonucu NA konsantrasyon-yanıt ilişkileri incelendiğinde pD_2 değerleri arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil 11).

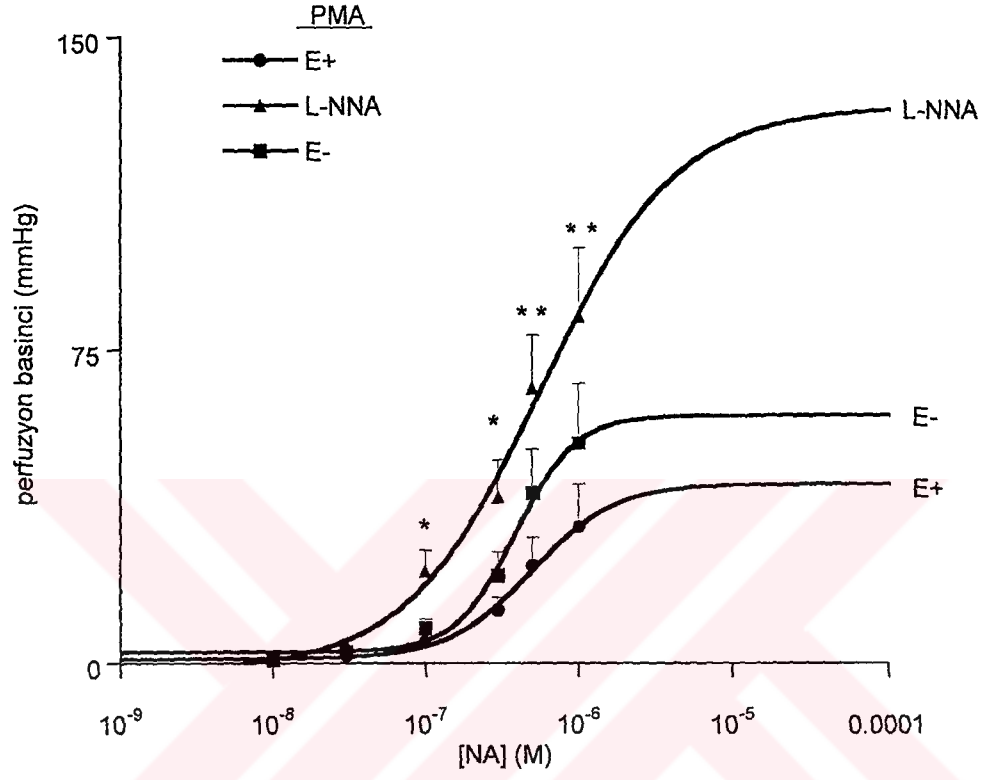
C. İMA preparatında NA konsantrasyon-yanıt ilişkisi

Tavşan merkezi kulak arteri ile organ banyosunda yapılan denemelerde endotel kaynaklı gevşemeler alınamamıştır. Damar çapının oldukça küçük (≤ 0.8 mm) olması manipülasyon sırasında endotelin kaybolmasına neden olduğunu düşündürmüştür. Bu nedenle tüm İMA ringleri endotelsiz olarak değerlendirilmiştir. İMA ringlerinde NA (10^{-9} - $3 \cdot 10^{-5}$ M) konsantrasyon-yanıt ilişkisi oluşturulmuştur (Şekil 13).

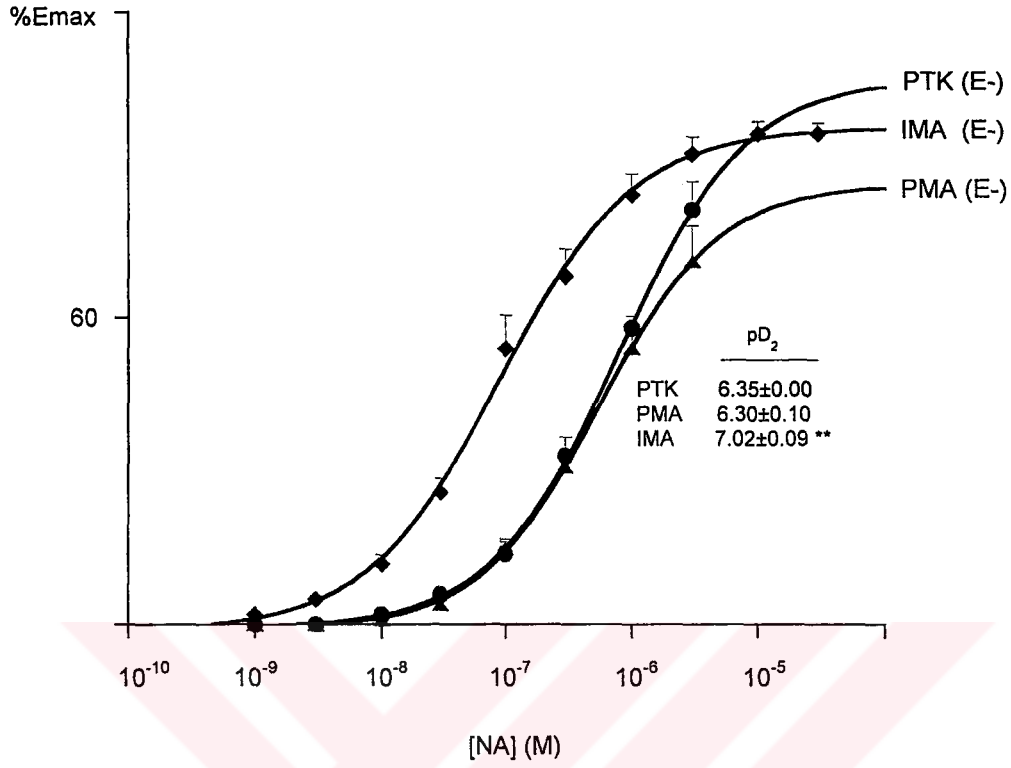
Şekil 9 ve 11'deki PTK ve PMA preparatlarının NA kademeli konsantrasyon-yanıt ilişkileri Şekil 13'de karşılaştırma amacıyla tek grafik altında tekrar gösterilmiştir.



Şekil 11: PMA preparatında NA (10^{-8} - 10^{-6} M) konsantrasyon-yanıt ilişkisi.. NA konsantrasyon-yanıt ilişkisi. Endotel varlığında, E+ (●); NOS inhibisyonu altında (▲) ve endotel yokluğunda, E- (◆) (n=5). Grafikte görülen her bir değer ayrı ayrı hesaplanan kendi Emaks değeri cinsinden normalize edilmiştir. Grafikte görülen pD_2 değerleri, bireysel olarak hesaplanan pD_2 değerlerinin ortalamasıdır. Değerler ortalama ve ortalamanın standart hatası (Ort±Ort.S.H.) olarak verilmektedir. Not: Vasküler yatakta ileri düzeyde vazokonstriksiyona bağlı mekanik tıkanmaya neden olduğu için NA 10^{-6} M'nin üzerinde uygulanamamıştır.



Şekil 12: PMA preparatında endotel varlığında (E+); NOS inhibisyonunda (+L-NNA) ve endotel yokluğunda (E-) NA yanıtları (mmHg). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, eşleştirilmiş t-testi, $n=5$). NA konsantrasyon-yanıt eğrisinin $1 \mu\text{M}$ 'dan sonrası ekstrapole edilmiştir.



Şekil 13: PTK, PMA ve İMA preparatlarında NA (10^{-8} - 10^{-6} M) konsantrasyon-yanıt ilişkisi. Endotel yokluğunda, (PTK) (●); (PMA) (▲) ve İMA (◆) preparatlarında NA'nın oluşturduğu kasılma yanıtları gösterilmektedir (n=5). Grafikte görülen her bir değer ayrı ayrı hesaplanan kendi Emaks değeri cinsinden normalize edilmiştir. Grafikte görülen pD_2 değerleri, bireysel olarak hesaplanan pD_2 değerlerinin ortalamasıdır. Not: Karşılaştırma amacıyla Şekil 9 ve 10'daki PTK ve PMA preparatlarının NA kademeli yanıt ilişkileri de yukarıda tekrar gösterilmiştir. Değerler ortalama ve ortalamanın standart hatası ($Ort \pm Ort.S.H.$) olarak verilmektedir. (** $P < 0.01$ Newman-Keul testi). PTK ve PMA preparatlarında NA konsantrasyon aralığı (10^{-8} - 10^{-6} M) iken bu aralık İMA preparatında 3.10^{-9} - 3.10^{-5} M'dir.

İn situ ve in vitro deney modellerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesinden sonra SR Ca^{+2} -ATPaz inhibisyonunun kontraksiyondaki rolü araştırılmıştır. Çalışmanın bu aşaması izole organ banyolarında yapılmıştır. Bunun üç nedeni: 1) kullanılacak ilaçların pahalı ve miktarlarının az olması, 2) perfüzyon yönteminde vazokonstriktör ajanların maksimal yanıt oluşturan konsantrasyonlarına çıkılamaması ve 3) perfüzyon modellerinde birden fazla dokuda paralel deneme yapmanın pratik olmamasıdır.

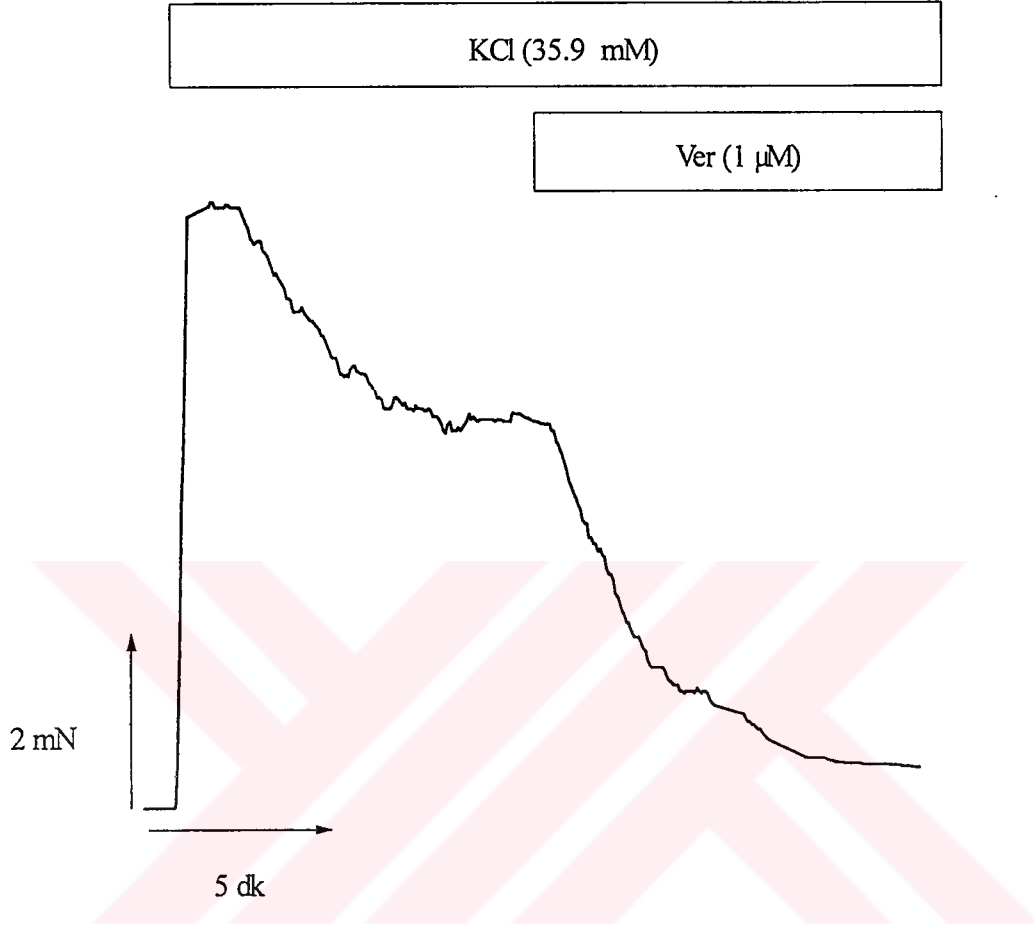
II. Sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} pompasının (SR Ca^{+2} -ATPaz) inhibisyonunun tavşan İMA kontraksiyonlarındaki rolü

SR Ca^{+2} -ATPaz'ın selektif bir inhibitörü olan 10^{-5} M siklopiazonik asitin (CPA) Ca^{+2} _i depolarını boşaltarak [Ca^{+2}]_i artırdığı bilinmektedir. Ancak CPA bu konsantrasyonda İMA preparatında kontraksiyona neden olmamıştır.

A. CPA'nın KCl yanıtları üzerine etkisi

Ekstraselüler kalsiyum iyonunun hücre membranının depolarizasyonuna bağlı olarak açılan L-tipi Ca^{+2} kanallarından girerek intraselüler ortamda artan konsantrasyonunun damar düz kasının kontraksiyonuna kenetli olduğu bilinmektedir (Bkz. Elektromekanik kenetlenme mekanizması). Bu aşamada 10^{-5} M CPA kullanımına bağlı olarak artan Ca^{+2} _i konsantrasyonunun, KCl kontraksiyonları üzerine aditif bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Diğer bir deyişle, CPA'nın neden olduğu [Ca^{+2}]_i artışının kontraksiyona kenetlenebilmesi için membran depolarizasyonu ile hücrenin uyarılması mı gerekmektedir?

L-tipi Ca^{+2} kanallarının KCl kontraksiyonundaki rolünü irdelemek için önce 30 mM KCl plato kontraksiyonu sırasında L-tipi Ca^{+2} kanal blokörü verapamil (10^{-6} M) uygulanmış ve % 100'e yakın bir gevşeme gözlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14: İMA preparatında KCl kontraksiyonu üzerine verapamilin etkisini gösteren bir deney kaydı.

30 mM KCl ile kasılma yanıtı alındıktan sonra plato seviyesinde iken 10^{-5} M CPA uygulandığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş ve 10^{-6} M verapamil ile yine gevşeme yanıtı oluşturulmuştur (Şekil 15, 18).

B. CPA'nın NA yanıtları üzerine etkisi

Reseptör-aracılı kontraksiyon (Bkz. Farmakomekanik kenetlenme mekanizması) oluşturan bir agonist olan NA'nın 10^{-5} M CPA'nın neden olduğu intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışı kontraksiyona kenetleyip kenetleyemeyeceği araştırılmıştır. Diğer bir deyişle CPA ile artan intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun kasılmaya neden olması için intraselüler sinyal transdüksiyonu mu aktive olmalıdır? Bu amaçla NA yanıtları üzerine CPA'nın etkisi araştırılmıştır.

10^{-7} M ($\sim EC_{50}$) NA ile kasılma yanıtı platoya eriştikten sonra kendiliğinden gevşemiş ve bu yanıt platoya ulaştığı sırada 10^{-5} M CPA uygulanmıştır. Daha sonra 10^{-6} M verapamil ile gevşeme yanıtı oluşturulmuştur (Şekil 16). Bazı dokularda yapılan deneylerde 10^{-7} M NA uygulandıktan sonra CPA verilmemiştir. CPA verilen dokularla aynı süre içerisindeki alınan yanıtlar karşılaştırıldığında anlamlı bir farkın olmadığı gözlenmiştir (Şekil 18).

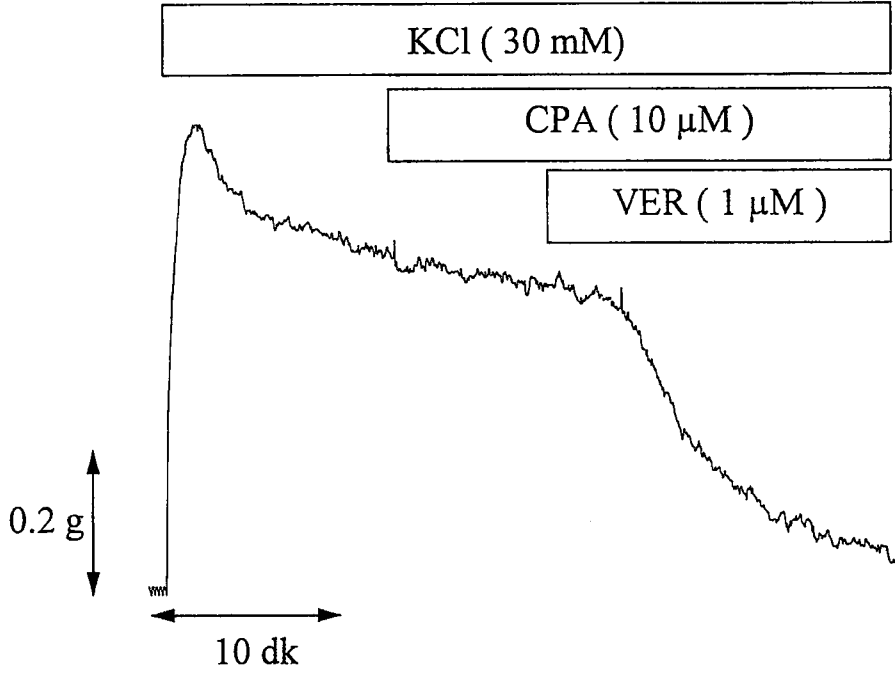
C. CPA'nın 5-HT yanıtları üzerine etkisi

Prostaglandin (PG) ve endotelin (ET) reseptörlerinin bazı özel subsarkolemmal bölgeler üzerindeki membranlarda lokalize olabilecekleri önerilmiştir(14). Buna bağlı olarak, kafeine duyarsız SR'leri boşalttığı gösterilen 5-HT reseptörlerinin 10^{-5} M CPA'nın artırdığı hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu olası farklı reseptör-efektör lokalizasyonu nedeniyle kontraksiyona kenetleyip kenetleyemeyeceği araştırılmıştır.

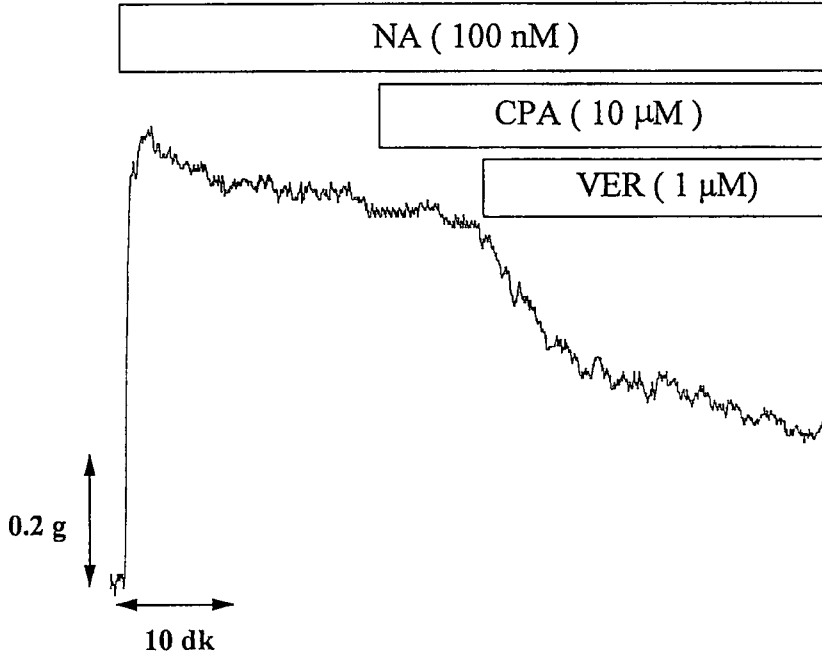
Yaklaşık %30 maksimal kasılma yanıtı oluşturan $3 \cdot 10^{-7}$ M 5-HT ile kasılma yanıtı platoya ulaşıktan sonra 10^{-5} M CPA uygulanmıştır. CPA, KCl ve NA ile yapılan deneylerden farklı olarak CPA, 5-HT'nin neden olduğu kasılma yanıtlarını anlamlı olarak ($P < 0.01$, eşleştirilmiş t testi, $n=5$) artırmış ve daha sonra doku 10^{-6} M verapamil ile gevşemiştir (Şekil 17). Bazı dokularda yapılan deneylerde $3 \cdot 10^{-7}$ M 5-HT uygulandıktan sonra CPA

verilmemiştir. Sadece 5-HT verilen dokularla aynı süre içerisindeki gözlenen yanıtlarla karşılaştırıldığında potansiyalizasyonunun 5-HT yanıtlarının zaman içerisinde azalmasını kompanse ettiği de görülmüştür ($P<0.01$, eşleştirilmiş t testi, $n=5$). (Şekil 18).

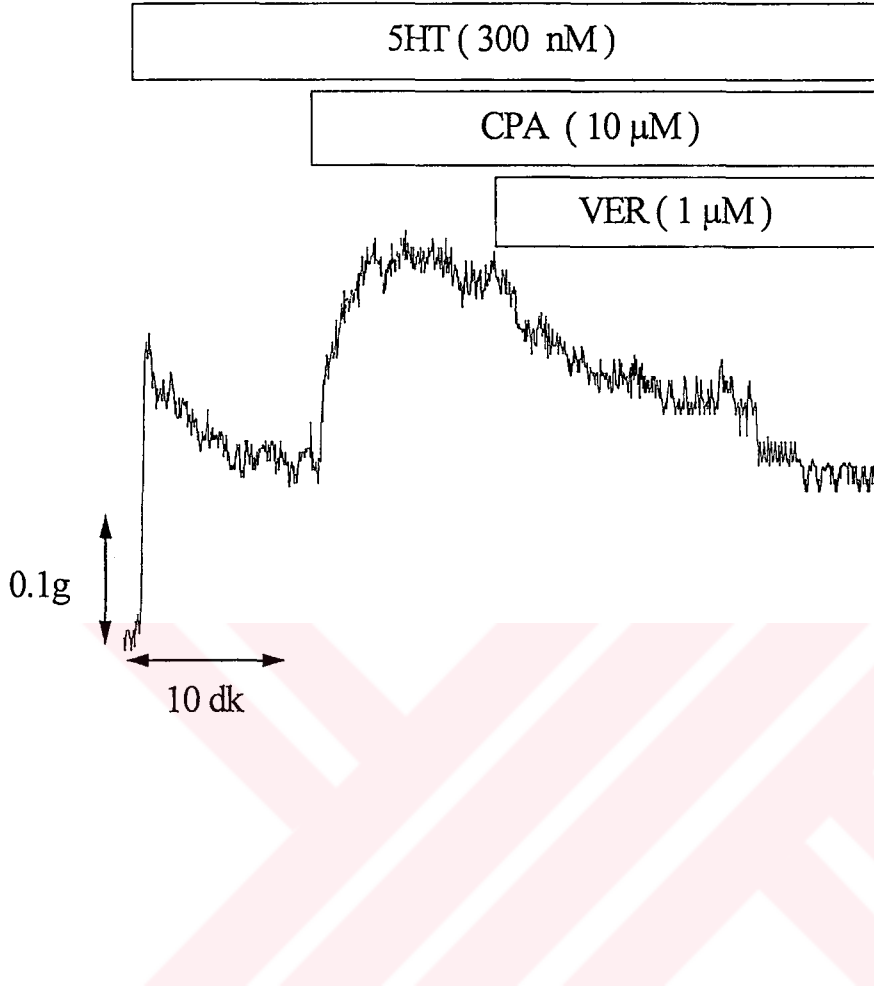




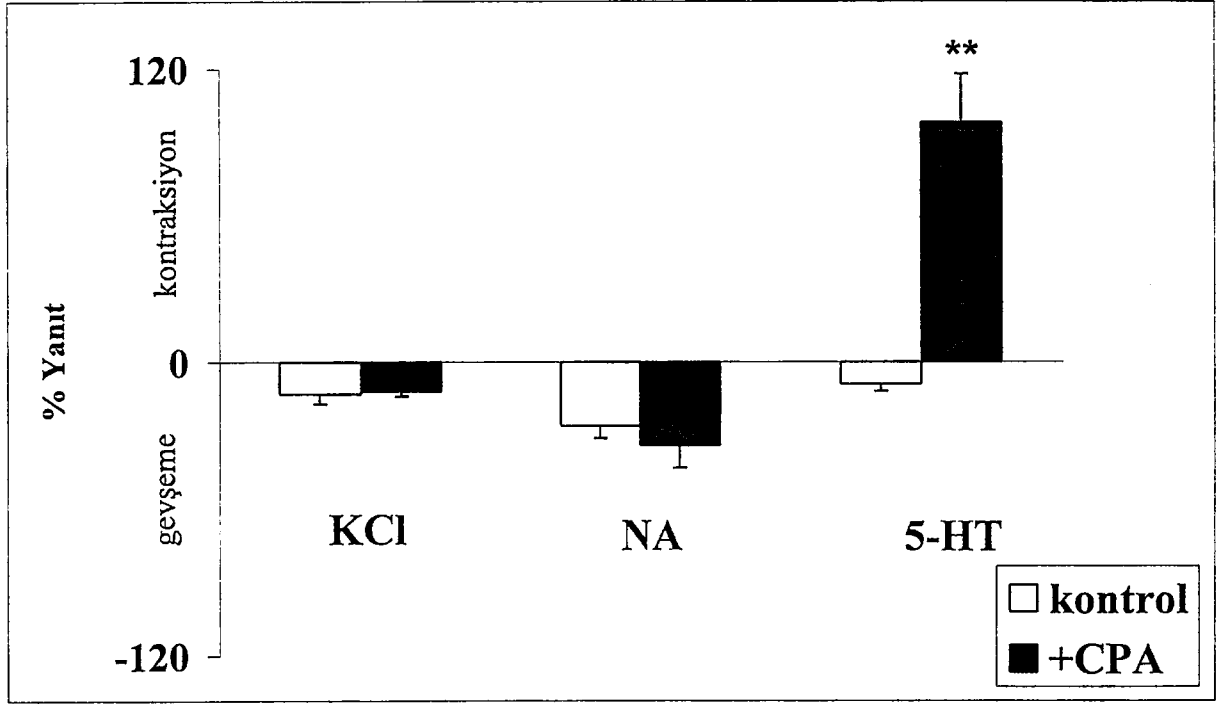
Şekil 15: İMA preparatında KCl kontraksiyonu üzerine CPA'nın ve verapamilin (VER) etkilerini gösteren bir deney kaydı.



Şekil 16: İMA preparatında NA kontraksiyonu üzerine CPA'nın ve verapamilin etkilerini gösteren bir deney kaydı.



Şekil 17: İMA preparatında 5-HT kontraksiyonu üzerine CPA'nın ve verapamilin (VER) etkilerini gösteren bir deney kaydı.



Şekil 18: KCl (30mM), NA (100 nM) ve 5-HT (300 nM) maksimum plato kontraksiyon yanıtları üzerine CPA'nın etkisi. Bütün yanıtlar % agonist plato yanıtına normalize edilmiştir, (**P<0.01, eşleştirilmiş t testi, n=5).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Büyük çaplı damarlarda varlığı önerilen “intraselüler Ca^{+2} depolarının boşalmasına bağlı olarak artan intraselüler Ca^{+2} 'nin özel bir kompartmanda hapsedilerek kontraksiyona kenetlenmediği” (literatür) hipotezini periferik damarlar için de test etmek amacıyla öncelikle uygun deney modelinin seçimine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu nedenle önce üç farklı deney modelinde reseptör-aracılı yanıtları gözlemledikten sonra amacımıza uygun yöntem ile hipotezimizi test ettik.

I. *İn situ* (tavşan perfüze tüm kulak ve perfüze merkezi arter preparatı) ve *in vitro* (tavşan izole merkezi arter) deney modellerinde agoniste bağlı kademeli konsantrasyon-yanıt ilişkilerinin incelenmesi

Periferik damar sistemini arterlerden venlere kadar bir bütün olarak temsil edebilme özelliği taşıyan bir deney modeli olan (33) tavşan perfüze tüm kulak (PTK) ve perfüze merkezi arter (PMA) preparatlarında NA kademeli konsantrasyon-yanıt profillerinde:

1) %50 maksimal yanıt oluşturan agonist konsantrasyonunun (EC_{50}) endotel varlığında, nitrik oksit sentezi inhibisyonunda ve endotel yokluğunda anlamlı olarak değişmemesinin (pD_2 değerleri sırasıyla PTK için 6.20 ± 0.10 , 6.40 ± 0.10 , 6.35 ± 0.00 ; PMA için 6.17 ± 0.10 , 6.17 ± 0.10 , 6.30 ± 0.10 , $n=5$, Newman Keul testi) (Şekil 9, 11).

2) PMA preparatında vasokonstriksiyonun göstergesi olan perfüzyon basıncının (mmHg), NOS inhibisyonu sonucunda NA kademeli (10^{-7} - 10^{-6} M) yanıtlarının orantısal olarak anlamlı (yaklaşık 2-3 kat) artışı, endotel yokluğunda ise bu artışın azalmakla beraber endotel varlığında alınan (kontrol) yanıtlardan fazla oluşu,

sözkonusu periferik sistemde vasküler tonusun endotelial sistem tarafından tonik olarak kontrol edildiğini düşündürmektedir. NOS inhibisyonu sonucunda perfüzyon basıncındaki artışın endotel yokluğundaki artıştan belirgin bir şekilde fazla olması vasküler tonus üzerinde nitrik oksitin devamlı bir gevşetici etkisi olduğunu göstermektedir. Ayrıca, endotel yokluğunda perfüzyon basıncındaki artışın NOS inhibisyonu varlığında gözlenen değerlere gelmemesi (Şekil 10, 12) endotelden gevşetici faktörlerin yanında kastırıcı ajanların da salıverildiğini göstermektedir. PMA preparatından farklı olarak, PTK preparatında NOS inhibisyonuna ve endotelsizleştirmeye bağlı olarak perfüzyon basıncındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmaması PTK preparatının arterlerden venlere kadar tüm periferik damar sistemini içermesinden kaynaklanabilir (Şekil 12). Damar içinden hava geçirilerek endotelsizleştirilen bir PTK preparatında da bolus enjeksiyon şeklinde verilen NA endotelli dokudakine oranla istatistiksel olarak anlamlı olmayan yanıt artışına neden olmuştur (19).

Tavşan kulak merkezi arterin iki ucunun kanülasyonu ile ven sisteminin elimine edilerek perfüze edilen PMA preparatında endotel varlığında, NOS inhibisyonu sırasında veya endotel yokluğunda NA pD₂ değerleri ile PTK preparatında elde edilenler arasında anlamlı bir farkın bulunmaması tavşan kulak periferik vasküler sisteminde venöz dönüşün doku duyarlılığı üzerine belirgin bir katkısı olmadığını düşündürmektedir.

İzole organ banyolarında yapılan çalışmalarda merkezi kulak arterin çapını 1 mm'den küçük oluşu manipülasyon sonucu istenmeden damar endotelinin büyük ölçüde zedelenmesi ve fenilefrin kontraksiyonlarında asetilkolin gevşemelerinin görülmemesi nedeniyle izole merkezi arter (İMA) ring preparatları endotelsiz olarak değerlendirilmiştir. Endotelsizleştirilmiş PTK ve PMA preparatlarından elde edilen pD₂ değerleri (sırasıyla 6.35±0.00; 6.30±0.10) izole organ banyolarında test edilen İMA ring preparatlarından elde edilen verilerle karşılaştırıldığında ring preparatlarında NA'ya karşı doku duyarlığın anlamlı bir şekilde fazla olduğu görülmüştür (-E: pD₂: 7.02±0.09, P<0.01). Damar düz kas miktarının pD₂'yi etkilemediği bilindiğinden doku duyarlıkları arasındaki fark PTK ve PMA modellerinde damarı çevreleyen sağlam elastik dokunun optimal tonus oluşturma özelliğinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca izole merkezi arter preparatında sıcaklık 37°C iken, diğer iki preparatta 25°C'dir (4). Tavşan perfüze kulak preparatında yapılan

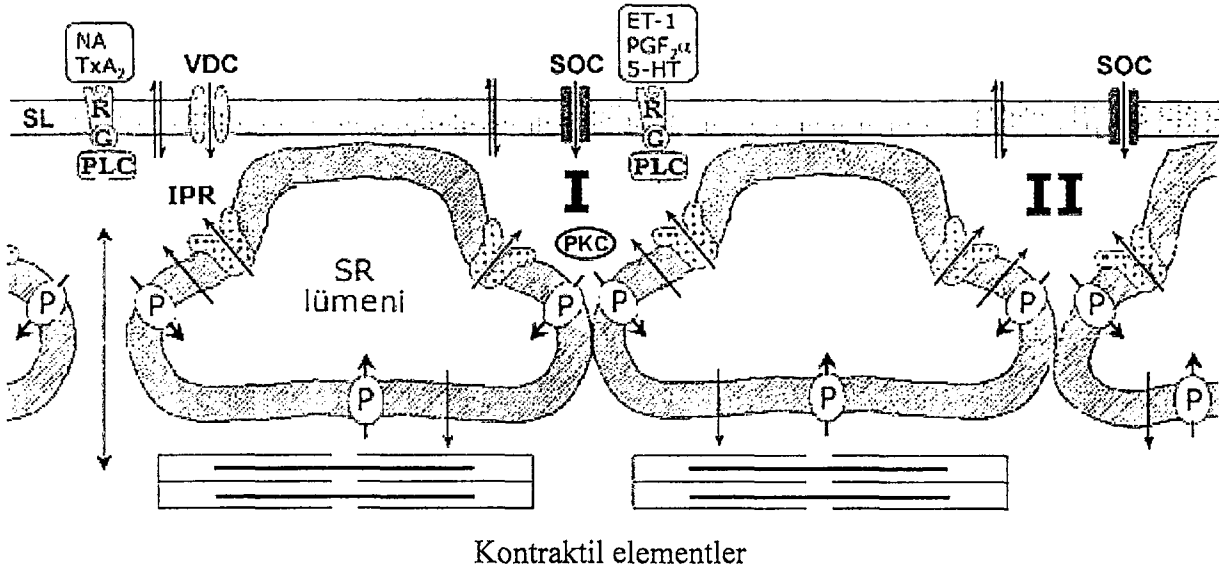
çalışmalarda araştırmacıların, çalışma sıcaklığını azaltma eğiliminde oldukları görülmektedir (19, 3). Sıcaklığın etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, sıcaklıkla reseptör internalizasyonunun doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir (39). Reseptör internalizasyonunun artması, membran üzerindeki reseptör sayısının azalmasına neden olmakta ve reseptör aracılı yanıtları azaltmaktadır. Buna karşılık sıcaklıktaki düşmenin plazma membranını oluşturan fosfolipidlerin akışkanlığını azaltması reseptör mobilizasyonunu ve konformasyonel değişimi azaltarak agonist-reseptör ilişkisini negatif yönde değiştirebilir. Bu bilgiler ışığında, oda sıcaklığında çalışılmasına karşın PTK ve PMA preparatlarında, agoniste olan duyarlılığın merkezi arter ringlerine oranla daha düşük olması, reseptör internalizasyondaki azalmanın ve membran akışkanlığındaki azalmanın birbirine zıt olan etkileri tarafından kompanse edilmesiyle açıklanabilir.

İn situ ve *in vitro* deney modellerinin karşılaştırmalı olarak incelemesinden sonra çalışmalarımızın ikinci bölümünü oluşturan SR Ca-ATPaz inhibisyonunun kontraksiyon üzerindeki etkisini araştırmak için izole organ banyoları kullanılmıştır. İzole organ banyosu seçiminin başlıca 3 nedeni vardır. Bunlar;

- Kullanılan ilaçların pahalı ve az miktarda olmaları.
- İleri vazokonstriksiyon sonucu damarın mekanik olarak tıkanarak ilacın damardan temizlenememesi nedeniyle PTK ve PMA preparatında vazokonstriktör ajanların maksimal yanıt oluşturan konsantrasyonlarına çıkılamaması.
- Perfüzyon modellerinde birden fazla dokuda paralel ve ardışık deneme yapmanın pratik olmaması.

II. Sarkoplazmik retikulum (SR) Ca-ATPaz inhibisyonunun tavşan izole merkezi kulak arter kontraksiyonlarındaki rolü

Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular Ca^{+2} _i depolarının boşalması sonucu aktive olduğu ileri sürülen depoya-bağımlı Ca^{+2} girişinin (store-operated Ca^{+2} , SOC) periferik damarlarda da kontraktıl aparat içermeyen (non-kontraktıl) sınırları sıkı bir şekilde kontrol edilen intraselüler kompartmanlarda “hapsedebileceğini” ve özelleşmiş bir non-kontraktıl kompartmanda artan Ca^{+2} konsantrasyonunun 5-HT reseptör aktivasyonu ile kontraksiyona kenetlenebileceğini önermektedir (Şekil 19, *model*).



Şekil 19: Vasküler düz kas hücresinde reseptör-efektör sistemlerinin sitozolik kompartmanlarla olan ilişkisini öneren model. 5-HT reseptörünün de PG ve ET-1 reseptörlerinin yanısıra özelleşmiş subsarkolemmal alanlara olası yakınlığı literatürde önerilen iki modelin (14, 40) bir bileşkesi üzerinde gösterilmektedir. VDC kanallarından giren kalsiyum iyonları direkt olarak kontraktıl aparatı aktive edebilmekte ancak SOC kanalları ile giren Ca^{+2} kontraktıl element içermeyen kompartmanlarda (I ve II) “hapsedilmekte” ancak uyarının derecesine bağlı olarak yine kompartman I’de “hapsedilmiş” PKC üzerinden kontraksiyona neden olduğu düşünülmektedir. R, reseptör; G, G proteini; PLC, fosfolipaz C; IPR, IP_3 reseptörü Ca^{+2} kanalı; SL, sarkolemma; SR, sarkoplazmik retikulum; P, SR Ca^{+2} pompası; VDC, voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalı; oklar aktif (SL Ca^{+2} pompası, Na^+/Ca^{+2} değiştiricisi) ya da pasif Ca^{+2} hareketini göstermekte.

Hipotezimiz 1) Ca^{+2}_i depolarını tamamen boşalttığı gösterilen 10 μ M CPA'nın herhangi bir kontraksiyona neden olmaması, 2) KCl- ve NA-kontraksiyonlarını 10 μ M CPA'nın artırmaması ve 3) 10 μ M CPA varlığında 5-HT kontraksiyonlarının anlamlı düzeyde potansiyelize olması gözlemleri ile desteklenmektedir.

SR Ca^{+2} pompası (SR Ca^{+2} -ATPaz) selektif inhibitörü olan siklopiazonik asitin (CPA) intraselüler Ca^{+2} depolarının tamamen boşalmasına neden olan konsantrasyonda (10 μ M) (34) intraselüler serbest Ca^{+2} konsantrasyonunu artırdığı halde önemli düzeyde kontraksiyona neden olmadığı bildirilmiştir (40). Çalışmalarımız sonucunda hücre membranını depolarize ederek membran potansiyelindeki değişimlere duyarlı L-tipi Ca^{+2} kanallarının açılması ile hücre içine giren ekstraselüler kalsiyumun intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunu artırarak kasılmaya neden olan KCl'nin kasılma yanıtları üzerinde yine sitozolik $[Ca^{+2}]$ artışına neden olan CPA'nın herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Sıçan (Sprague Dawley) torasik aortasında $[Ca^{+2}]_i$ artışı ve kontraksiyonun eşzamanlı olarak kaydedildiği diğer bir çalışmada, 33.2 mM KCl ile yaklaşık olarak aynı düzeyde $[Ca^{+2}]_i$ artışına neden olan 1 μ M CPA'nın KCl kontraksiyonlarını potansiyelize etmemesi nedeni ile CPA'nın kontraktıl aparat içermeyen bir intraselüler kompartmanda $[Ca^{+2}]_i$ artışına neden olabileceği önerilmiştir (40). Ferret (gelincik) portal veninde yapılan bir çalışmada ise CPA ile SR Ca^{+2} -ATPaz inhibisyonunun, diğer bir Ca^{+2}_i indikatörü olan aequorin ile izlenen $[Ca^{+2}]_i$ artışlarının KCl'nin neden olduğu kontraksiyonlarda değişiklik yapmadığı görülerek de aynı yorumda bulunulmuştur (1, 27). Tavşan femoral arteri ile yapılan diğer bir çalışmada SR Ca^{+2} ATPaz'ı inhibe eden doğal kaynaklı bir madde olan tapsigarginin artırdığı intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun kontraksiyona yol açmadığı gösterilmiştir (9). Sözkonusu üç çalışmada kullanılan damarlardan periferik bir damar olması nedeniyle farklılık gösteren tavşan izole merkezi arter preparatı ile yaptığımız çalışmalarda 10 μ M CPA'nın 30 mM KCl yanıtlarını potansiyelize etmemesi, olası non-kontraktıl kompartmanın küçük çaplı damarlarda da bulunduğunu önermektedir.

İntraselüler Ca^{+2} depolarının boşalması ile sınırlı bir non-kontraktıl kompartmanda artan Ca^{+2} konsantrasyonunun kontraksiyona kenetlenmesi için intraselüler sinyal transdüksiyonunun aktive edilmesinin gerekip gerekmediğini test etmek için KCl yerine

adrenoseptörleri aktive eden NA ile deney tekrarlandığında NA yanıtlarının da potansiyelize olmadığı görülmüştür (sunulan çalışma ve 40). Ancak deney herhangi bir reseptörle etkileşmeksizin direkt olarak PKC'yi aktive eden forboldibütiratın (PDB) düşük düzeyde bir kontraksiyon ve düşük düzeyde $[Ca^{+2}]_i$ artışına neden olan konsantrasyonu (10 nM) kullanılarak tekrar edildiğinde $1\mu\text{M}$ CPA'nın varlığında PKC kontraksiyonunun çok belirgin olarak potansiyelize olduğu gözlemlenmiştir (40). Artmış olan $[Ca^{+2}]_i$ ve kontraksiyonun konvansiyonel ve non-selektif Ca^{+2} kanal blokörleri ile kademeli olarak azaltılması araştırmacıların sözkonusu non-kontraktıl kompartman içinde PKC'nin de "hapsedilmiş" olabileceğini düşündürmüştür. Tavşan merkezi kulak arterinde de PDB ile benzer potansiyalizasyon gözlenmiştir (n=1).

Çalışmalarımızda KCl veya NA bulgularından farklı olarak ilginç bir şekilde CPA varlığında serotonin (5-HT) yanıtları anlamlı düzeyde potansiyelize olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem CPA'nın neden olduğu $[Ca^{+2}]_i$ artışlarının 5-HT'nin varlığında kontraksiyona kenetlenebileceğini göstermektedir. Yüzeysel SR'lerin birbiri ve membranlarla komşuluğu ile oluşturduğu düşünülen sınırlandırılmış subsarkolemmal alanlarda biriken Ca^{+2} iyonunun SR'ler dolu iken Na^+/Ca^{+2} değişim mekanizması aracılığı ile ekstraselüler alana atıldığı ve bu yüzeysel SR/subsarkolemmal alanların bir tampon engeli işlevi gördüğü ileri sürülmüştür (6,43).

$[Ca^{+2}]_i$ artışının ve kontraksiyonların eşzamanlı olarak ölçüldüğü bir çalışmada SOC kanalı aracılığıyla giren kalsiyum iyonunun nonkontraktıl kompartmanda hapsedildiği ve bu Ca^{+2} konsantrasyonunun yine aynı kompartmanda lokalize olan PKC aktivasyonu ile kontraksiyona kenetlenebileceği önerilmiştir (40). İlginç olarak bazı reseptörlerin özellikle sözkonusu subsarkolemmal kompartmanları çevreleyen plazma membranlarında lokalize olabileceği ve bu reseptörlerin efektör/ikinci ulak sistemlerinin de bu özelleşmiş kompartmanlar içinde tetiklendiği ET_A reseptör/ IP_3 ve $PGF_{2\alpha}/IP_3$ sistemleri için ileri sürülmüştür (14).

Sonuç olarak, bazı reseptör-efektör sistemlerin (14) ve PKC'nin de nonkontraktıl kompartmanda spesifik olarak lokalize olabileceği (40) önerilerine ek olarak, çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgular, 5-HT reseptörlerinin de SOC kanalları aracılığı

ile hücre içine giren kalsiyum iyonunun sıkı bir şekilde sınırlandırılmış non-kontraktıl kompartmanlar üzerindeki plazma membranlarında lokalize olabileceğini düşündürmektedir.



ÖZET

Bu tez çalışmasında 1) tavşan perfüze tüm kulak (PTK), perfüze merkezi arter (PMA) ve izole merkezi arter (İMA) ringleri kullanılarak yapılan denemelerde agonist aracılı yanıtlardaki değişiklikler ve 2) periferik bir damar olan tavşan merkezi kulak arterinde kapasitatif Ca^{+2} girişinin kontraksiyonla kenetli olup olmadığı araştırılmıştır.

PTK ve PMA preparatlarında noradrenalin (NA) ile oluşturulan konsantrasyon-yanıt ilişkileri incelendiğinde; 1) endotel varlığında, nitrik oksit sentezi inhibisyonunda ve endotel hücrelerinin fiziksel olarak yokluğunda duyarlılığın (pD_2) anlamlı olarak değişmemesi 2) Herbir NA kademeli konsantrasyonunda (10^{-8} - $10^{-6}M$) oluşan vazokonstriksiyonun NOS inhibisyonunda belirgin bir şekilde (yaklaşık 2-3 kat), endotelsizleştirme sonucu ise artan bu vazokonstriksiyonun azalmakla beraber endotel varlığında alınan yanıtlardan hala belirgin düzeyde fazla oluşu sözkonusu periferik sistemde vasküler tonusun endotelial sistem tarafından tonik olarak kontrol edildiğini düşündürmektedir.

Tavşan kulak merkezi arterin iki ucunun kanülasyonu ile ven sisteminin elimine edildiği PMA preparatında endotel varlığında, NO sentez inhibisyonu altında veya endotel yokluğunda NA pD_2 değerlerinin PTK preparatında elde edilenlerden anlamlı bir fark olmadığını belirlemesi PMA preparatında reseptör-aracılı vasküler yanıtlar üzerine, en azından doku duyarlılığı bakımından, venlerin belirgin bir katkısının olmadığını düşündürmektedir.

PTK ve PMA preparatlarından elde edilen pD_2 değerleri izole organ banyolarının kullanıldığı İMA ring preparatlarında yapılan deneylerden elde edilen verilerle karşılaştırıldığında ring preparatlarında NA'ya karşı doku duyarlılığının arttığı görülmüştür. Doku duyarlıkları arasındaki farkın PTK ve PMA modellerinde damarı

çevreleyen sağlam elastik dokunun optimal tonus oluşturma özelliğinden ve sıcaklık farkından (sırasıyla 25°C, 37°C) kaynaklandığı ileri sürülebilir. Oda sıcaklığında çalışılmasına karşın PTK ve PMA preparatlarında, agoniste olan duyarlılığın merkezi arter ringlerine oranla daha düşük olması, reseptör internalizasyondaki azalmanın duyarlılık üzerine olumlu etkilerinin membran akışkanlığındaki azalmanın zıt etkileri tarafından kompanse edilmesi şeklinde speküle edilebilir.

Çalışmalarımızın ikinci bölümünde elde ettiğimiz bulgular kapasitatif Ca^{+2} girişi sonucu artan intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun periferik damarlarda da non-kontraktıl intraselüler kompartmanlarda “hapsedilebileceğini” ve 5-HT reseptör aktivasyonu ile kontraksiyona kenetlenebileceğini önermektedir. 1) Ca^{+2}_i depolarını tamamen boşalttığı gösterilen 10 μ M CPA'nın herhangi bir kontraksiyona neden olmaması, 2) KCl ve NA'nın neden olduğu kontraksiyonları 10 μ M CPA'nın artırmaması ve 3) 10 μ M CPA varlığında 5-HT kontraksiyonlarının ileri düzeyde potansiyelize oluşu vardığımız sonucu desteklemektedir.

Sonuç olarak, çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgular, NA reseptöründen farklı olarak, 5-HT reseptörlerinin de ET ve PG reseptörleri için önerilene benzer şekilde sıkı olarak sınırlandırılmış non-kontraktıl kompartmanların plazma membranları üzerinde lokalize olabileceğini düşündürmektedir.

SUMMARY

This thesis study investigates 1) the changes in agonist-induced responses in isolated perfused whole ear (PWE), perfused central ear artery (PEA) and isolated central ear artery (IEA) rings of the rabbit and 2) whether the Capacitative Ca^{+2} entry is coupled to a contraction in central ear artery of the rabbit, a peripheral artery.

Based on the norepinephrine concentration-response relationships obtained from PWE and PEA 1) lack of statistical difference in pD_2 values provided in the presence /absence of endothelium or under the nitric oxide synthase (NOS) inhibition 2) approximately 2 fold-increase in each NE response under NOS inhibition ($P<0.05$) or non significant increases after the removal of endothelium suggest that vascular tone in this type of peripheral artery is controlled tonically by the endothelium.

In PEA preparation in which the venous return is eliminated by the cannulation of both ends of the central ear artery, it is suggested that veins may not have significant contribution at least on receptor-mediated vascular responses. This conclusion is supported by the findings that pD_2 values of NE were not altered significantly either in PWE or PEA by NO synthase inhibition or the removal of endothelium

When NE pD_2 values from IEA rings compared to that of PWE and PEA, a significant increase in tissue sensitivity to NE was observed in IEA rings. This observation could result from the optimum elastic tone provided by the intact elastic tissue surrounding the blood vessels in PWE and PEA preparations as well as from the difference in temperature of physiologic salt solution (25°C in PWE and PEA; 37°C in IEA). Despite working in room temperature, the decreased sensitivity in PWE and PEA compared to that in IEA could only be speculated as the opposing effect of decreased membrane fluidity compensates the positive outcome of the decreased receptor internalization.

Findings obtained in the second section of our study suggest that the increased $[Ca^{+2}]_i$ resulting from the capacitative Ca^{+2} entry may also be restricted in non-contractile intracellular compartments and coupled to contraction via the 5-HT receptor activation in peripheral arteries. This conclusion is supported by the observations that 1) CPA at concentrations (10 μ M) which shown to deplete intracellular Ca^{+2} stores did not elicit any contraction, 2) KCl and NE contractions were not enhanced by CPA and 3) 5-HT contractions were significantly potentiated in the presence of CPA.

In summary, our results suggest that, unlike adrenoceptors, 5-HT receptors could also be located in the plasma membrane over the tightly restricted non-contractile subsarcolemmal cytosolic compartments as similarly suggested for ET and PG receptors.



KAYNAKLAR

1. Abe F., Karaki H., Endoh M., "Effects of cyclopiazonic acid and ryanodine on cytosolic calcium and contraction *in vascular smooth muscle*", Br. J. Pharmacol., 118, (1996), 1711-1716.
2. Adeagbo A.S.O., Malik K.U., "Endothelium-dependent and BRL 34915-induced vasodilatation in rat isolated perfused mesenteric arteries: role of G-proteins, K⁺ and calcium channels", Br. J. Pharmacol., 100, (1990), 427-434.
3. Berman R.S., Griffith T.M., "Spatial heterogeneity in the mechanisms contributing to acetylcholine-induced dilatation in the rabbit isolated ear", Br. J. Pharmacol., 124, (1998), 1245-1253.
4. Blattner R., Classen H.G., Dehnert H., Döring H.J., "Experiments on isolated smooth muscle preparations", Ed. Barnden I.M, Colson R., Freiburg and Stuttgart, Hugo Sacs Elektronik, 1978, s.159.
5. Casteels R., Droogmans G., "Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery", J. Physiol. (Lond), 317, (1981), 263-279.
6. Chen Q., van Breemen C., "The superficial bufferbarrier in venous smooth muscle: sarcoplasmic reticulum refilling and unloading", Br. J. Pharmacol., 109, (1993), 336-343.
7. Daniel E.E., van Breemen C., Schilling W.P., Kwan C.Y., "Regulation of vascular tone:cross-talk between sarcoplasmic reticulum and plasmalemma", Can. J. Physiol. Pharmacol., 73, (1995), 551-7.

8. Devine C.E., Somlyo A.V., Somlyo A.P., "Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles", *J. Cell Biol.*, 52, (1972), 690-718.
9. Fukai M.U., Yamamoto H., Nishimura J., Hirano K., Kanaide H., "The mechanism of the decrease in cytosolic Ca^{+2} concentrations induced by angiotensin II in the high K^{+} -depolarized rabbit femoral artery", *Br. J. Pharmacol.*, 129, (2000), 437-447.
10. Gibson A., McFadzean I., Tucker J.F., Wayman C., "Variable potency of nitroergic-nitrovasodilator relaxations of the mouse anococcygeus against different forms of induced tone", *Br. J. Pharmacol.*, 113, (1994), 1494-1500.
11. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y., "A new generation of Ca^{+2} indicators with greatly improved fluorescence properties", *J. Biol. Chem.*, 260, (1985), 3440-3450.
12. Herbert J.M., Augereau J.M., Cleve J., Maffrand J.P., "Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172, (1990), 993-999.
13. Horowitz A., Menice C.B., Laporte R., Morgan K.G., "Mechanisms of smooth muscle contraction", *Physiol. Rev.*, 76, 4, (1996), 967-1003.
14. Karaki H., Ozaki H., Hori M. et al., "Calcium movements, distribution and functions in smooth muscle", *Pharmacol. Rev.*, 49, 2, (1997), 157-229.
15. Kitazawa T., Masua M., Somlyo A.P., "G protein-mediated inhibition of myozin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88, (1991b), 9307-9310.
16. Kubota Y., Kikuchi A., Hirata K. et al., "Cooperative function of rho GDS and rho GDI to regulate rho p21 activation in smooth muscle", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 185, (1992), 473-480.
17. Kwan C.Y., Chaudhary R., Zheng X.F., Ni J., Lee R.M., "Effects of sarcoplasmic reticulum calcium pump inhibitors on vascular smooth muscle", *Hypertension*, 23, (1994), 1156-1160.

18. Laporte R., Laher I., "Sarcoplasmic reticulum- sarcolemmal interactions and vascular smooth muscle tone", *J. Vasc. Res.*,34, (1997), 325-343.
19. Lembeck F., Griesbacher T., Eckhardt M., "Demonstration of extrapulmonary activity of angiotensin converting enzyme in intact tissue preparations", *Br. J. Pharmacol.*, 100, (1990), 49-54.
20. Low A.M., Gaspar V., Kwan C.Y., Darby P.J., Bourreau J.P., Daniel E.E., "Thapsigargin inhibits repletion of phenylephrine-sensitive intracellular Ca^{+2} pool in vascular smooth muscles", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 258, (1991), 1105-1113.
21. Low A.M., Kotecha N., Neild T.O., Kwan C.Y., Daniel E.E., "Relative contributions of extracellular Ca^{+2} and Ca^{+2} stores to smooth muscle contraction in arteries and arterioles of rat, guinea-pig, dog and rabbit", *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 23, (1996),310-316.
22. Merritt J.E., Jacob R., Hallam T.J., "Use of manganese to discriminate between calcium influx and mobilization from internal stores in stimulated human neutrophils", *J. Biol. Chem.*, 264, (1989), 1522-1527.
23. Mikkelsen E.O., Thastrup O., Christensen S.B., "Effects of thapsigargin in isolated rat thoracic aorta.", *Pharmacol. Toxicol.*, 62, (1988), 7-11.
24. Miwa T., Endou M., Okumura F., "Prostaglandin E_1 potentiation of the spontaneous phasic contraction of rat isolated portal vein by a cyclopiazonic acid-sensitive mechanism", *Br. J. Pharmacol.*, 120, (1997), 1419-1426.
25. Naganobu K., Ito K., "Handling of cytoplasmic Ca^{+2} by the sarcoplasmic reticulum during α_1 -adrenoceptor-mediated contraction of rat mesenteric resistance arteries", *Jpn. J. Pharmacol.*, 64, (1994), 89-96.

26. Nixon G.F., Mignery G.A., Somlyo A.V., "Immunogold localization of inositol 1,4,5-triphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle", *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 15, (1994), 682-700.
27. Nomura Y., Asano M., Ito K. et al., "Potent vasoconstrictor actions of cyclopiazonic acid and thapsigargin on femoral arteries from spontaneously hypertensive rats", *Br. J. Pharmacol.*, 120, (1997), 65-73.
28. Pacaud P., Loirand G., Gregoire G., Mironneau C., Mironneau J., "Noradrenaline-activated heparin-sensitive Ca^{+2} entry after depletion of intracellular Ca^{+2} store in portal vein smooth muscle cells", *J. Biol. Chem.*, 268, (1993), 3866-3872.
29. Pernollet M.G., Astarie-Dequeker C., Le Breton G., Devynck M.A., "Endothelin-3 decreases Ca^{+2} uptake in platelet membrane vesicles", *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 26, (1995), S145-S147.
30. Putney J.W.Jr., "A model for receptor-regulated calcium entry", *Cell Calcium*, 7, (1986), 1-12.
31. Putney J.W.Jr., "Capacitative calcium entry revisited", *Cell Calcium*, 11, (1990), 611-624.
32. Rapoport R.M., "Effects of norepinephrine on contraction and hydrolysis of phosphatidylinositols in rat aorta", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242, (1987), 188-194.
33. Sametz W., Grobuschek T., Kogler S.H., Juan H., Wintersteiger R., "Influence of isoprostanes on vasoconstrictor effects of noradrenaline and angiotensin II", *Eur. J. Pharmacol.*, 378, (1999), 47-55.
34. Seidler N.W., Jona I., Vegh M., Martonosi A., "Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{+2} -ATPase of sarcoplasmic reticulum", *J. Biol. Chem.*, 264, (1989), 17816-17823.

35. Sekiguchi F., Shimamura K., Akashi M., Sunano S., "Effects of cyclopiazonic acid and thapsigargin on electromechanical activities and intracellular Ca^{+2} in smooth muscle of carotid artery of hypertensive rats", *Br. J. Pharmacol.*, 118, (1996), 857-864.
36. Shima H., Blaustein M.P., "Modulation of evoked contractions in rat arteries by ryanodine, thapsigargin, and cyclopiazonic acid", *Circ. Res.*, 70, (1992), 968-977.
37. Shimamoto H., Kwan C.Y., Daniel E.E., "Pharmacological assessment of Ca^{+2} dependence of endothelin-1-induced response in rat aorta", *Eur. J. Pharmacol.*, 216, (1992), 225-233.
38. Skutella M., Rüegg U.T., "Studies on capacitative calcium entry in vascular smooth muscle cells by measuring $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx", *J. Receptor Signal Transduction Res.*, 17, (1997) 163-175.
39. Steinsland O.S., Furchgott R.F., "Desensitization of the adrenergic neurons of the isolated rabbit ear artery to nicotinic agonists", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 193, (1975), 138-148.
40. Tosun M., Paul R.J., Rapoport R.M., "Intracellular Ca^{+2} elevation and contraction due to prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ in rat aorta", *Eur. J. Pharmacol.*, 340, (1997), 203-208.
41. Tosun M., Paul R.J., Rapoport R.M., "Role of extracellular Ca^{+2} influx via L-type and non-L-type Ca^{+2} channels in thromboxane A_2 receptor-mediated contraction in rat aorta", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284, (1998), 921-928.
42. Tosun M., Paul R.J., Rapoport R.M., "Coupling of store-operated Ca^{+2} entry to contraction in rat aorta", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 285, (1998), 759-766.
43. Van B., Chen Q., Laher I., "Superficial buffer barrier function of smooth muscle sarcoplasmic reticulum", *Trends Pharmacol. Sci.*, 16, (1995), 98-105.

44. Walsh M.P., "Regulation of vascular smooth muscle tone", *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 72, (1994), 919-936.
45. Wayman C.P., McFadzean I., Gibson A., Tucker J.F., "Two distinct membrane currents activated by cyclopiazonic acid-induced calcium store depletion in single smooth muscle cells of the mouse anococcygeus", *Br. J. Pharmacol.*, 117, (1996), 566-572.
46. Xuan Y.T., Wang O.L., Whorton A.R., "Thapsigargin stimulates Ca^{+2} entry in vascular smooth muscle cells: nifedipine-sensitive and -insensitive pathways", *Am. J. Physiol.*, 262, (1992), C1258-C1265.



KISALTMALAR

ANF: Atriyal natriüretik faktör

[Ca⁺²]₀: Ekstraselüler serbest Ca⁺² konsantrasyonu

[Ca⁺²]_i: İntraselüler serbest kalsiyum konsantrasyonu

5-HT: 5- hidroksitriptamin, serotonin

CaD: Kaldesmon

CaM: Kalmodulin

CaMKII: Kalmodulin kinaz II

CaP: Kalponin

CICR: Kalsiyum iyonunun indüklediği Ca⁺² salıverilişi

CPA: Siklopiazonik asit, SR Ca⁺²-ATPaz selektif inhibitörü

CR: Kalretikülin, SR lümeni Ca⁺²-bağlayıcı proteini

CSQ: Kalsekestrin, SR lümeni Ca⁺²-bağlayıcı proteini

DAG: 1.2-diaçil gliserol

ET: Endotelin

GC: Guanilat siklaz

GC_m,GC_c: sırasıyla guanilat siklazın membrana bağlı ve sitozolik formları

G_q: Fosfoinozitide spesifik PLC-β izoenzimlerini stimüle eden GTP'ye bağlı proteinlerin bir alttipi

G_s: Adenilat siklazı stimüle eden GTP'ye bağlı protein

GTP: Guanozin trifosfat

Htrp3: Ca⁺² depolarının boşalması ile aktive olan kanal

IICR: IP₃'ün neden olduğu Ca⁺² salıverilişi

IP₃: İnozitol 1,4,5-trifosfat

I-PKC: Kalsiyum iyonundan bağımsız PKC izoenzimleri

IPR: IP₃ reseptörü

Kapasitatif Ca⁺² girişi: Depolardan Ca⁺² salıverilişinin aktive ettiği Ca⁺² girişi

L-NNA: N^w-nitro-L-arginin, NO sentez inhibitörü

MAPK: Mitojenin aktive ettiği protein kinaz

MLCK: Miyozin hafif zincir kinaz

MLCPaz: Miyozin hafif zincir fosfataz

NO: Nitrik oksit

Nonkontraktıl Ca⁺² kompartmanı: SL ve SR arasında kontraktıl element içermeyen Ca⁺² kompartmanı

Oksidatif stres: Hücrelerin moleküler oksijenin veya reaktif oksijen türleri adı verilen oksijenin kimyasal türevlerine yüksek oranlarda maruz kaldığı durum

PA-PHA: Fosfatidat fosfohidralaz

PC: Fosfatidilkolin

PC-PLC: Fosfatidilkoline spesifik fosfolipaz C

PC-PLD: Fosfatidilkoline spesifik fosfolipaz D

PG: Prostaglandin

PIP₂: Fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat

PKA: cAMP bağımlı protein kinaz

PKC: Protein kinaz C

PKG: cGMP bağımlı protein kinaz

PLB: Fosfolamban

PLC: Fosfolipaz C

PMA: Perfüze merkezi arter preparatı

PTK: Perfüze tüm kulak preparatı

RR: Ryanodin reseptörü

Sarkolemma: Hücre membranı

SERCA: SR Ca^{+2} ATPaz

SL Ca ATPaz: Sarkolemmal Ca^{+2} pompası

SOC: İntraselüler Ca depolarının boşalması sonucu aktive olan Ca kanalı, Store-operated Ca^{+2} entry

SR: Sarkoplazmik retikulum

SR-Ca ATPaz: Sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} pompası

Vasküler tonus: Kan damarlarının gösterdiği normal gerginlik

VDCC: Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları

ÖZGEÇMİŞ

03.02.1976'da Denizli'de doğdum. İlköğrenimimi Denizli 100. Yıl Mehmetçik İlkokulu'nda, lise öğrenimimi Denizli Lisesi'nde tamamladım. 1993 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde lisans eğitimime başladım ve 1997 yılında mezun oldum. Aynı yıl, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Farmakoloji Yüksek Lisans Programına kabul edildim. 1998 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım. Halen Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.