

15306.

T. C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

PGE₂ ve PGF₂ ALFA'NIN TRAKEAL
DÜZ KAS ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNDE
TRAKEA EPİTELİNİN ROLÜ

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

(Doktora Tezi)

Araş. Gör. Ramazan ÇİÇEK

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU

K I S A L T M A L A R

Ach : Asetilkolin

HA : Histamin

PG : Prostaglandin

E_pDRF : Epithelium Derived Relaxant Factor

E_pDIF : Epithelium Derived Inhibitory Factor

AEDRF : Airway Epithelium Derived Relaxant Factor

Yukarda belirtilen son üç kısaltma aynı madde veya maddeler için kullanılmaktadır.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	1
GİRİŞ ve AMAÇ	2 - 3
LİTERATÜR BİLGİ	4 - 17
MATERYAL ve METOD	18
MATERYAL	18
DENEY HAYVANLARI	18
KULLANILAN İLAÇLAR	18
DENEYDE KULLANILAN ÇÖZELTİ	19
DENEYDE KULLANILAN CİHAZ ve YARDIMCI	
CİHAZLAR	19
METOD	19 - 21
BULGULAR	22 - 27
TARTIŞMA	28 - 30
ÖZET	31
SUMMARY	32
LİTERATÜR LİSTESİ	33 - 39

1. T E Ő E K K Ü R

Bu tezin hazırlanabilmesi için gerekli olanakları sağlayarak ve moral destek vererek motivasyonumda en önemli unsur olan tez yöneticim Prof.Dr.Tülin SÖYLEMEZOĞLU'na, ilgi ve yardımlarına esirgemeyip çalışmama olumlu katkılarda bulunan Yard.Doç.Dr.İlyas ÖZATA'ya en derin teşekkürlerimi sunarım.

Ramazan ÇİÇEK

2. G İ R İ Ő ve A M A Ç

Bronşiyal astma başka bir hastalığa bağlı olmayan reversibl bronkospazmın neden olduğu solunum yollarının tıkanması halidir.Bronkospazma mukus salgılanmasında artma ve mukoza ödemi eşlik eder.Bronşiyal düz kasların primer olarak aşırı duyarlı oluşu ile karakterize olan bu hastalık bazı toplumlarda % 5 - 7 oranında görülür (27).

Solunum yollarının tıkanması olguların yaklaşık 1/3'ünde alerjiye bağlı spazmdan ileri gelir.Diğerlerinde ise bronş düz kasları ilkindekilerde olduğu gibi aşırı duyarlı durumdadır ve sigara dumanı,soğuk hava,egzersiz,alt solunum yolu enfeksiyonu gibi alerjik olmayan çeşitli etkenler spazmı artırarak solunum yetmezliğine kadar giden solunum güçlüğü yaparlar.Spazma genellikle mukoza ödemi ve aşırı mukus salgılanması eşlik eder.Bronşiyal düz kaslar aşırı duyarlı olduklarından bronşiyal astmalılarda devamlı fakat hafif bir bronkospazm zemini mevcuttur.Normal kimselerde etkisiz gözüken eşik altı konsantrasyonlardaki çeşitli uyarıcıların bronşiyal astmalılarda solunum düz kasının kasılması ile cevap vermesi,etkili konsantrasyonlarının ise aşırı kasılma ile cevap vermesi vurgulanması gereken önemli bir özelliiktir.BronŐlardaki anılan bu aşırı duyarlılığın altında yatan nedenler konusunda çeşitli varsayımlar ileri sürülmek-

tedir. Bu varsayımlardan biri de solunum sistemi epitelinin harabiyeti sonucu epitelden salınan gevşetici faktör veya faktörlerin ortadan kalkmasıdır (27). Zaten astma sıklıkla spazmojenlere seçici olmayan bir bronşiyal aşırı duyarlılık ve solunum epiteli hasarı ile birlikte görülür. Bu nedenle son yıllarda in vitro laboratuvar çalışmaları insan dahil pek çok memeli türünde solunum sistemi epitelinin solunum sistemi düz kasının kasıcı ve gevşetici maddelere verdiği cevapları modüle etmede rol alıp almadığını göstermeye yönelmiştir. Bu çalışmaların sonuçlarına göre solunum sistemi epitelinin solunum sistemi düz kasının çeşitli uyarıcılara duyarlılığını etkileyen inhibitör bir faktör veya faktörler salgıladığı ileri sürülmüştür. Böylece solunum sistemi epitelinin hasar görmesi veya ortadan kalkması inhibitör faktör üretiminin azalması ve solunum sistemi düz kasının spazmojen maddelere duyarlılığının artması ile sonuçlanacaktır (11).

Bu çalışmada da koyun trakea epitelinin asetilkolin, PGE_2 ve PGF_2 alfa mevcudiyetinde inhibitör bir madde salgılayıp salgılamadığı, salgılanma söz konusu ise bu inhibitör maddenin EDRF gibi etkisini cGMP aracılığı ile mi yaptığı incelenmek istenmiştir.

3. L İ T E R A T Ü R B İ L G İ

Astmalı şahısların solunum sistemi epitelinin anormal olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir. Gerçekten de epitel hasarı orta ve ciddi astmada karakteristik bir özellik olan solunum sistemi inflamasyonu ile birlikte görülür ve solunum sistemi aşırı duyarlılığı ile ilişkili olabilir (15). Bu nedenle solunum sistemi epitelinin alt tabakadaki düz kasın çeşitli bronkokonstrüktör ve bronkodilatör maddelere karşı duyarlılığını modüle edip etmediği konusu üzerinde ilgiler artmıştır (36).

Son zamanlara kadar trakea epitelinin stimülatör maddelere karşı bir penetrasyon bariyeri oluşturarak solunum sisteminde genellikle pasif rol oynadığı kabul edilirdi. Ancak epitel sekresyonu ve silier aktivite irritan parçacıkların bronşlardan atılmasında önemli rol oynar. Ayrıca normal ve anormal akciğer fonksiyonlarında etkili en az oniki çeşit epitel hücresi tipi saptanmıştır. Dolayısıyla çeşitli inflamatuvar olaylar sonucu epitelin bütünlüğünün bozulması dokunun korunması fonksiyonunun ortadan kalkmasına (15), epitelden kaynaklanan gevşetici faktörlerin azalması veya hiç üretilmemesine, çıplak kalan afferent sinir uçlarının aşırı derecede uyarılmasına neden olur (27). Yani trakea epitelinin haraplanması astma patojenezinde

önemli rol oynar (27).

Epitel hücrelerinin kendiliğinden inflamatuvar maddeler salarak veya lökositlerin oluşturduğu hasara maruz kalarak da solunum sistemi inflamasyonunun patojenezinde rol oynaması mümkündür (20). Nitekim astmada bronşiyal duvara eozinofil infiltrasyonu olabilir. Eozinofillerden salgılanan özellikle major bazik protein solunum sistemi epitelinin haraplanmasına neden olabilir. Epitel hasarı viral enfeksiyonlarda da görülebilir ve normal şahısları aşırı duyarlı hale getirebilir (4). Astmalı şahıslarda ise solunum sistemi epitelinin azalması bronşiyal aşırı duyarlılık ile birlikte görülür (36).

Normal şahıslarda bazı özel spazmojenlere verilen bronkokonstrüktör cevap yüksek dozlarda bir plato seviyesi oluşturarak sınırlanır. Oysa astmalılarda bronkokonstrüksiyon doza bağımlı olarak devam eder. Bu durum aşırı cevabı önleyecek bir fren mekanizmasının eksikliğini gösterir. Yani astmada epitel hasarı veya fonksiyon yetersizliği muhtemelen E_p DIF etkinliğinde de azalmaya neden olarak kronik hastalıklara karakteristik solunum sistemi aşırı duyarlılığına neden olur. Deneysel olarak da insan dahil bir çok memeli hayvan türünde solunum sistemi epitelinin mekanik olarak tahrip edilmesi düz kasın çeşitli spazmojenlere duyarlılığını artırırken (15) relaksan maddelerin etkisini azaltır (36). Böylece in vitro koşullarda solunum sistemi epitelinin tahribi ile yapılan çalışmalarla astma taklit edilmeye ça-

lişılır.Ancak bu tür modellerde insan astmasından farklı olarak epitel tamamen ortadan kaldırılmıştır (15).

Epitelin solunum sistemi üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla halen çok çeşitli araştırmalar yapılmaktadır.Bunların bir kısmında şu sonuçlar elde edilmiştir :

Epitel hasarının bronşiyal aşırı duyarlılık ile ilişkili olduğuna dair çeşitli varsayımlar ileri sürüldüğünden sekiz astmalı hastadan alınan bronşiyal biyopsilerin elektron mikrografik incelenmelerinde bütün solunum sistemi seviyelerinde epitel bozulması gözlenmiş;epitelde en çok tahrip olan hücre tipinin ise silier hücreler olduğu saptanmıştır (28).

Epitel düz kasa etkileyen maddelere karşı difüzyon bariyeri veya kimyasal maddeleri metabolize eden metabolik bir bariyer oluşturarak çeşitli agonistlerin cevaplarını etkileyebileceği gibi deneysel amaçla epitelin kaldırılması dokunun mekanik özelliklerini de değiştirebilir (2).Epitelin metabolizma bariyeri olup olmadığını göstermek amacıyla yapılan bir çalışmada (37) kobay trakea epitelinin asetilkolin esteraz ile metabolize edilen kolinomimetik maddeler için metabolik bariyer oluşturmadığı ancak E_p DRF salarak ve difüzyon bariyeri oluşturarak onların kontraktil etkilerini azalttığı saptanmıştır.Ancak kobay trakea şeritlerinin vazoaaktif intestinal peptide (VIP) verdiği relaksan cevapların epitelin tahribinden sonra artması (10),bu artışın epiteli tahrip edilmemiş (intakt) preperatta nötral endopep-

tidaz inhibitörlerinin mevcudiyetindeki cevaplara benzer olması epitelin eksojen VIP için bir metabolizma bariyeri oluşturduğunu düşündürmüştür. Yani epitel eksojen VIP'i metabolize eden nötral endopeptidazlar içererek onun düz kastaki reseptörlerini etkileme yeteneğini azaltmakta, relaksan etkisine karşı dokunun duyarlılığını sınırlayabilmektedir.

Epitelin tahribinden sonra VIP'in relaksan etkileri arttığı gibi yine kobay trakea şeritlerinde epitelin tahribi izoprenaline verilen cevapları da artırmıştır (9). Ancak intakt preperatta ekstranöronal uptake inhibitörü kortizon mevcudiyetinde de izoprenaline verilen cevaplar artış göstermiş ve epitelin tahribi izoprenalinin etkisini değiştirmemiştir. Böylece kobay trakea epitelinin katekolaminlerin ekstranöronal uptake'inde ana kaynağı oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Epitelin tahribinin salbutamol, papaverin ve adenozin duyarlılığı değiştirmemesi onun bir difüzyon bariyeri olmadığını göstermiştir. Yine bu çalışmada adenozin ve muhtemelen sodyum nitroprussiyatın epitelden düz kas uyarıcı bir madde salınımına neden olabileceği belirtilmiştir. Bu görüş epitelden sadece E_p DIF salınmadığı birden çok madde salınabileceği fikrini vermektedir.

Epitelin bazı agonistler için metabolizma bariyeri oluşturarak onların düz kasa ulaşmalarını sınırlayıp etkilerini azaltması nedeniyle epitelin tahribi bu agonistle-

rin düz kasa ulaşmasını kolaylaştırır, etkilerinin artmasına neden olur. Ancak bu görüş epitelin tahribinden sonra bazı spazmojenlere karşı oluşan duyarlılık artışını her zaman açıklamaya yetmez. Nitekim köpek solunum sistemi düz kasında epitelin tahribi Ach, 5-hidroksi triptamin (5-HT) (1,12) ve HA'e (12) duyarlılığı artırırken, Ach ile kastırılmış dokularda izoproterenole bağlı gevşemeyi azaltır (12). Epitelin tahribinden sonra izoproterenole verilen relaksan cevapların azalması epitelden relaksan bir madde salgılandığı konusunda önemli bir delil olabilir. Bu amaçla yapılmış çeşitli çalışmalarda ise aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir :

Sığır trakea epiteli HA ve 5-HT'e verilen maksimum kontraktıl cevapları ve duyarlılığı önemli ölçüde azaltır. Bu etkinin indometasin ve mepakrin ile inhibe edilememesi bronşiyal epitelin siklooksijenaz ve lipoksijenaz ürünü olmayan relaksan bir madde salgıladığını gösterir (4). Kobay trakea epitelindeki kinin reseptörlerinin uyarılması da trakeanın kallidin ve bradikinine verdiği kontraktıl cevapları azaltan mediyatörlerin salınımına neden olur (5). Benzer şekilde epitelsiz kobay trakea şeritleri Ach, HA (7,25) ve 5-HT'e (7) daha duyarlı cevaplar verirken adrenalin ve salbutamol epitelli şeritlerde daha etkili gevşeme oluşturur ancak izoprenalinin etkisi değişiklik göstermez (7).

Epitelin kaldırılması insanda metakoline (35), kobay-

da HA ve metakoline duyarlılığı ve HA'e verilen maksimum cevapları artırır (16). Ancak K^+ 'a verilen maksimum cevabı azaltır. Böylece epitelden inhibitör ve eksitator maddelerin salındığı sonucuna varılabilir. İndometasin metakoline verilen cevapları epitelsiz dokudaki gibi artırırken HA'e verilen cevapları etkilemez (16).

Oysa kobay trakeasında K^+ 'un epitel tabakasından geçebildiği bu nedenle K^+ 'a verilen cevapların epitel tarafından etkilenmediği de ileri sürülmüştür (19). Benzer bir çalışmada (14) Ach, karbakol ve HA'e verilen maksimum cevaplar epitelin kaldırılması ile değişmezken sadece HA'in etki gücünün önemli ölçüde artış gösterdiği saptanmıştır. İzoprenalin ve teofilin gibi cAMP uyarıcısı maddelerin etkilerinin epitele bağımlı olmadığı ancak epitel tarafından modüle edildiği ileri sürülmüş, aynı kanaatin cGMP uyarıcısı nitrogliserin için geçerli olmadığı belirtilmiştir (14).

Başka bir çalışmada ise kobay solunum sistemi mukozasının tahribi ile Ach ve HA'e verilen kontraktıl cevapların arttığı, benzer cevapların intakt preparatın indometasin ile işlem görmesinden sonra da elde edildiği bildirilmiştir. Ancak HA'in etkilerini indometasinin epitelsiz preparatlarda daha büyük ölçüde artırması solunum sistemi mukozasının düz kas cevaplarını azaltan bir faktör taşıdığı kanısının oluştuğu belirtilmiştir (31).

Ovalbümin ile sensitize edilmiş kobayların solunum

sistemi aşırı duyarlı hayvan modeli olarak kullanıldığı diğer bir çalışmada ise kontrol ve sensitize edilmiş hayvanlarda epitelin tahribinin HA ve metakoline duyarlılık ve kontraktiliteyi artırdığı saptanmıştır (17).Yine kobayda yapılan bir çalışmada epitelden kaynaklanan bir faktörün kısmen Na^+/K^+ pompasını aktive ederek kontraktil cevapları azalttığı ileri sürülmüştür (29).

Görüldüğü gibi epitelin tahribi ile dokunun duyarlılığının değiştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur.Ancak epitelin tahribi ile dokunun duyarlılığının değişmesi E_pDRF için indirekt bir işarettir.Bu nedenle daha direkt deliller elde edebilmek için biyocassay çalışmaları da yapılmaktadır. Bu amaçla ilk olarak köpekte kaskad sistemi ile yapılan bir çalışmada E_pDRF varlığı saptanmıştır (36).Aynı sistem kobayda E_pDRF varlığını gösterememiştir.Ancak E_pDRF 'ün mukozadan düz kasa doğru salgılandığını ve biyolojik yarı ömrünün çok kısa olduğunu varsayarak kobayda elde edilen negatif sonuçlara açıklama getirmiş olabiliriz.

Epitelden inhibitör bir madde salındığına dair direkt delil elde etmek amacıyla kullanılan diğer bir yöntem ise koaksiyel biyocassay yöntemidir (36). Bu yöntemle endoteli tahrip edilmiş tavşan aortik şeridi fenilefrin ile kastırıldığında Ach'ne relaksan cevap vermez.Aynı preparat epiteli tahrip edilmemiş kobay trakeası ile aynı organ banyosuna alınınca tavşan aortik şeridi Ach'e relaksan cevap verir.Oysa epiteli tahrip edilmiş trakea kullanınca relak-

san cevap alınmaz. Bu relaksan etkinin indometasin ile inhibe edilememesi EDRF'ye benzer ancak EDRF'den farklı bir maddenin salgılandığına düşündürür (24). Aynı sonuçlar endoteli tahrip edilmiş koyun aortu, intakt koyun trakeası (8) ve endoteli tahrip edilmiş rat aort şeridi, intakt kobay trakeası (11) kullanılarak da elde edilmiştir. Salınan maddenin PGE₂, beta reseptör uyarıcısı veya trombosit aktive edici faktör (PAF) reseptör uyarıcısı olmadığı ileri sürülmüştür (11).

Epitelin inhibitör etkisini direkt olarak gösterebilmek için kullanılan üçüncü yöntem ise sandwich prepe-rasyon yöntemidir (36). Bu amaçla epiteli tahrip edilmiş kobay trakea şeritleri intakt şeritlerle yüz yüze bakacak şekilde aynı organ banyosuna konulunca substans P'nin epiteli tahrip edilmiş şeritteki kontraktıl etkilerinde düşme gözlenmiştir (38).

Epitelin solunum sisteminin hangi seviyelerinde etkili olduğunu anlamak amacıyla köpekte yapılan bir çalışmada HA ve metakoline verilen cevapların özellikle geniş solunum yollarında daha çok etkilendiği gösterilmiştir. Epitelin kaldırılması HA ve metakoline duyarlılığı ve HA'e verilen kontraktıl cevapları artırmıştır (18). Oysa tavşanda yapılan bir çalışmada ise epitelin etkisinin özellikle küçük solunum yollarında daha belirgin olduğu gösterilmiştir (35). Bu çalışmada epitelin tahribi ile verapamilin bronş gevşetici etkisi azalmış, sonuç insan izole epitelsiz

trakea düz kasının metakoline verdiği kontraktil cevapları verapamilin daha az azaltması (34) ile paralellik göstermiştir. Bu bulgular astmalı hastalarda LTD₄'ün oluşturduğu bronkospazmı çözmede verapamilin etkisinin yetersiz olmasına (34) benzemektedir.

Epitelden salgılandığı ve biyolojik cevaplara iştirak ettiği açıkça görülen E_pDRF'ün ne olduğunu anlamak amacıyla yapılan çalışmalara göre insan bronşiyal epitel kültürlerinin kalsiyum iyonoforu A 23187 ile işlem görmesi bronşiyal epitel hücrelerinden konsantrasyona bağımlı olarak PGE₂ salınımına neden olur. Ancak bunun fonksiyonu muhtemelen immünomodülatör olarak rol oynama şeklindedir (20). Yine tavşan izole trakea epitel hücreleri epinefrin ile işlem görünce PGE₂ oluşumu ve salınımı ile cAMP seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir (30).

Kobay intakt trakea şeritleri araşidonik aside (AA) relaksan cevaplar verirken epitelin tahribinden sonra bu cevaplar yerini kontraktil cevaplara bırakır. Epitelli preparatların indometasin ile ön işleme tabi tutulması ile yine relaksan cevaplar yerine kontraktil cevaplar elde edilir. Bu durum kobay trakea epitelinin spontan olarak PGE₂ salgıladığını düşündürür. Bu nedenle epitelin tahribinden sonra siklooksijenaz ürünlerinin ortadan kalktığı lipoksijenaz ürünlerinin kontraksiyonu potansiyalize ederek bronşiyal duyarlılığı artırdığı ileri sürülmüştür (33). Benzer sonuçlar bir başka çalışmada da (39) elde edilmiş

HA veya karbakol ile kastırılmış epitelsiz trakea şeritlerinde AA etkisiz bulunurken intakt şeritlerde doza bağlı gevşeme oluşturmuş,gevşetici bu etki indometasin ve aspirin ile bloke edilebilmiştir.Aynı inhibisyon sandwich preperasyon yöntemi ile de gösterilmiş (39) ve AA derivelerinin AEDRF parçaları olabileceği,epitelial ve non epitelial hücrelerden relaksan ve kontraktil metabolitlerin oluşup kobay solunum sistemi tonüsünü regüle edebileceği belirtilmiştir.

Bir başka çalışmada HA ile kastırılmış intakt kobay trakea şeritlerinin PAF-aseter ile gevşetildiği,indometasin ile ön işlem yapılması veya epitelin tahrip edilmesi halinde PAF-aseterin HA'den kaynaklanan kontraktil cevapları azaltmadığı görülmüş ve PAF-aseterin bu etkisinin özellikle PGE_2 oluşumu ile ilgili olduğu belirtilmiştir (6).

Gerçekten de epitel PGE_2 'yi de içeren değişik PG'lerin kaynağıdır.HA ve bazı düz kas kastırıcı ilaçlar in vitro solunum sistemi preperatlarında PGE_2 gibi relaksan PG'lerin üretim ve salınımına neden olurlar.Siklooksijenaz inhibisyonu ve epitelin kaldırılması kontraktil maddelerin etkilerini benzer şekilde artırdıklarından E_p DIF'ün bir PG olduğu düşünülebilir.Ancak bir çok çalışmada siklooksijenaz ve/veya lipoksijenaz inhibitörlerinin mevcudiyeti,epitelin tahribinden sonra oluşan duyarlılık artışını engelleyemmiştir (15).Zaten HA'in kobay trakeasındaki etkilerini indometasinin epitelsiz preperatlarda daha büyük ölçüde artırmaması solunum sistemi mukozasının düz kas cevaplarını a-

zaltan bir faktör taşıdığı kanısı uyandırdığını belirtmiş-
tik (31). Ayrıca koaksiyel biyoassay çalışmalarda enzim in-
hibitörleri cevapları değiştirememiş, üstelik PGE_2 rat aor-
tunu kontrakte etme özelliğine sahip bir madde olduğundan
salınan maddenin PGE_2 olması olası görülmemiştir. Bu neden-
le epitelin PG'ler gibi PG olmayan inhibitör bir faktör
salgıladığı açıkça gözükmemektedir. E_pDIF 'ün PAF olabileceği
şüphesi ise PAF'ın rat aortunda etkisiz olması nedeniyle
göz ardı edilmiştir. E_pDIF EDRF'den farklıdır. Çünkü EDRF'-
nin solubl guanilat siklaz enzimi üzerine olan etkisini in-
hibe eden metilen mavisi epitele bağımlı vasküler veya
gastrointestinal gevşemeyi etkileyememiştir (15).

Solunum sistemi epitelinden E_pDIF salgılandığı gibi
tavşan ve kobay solunum sistemi epitelinde siklooksijenaz;
tavşan, sıçan, kobay ve köpek solunum sistemi epitelinde si-
tokrom P-450 monooksijenaz ; insan solunum sistemi epite-
linde 15-lipoksijenaz sistemi varlığı da gösterilmiştir
(36).

E_pDIF 'ün in vivo bronşiyal sirkülasyonda vazodila-
tasyon oluşturmaya düz kas, mast hücreleri ve sinir lifleri-
ne doğru olan inhale edilmiş kimyasal uyarıcıların atılımı-
nı artırabilir. Epitele bağımlı vasküler dilatasyon E_pDIF 'ün
etkisini solunum sistemi düz kasına oranla solunum sistemi
duvarında fizyolojik olarak daha etkili bir hale getirebi-
lir. E_pDIF 'ün yapısının belirlenmesi analoglarının, salınımlı-
nı uyaran veya metabolize edilmesini engelleyen maddelerin

geliştirilmesini ve tedavide kullanılmalarını sağlayabilir (15).

AA sığır pulmoner arter şeritlerini endotele bağımlı olarak gevşetirken cAMP ve cGMP oluşumunda artış gözlenir. Guanilat siklaz inhibitörü olan metilen mavisi endotele bağımlı bu gevşemeyi cGMP oluşumunu da engelleyerek kısmen inhibe eder (22). Endotele bağımlı vazodilatörler olan AA, bradikinin, Ach ve VIP'in oluşturduğu vazodilatasyonda da cGMP seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar EDRF'nin guanilat siklaza aktive ettiğini göstermektedir (21). Guanilat enziminin aktivasyonu sonucu hücre içinde miktarı artan cGMP'nin cAMP'ye zıt etki yaptığı sanılıyordu. Çünkü cAMP hücre içi serbest Ca^{++} konsantrasyonunu azaltarak gevşemeye neden olurken kontrakte dokularda cGMP seviyelerinde artış gözlenmektedir. Ancak rat ductus deferensinde pek çok düz kas gevşeticilerin cAMP düzeylerini etkilemeden cGMP seviyelerini artırması cGMP'nin de düz kas gevşemesine aracılık ettiğini göstermiştir (32). Nitrik oksit (32) ve sodyum nitroprussiyat da vasküler ve bazı nonvasküler düz kas preparatlarında cGMP seviyelerini artırırılar. Sodyum nitroprussiyat sulu solüsyonda spontan olarak NO salınımı yapar, NO bazı tiollerle etkileşerek S-nitrozetiollerini oluşturur. Bu ise guanilat siklaza güçlü bir şekilde aktive ederek cGMP akümülyasyonuna neden olur ve düz kasta gevşeme meydana gelir. Guanilat siklaz inhibitörü olarak bilinen metilen mavisi bu gevşemeyi inhibe eder (23).

Sığır ve kobay trakeal düz kas dokusunda da HA'e verilen kontraktıl cevaplar sırasında cGMP seviyelerinde artış meydana gelir. Bu etki H₁ antagonisti olan difenhidramin ile bloke edilebilir. Buna karşın kobayda 5-HT'e verilen kontraktıl cevaplar sırasında cGMP seviyelerinde düşme oluşur. cGMP sarkolemma membranında Ca-ATPaz'ı aktive ederek Ca⁺⁺'un dışarı atılmasını hızlandırır. Böylece sentezlenmiş inozitol trifosfat tarafından salınan Ca⁺⁺ cGMP vasıtasıyla kısmen ekstraselüler sıvıya pompalanır. Kalmodulin ile bağlanacak serbest Ca⁺⁺ miktarları azalır. Ayrıca cGMP Ca-kalmodulin kompleksinin miyozin hafif zincir kinaz enzimine afinitesini azaltarak miyozin hafif zincir kinazın fosforilasyonunu engeller, Ca⁺⁺'un oluşturacağı kasılmayı inhibe eder. Ancak miyozin hafif zincirinin bu inhibisyonunun cGMP'den kaynaklanıp kaynaklanmadığı kesin olarak bilinmemektedir. Aynı preparatta 5-HT uygulanması ile cGMP miktarı bazal seviyenin altına düşer. Bu etki ile sitosoldaki artmış Ca⁺⁺ seviyeleri korunur, böylece sentezlenmiş inozitol trifosfattan beklenen kontraksiyondan daha büyük bir kontraksiyon oluşur (26).

Bu çalışmada kullanılacak agonistlerden olan PGE₂ ve PGF₂ alfanın etkileri ile ilgili olarak ise şu görüşler belirtilmiştir : Koyun trakea ve akciğer şeritleri PGF₂ alfaya karşı duyarsızdır. Ancak PGF₂ alfa analogu olan U-46619 akciğer şeritlerinde metakolin ve HA'den daha güçlü kontraktıl etki oluşturur. PGE₂ ise bazal veya in-

düklenmiş tonüsü azaltır (13).

Tüm bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızın amacı epitelli ve epiteli tahrip edilmiş koyun trakea şeritlerinin Ach, PGE₂ ve PGF₂ alfaya verdikleri cevaplar arasında anlamlı bir fark bulunup bulunmadığını saptamak, cGMP'nin düz kas gevşemesinde rol oynadığı göz önüne alınarak koyun trakeasının tonüsünün ayarlanmasında da etkili olup olmadığını, bu etkiye epitelin iştirak edip etmediğini incelemektir.

4. M A T E R Y A L V E M E T O D

4.1. Materyal :

4.1.1. Deney Hayvanları :

Cinsiyet ve kilo özellikleri göz önüne alınmaksızın Et ve Balık Kurumu Diyarbakır Et Kombinasyonu'nda kesime alınan koyunlar kullanılmıştır.

4.1.2. Kullanılan İlaçlar :

Asetil kolin 0.1 g amp Haver-İSTANBUL

PGE₂ Sigma ABD

PGF₂ alfa Sigma ABD

Sodyum nitroprusiyat Merck

Metilen mavisi Merck

Belirtilen ilaçlardan önce stok solüsyonlar hazırlandı. PGE₂ ve PGF₂ alfanın stok ve kullanıma alınan solüsyonlarını hazırlamak için alkol kullanıldı. PGE₂ ve PGF₂ alfanın stok solüsyonları buz dolabında -4 °C'ta, asetil kolinin stok solüsyonu ise buzdolabında +4 °C'ta saklandı. Sodyum nitroprusiyat ve metilen mavisi solüsyonları ise günlük olarak hazırlandı. Deneyler sırasında PGE₂ ve PGF₂ alfa solüsyonları alkol, asetil kolin ise Krebs Henseleit solüsyonu ile istenen konsantrasyona ayarlanıp taze olarak kullanıldı.

4.1.3. Deneyde kullanılan Çözelti :

Deney süresince bileşimi aşağıda verilen Krebs Henseleit çözeltisi kullanılmıştır.

NaCl	112 mM
NaHCO ₃	25 mM
KCl	5 mM
NaH ₂ PO ₄	1 mM
MgCl ₂ : 6H ₂ O	0.5 mM
CaCl ₂ : 2H ₂ O	2.5 mM
Glukoz	11.5 mM

4.1.4. Deneyde Kullanılan Cihaz ve Yardımcı Cihazlar :

İzole organ Banyosu

Brown marka on vitesli kimograf

Frontal levye

1 ml'lik enjektörler

Hava kompresörü

4.2. Metod :

Et ve Balık Kurumu Diyarbakır Et Kombinasında kesilen koyunlardan kesimi takip eden 3-5 dakika içinde alınan trakea parçalarını oksijene edilip +4°C'a kadar soğutulmuş Krebs Henseleit solüsyonuna alınarak korundu. Daha sonra laboratuvar koşullarında oksijene Krebs Henseleit solüsyonu içinde

çevre dokularından temizlenip bir halka alındı.Yine oksijene Krebs Henseleit solüsyonu içinde AKÇASU metoduna (2) göre hazırlandı.Trakea halkalarının epitel tabakası epitel-siz çalışma yapılırken plastik hortum geçirilmiş pens yardımıyla tahrip edildi.Epitelin tahrip edilip edilmediğini anlamak için histolojik tetkiklerden yararlanıldı.Trakea halkaları üst kısımlardan tesadüfi olarak alınıp aynı dokuda birden fazla preparatla çalışma yapılırken halkaların birbirine komşu olmasına dikkat edildi.

Hazırlanan şeritler oksijene ve 37°C sıcaklıktaki 10 ml Krebs Henseleit solüsyonu içeren organ banyosuna asıcı cam çubuk ve frontal levye ile asıldı.Dokulara iki gram ağırlık uygulandı.İzole şeritlerin ortama adaptasyonu için 1,5 saat beklendi ve cevapları ıslı kağıda büyüterek aktarabilmek için magnifikasyon = dokuz olarak ayarlandı.Adaptasyon periyodu süresince doku onbeş dakikalık aralarla üçer kez yıkandı.İlaç uygulamasına geçince kimograf üçüncü viteste çalıştırılarak dönüş hızının 2 mm/dakika olması sağlandı.İlaç uygulaması ng/ml ve µg/ml konsantrasyonda ayarlanmış solüsyonlardan yararlanılarak yapıldı.

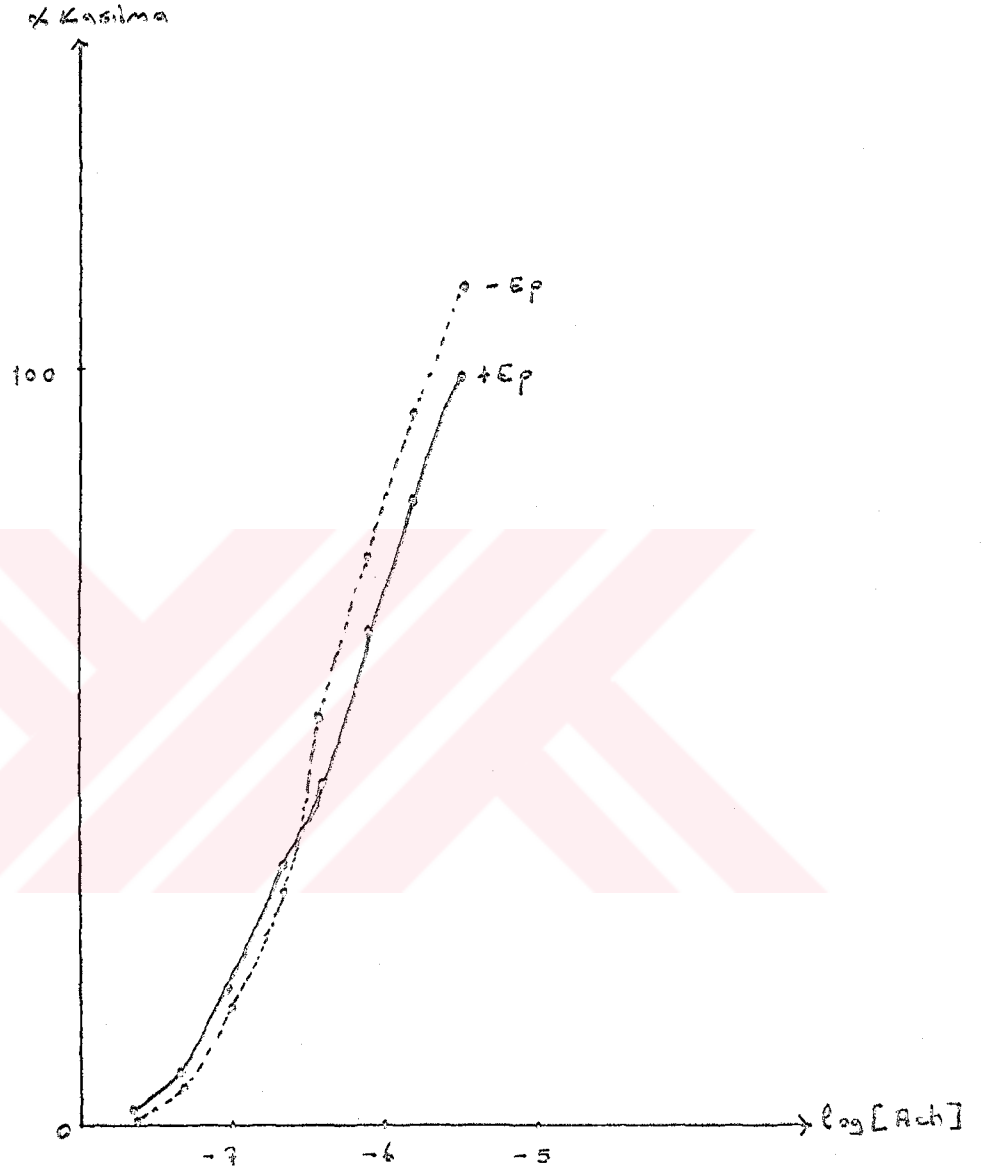
Ach'e verilen cevapların epitelin tahribi ile değişip değişmediğini anlamak için 4 ng/ml,8 ng/ml,16 ng/ml, 32 ng/ml Ach konsantrasyonlarında 30 kontrol,30 epiteli tahrip edilmiş doku cevabı alınırken 64 ng/ml,128 ng/ml, 256 ng/ml ve 512 ng/ml Ach konsantrasyonları için 6 kontrol 6 epiteli tahrip edilmiş doku cevapları alındı.

Ach'e verilen kontraktil cevaplara PGE_2 ve PGF_2 alfa-
nın etkilerini test etmek için 9 kontrol 9 epiteli tahrip
edilmiş doku cevabı karşılaştırılırken sodyum nitroprussi-
yat ve metilen mavisi için 6 kontrol 6 epiteli tahrip edil-
miş doku cevapları karşılaştırıldı.

Sonuçların değerlendirilmesi için "t" testi kullanılı-
dı. İki ortalama arasındaki farkın önemlilik testine göre el-
de edilen "t" değerleri "t" tablosundaki $(n_1+n_2) - 2$ ser-
bestlik derecesinde $\alpha=0.05$ yanlışma olasılığı için belirle-
nen "t" tablo değerleri ile karşılaştırıldı. Eşler arasında-
ki farkın önem kontrolünde ise elde edilen "t" değerleri
"t" tablosundaki n-1 serbestlik derecesinde $\alpha=0.05$ yanlışma
olasılığı için tespit edilen "t" tablo değerleri ile karşı-
laştırıldı.

5. B U L G U L A R

Koyun trakea düz kası üzerinde birinci aşamada yapılan altı deneyde Ach'e karşı kontraktıl cevaplar alındı. Ach izole organ banyosuna 4 ng/ml, 8 ng/ml, 16 ng/ml, 32 ng/ml, 64 ng/ml, 128 ng/ml, 256 ng/ml, 512 ng/ml konsantrasyonlarda kümülatif olarak ilave edilip kontrol cevaplar alındı. Sonra test organı Krebs Henseleit solüsyonu ile üç kez yıkılarak Ach'in ortamdan uzaklaşması sağlandı. Doku yirmi dakika dinlendirilip tekrar yıkandıktan sonra ortama 54 ng/ml konsantrasyonda metilen mavisi ilave edildi. 2-3 dakika sonra Ach tekrar aynı dozlarda kullanılarak metilen mavisi varlığında Ach'in trakea düz kası üzerindeki kontraktıl etkilerinin değişimi saptanmaya çalışıldı. Böyle bir cevap seti için bir doku kullanıldı, aynı doku ile yeni bir çalışma yapılmadı. Benzer çalışma epiteli sağlam koyun trakea şeritlerinde olduğu gibi epiteli tahrip edilmiş koyun trakea şeritlerinde de altı kez tekrarlanarak yapıldı. Ach'in için çizilen doz cevap eğrisinde epitelin tahribinden sonra maksimum cevabın %12 oranında artış gösterdiği ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (şekil-1).

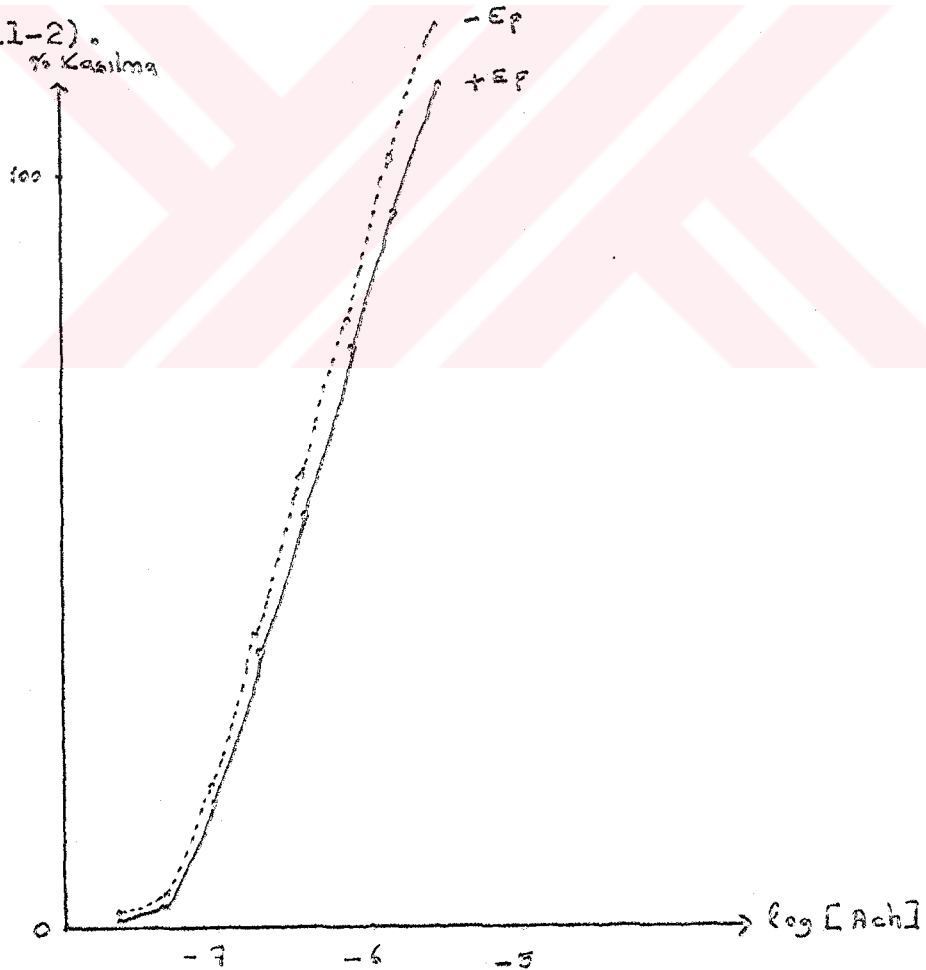


Şekil-1 : Epiteli (—) ve epiteli tahrip edilmiş (---) koyun trakea şeritlerinin Ach'e verdiği cevaplar.

Epiteli sağlam ve tahrip edilmiş koyun trakea şeritlerinin Ach'e verdiği kontraktil cevaplar arasında hişbir Ach konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenemedi ($p > 0.05$) .

Metilen mavisi mevcudiyetinde Ach'e verilen kontraktil cevaplarda artış beklenmiş ; artış 32 ng/ml Ach konsantrasyonundan sonra belirginleşmiştir. Ancak bu artışlar epiteli sağlam ve tahrip edilmiş trakea şeritlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p > 0.05$)

(şekil-2) .



şekil-2 : Epiteli sağlam (—) ve tahrip edilmiş (---)

koyun trakea şeritlerinin metilen mavisi varlığında Ach'e verdiği cevaplar.

Ortama metilen mavisi ilavesinden sonra 4 ng/ml, 8 ng/ml, 16 ng/ml Ach konsantrasyonlarında cevaplarında değişiklik olmamış ($p > 0.05$) ancak 32 ng/ml ve sonraki Ach konsantrasyonlarında alınan kontraktıl cevaplar artış göstermiştir ($p < 0.05$).

Çalışmanın diğer aşamalarında Ach izole organ banyosuna 4 ng/ml, 8 ng/ml, 16 ng/ml, 32 ng/ml konsantrasyonlarda kümülatif olarak ilave edilip kontrol cevaplar alındı. Bu cevaplardan sonra test dokusu Krebs Henseleit solüsyonu ile üç kez yıkanarak Ach ortamdan uzaklaştırıldı ve doku yirmi dakika süreyle dinlendirildi. Yirmi dakika sonra doku tekrar yıkanarak ortama 1 µg/ml konsantrasyonda PGE_2 veya PGF_2 alfa veya 10^{-5} M sodyum nitroprussiyat ilave edilip 2-3 dakika beklendi. Ach ortama tekrar ilave edilip kontraktıl cevaplar alındı. İşlem bittikten sonra doku tekrar yıkanarak yirmi dakika süreyle dinlendirildi ve aynı dokudan en fazla iki veya üç cevap alındı. Benzer uygulamalar epiteli tahrip edilmiş koyun trakea şeritleri kullanılarak da yapıldı. PGE_2 ve sodyum nitroprussiyat ilavesinden sonra kontraktıl cevaplar düştüğü gibi koyun trakea düz kasında etkisiz olduğu ileri sürülen (13) PGF_2 alfa ilavesinden sonra da kontraktıl cevaplarında düşüş gözlemlendi. Oluşan düşüş miktarları % inhibisyon değerleri olarak her doz için ayrı ayrı hesaplandı.

PGE_2 , PGF_2 alfa ve sodyum nitroprussiyat varlığında Ach'e verilen kontraktıl cevapların epitelli ve epiteli

tahrip edilmiş dokulardaki düşüş oranları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$), (Tablo-1, Tablo-2, Tablo-3).

<u>Ach ng/ml</u>	<u>İNTAKT TRAKEA</u> <u>% İnhibisyon</u>	<u>DENÜDE TRAKEA</u> <u>% İnhibisyon</u>
4	88.10	91.48
8	80.70	76.23
16	78.06	75.99
32	67.90	68.11

Tablo-1 : 1 $\mu\text{g/ml}$ PGE_2 mevcudiyetinde Ach'e verilen kontraktıl cevaplardaki düşüş oranları.

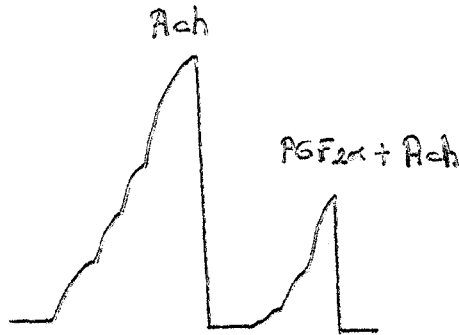
<u>Ach ng/ml</u>	<u>İNTAKT TRAKEA</u> <u>% İnhibisyon</u>	<u>DENÜDE TRAKEA</u> <u>% İnhibisyon</u>
4	49.90	52.22
8	48.70	25.41
16	53.21	43.19
32	42.65	34.08

Tablo-2 : 1 $\mu\text{g/ml}$ PGF_2 alfa varlığında Ach'e verilen kontraktıl cevaplardaki düşüş oranları.

<u>Ach ng/ml</u>	<u>İNTAKT TRAKEA</u> <u>% İnhibisyon</u>	<u>DENÜDE TRAKEA</u> <u>% İnhibisyon</u>
4	100	100
8	100	100
16	97.36	100
32	84.25	88.92

Tablo-3 : 10^{-5} M Sodyum nitroprussiyat varlığında Ach'e verilen kontraktıl cevaplardaki düşüş oranları.

PGF₂ alfanın koyun trakeasında etkisiz olduğu ileri sürülen görüşlerin aksine PGF₂ alfa Ach'e verilen kontraktıl cevapları Ach'in bütün konsantrasyonlarında anlamlı bir şekilde düşürmüştür ($p < 0.05$), (Şekil-3).



Şekil-3 : PGF₂ alfa varlığında Ach'e verilen kontraktıl cevaplardaki değişime ait bir örnek.

6. P A R T İ Ş M A

Astmalı şahıslarda solunum sistemi epiteli anormal olduğundan (14) solunum sistemi epitelinin alt tabakadaki düz kasın çeşitli bronkokonstrüktör ve bronkodilatör maddelere karşı duyarlılığını modüle edip etmediği konusunda pek çok çalışma yapılmaktadır (36).Gerçekten de trakea epiteli uyarıcı maddelere karşı penetrasyon bariyeri oluşturup sekresyon ve silier aktivitesiyle irritan parçacıkların bronşlardan atılmasında önemli rol oynar (14).Solunum sistemi epiteli afferent sinir uçlarını örttüğü gibi gevşetici faktör salınımı da yapabilir (27).Sonuçta epitel hasarı bronşiyal aşırı duyarlılığa neden olabilir (14). Bu nedenle in vitro koşullarda solunum sistemi epiteli tahrip edilerek astma taklit edilmeye çalışılır (36).Bu çalışmaların bir çoğunda kobay (7,16,25),köpek (1,12),sığır (4) gibi hayvanlarla insan (35) solunum sistemi epitelinin alt tabakadaki düz kasın çeşitli kontraktıl maddelere verdiği cevapları inhibe eden bir faktör salgıladığı gösterilmiştir.Koaksiyel biyoassay çalışmalarıyla da koyun trakea epitelinden damar gevşetici etkisi olan inhibitör bir madde salgılandığı saptanmıştır (8).Ancak bu çalışmamızda koyun trakea epitelinin tahribinden sonra Ach'e verilen kontraktıl cevaplar istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik

göstermedi. Aynı şekilde PGE_2 , PGF_2 alfa, sodyum nitroprussiyat ve metilen mavisi varlığında Ach'e alınan kontraktıl cevaplar da epitelin tahribinden sonra anlamlı bir değişiklik göstermedi. Dolayısıyla koyun trakea epitelinden trakea düz kasının cevaplarını modüle eden bir faktör salgılanmadığı kanısına varıldı. Köpek (18) ve tavşanda (35) yapılan benzer çalışmalar epitelin solunum sisteminin değişik seviyelerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle koyun solunum sisteminin bütün seviyelerindeki epitelin etkisini anlamak için daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

Koyun trakea ve akciğer şeritlerinin duyarsız olduğu belirtilen (13) PGF_2 alfanın çalışmamızda koyun trakea şeritlerinin Ach'e verdiği kontraktıl cevapları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi. Bu bulgu PG'lerin çeşitli türlerde saptanan dual etkinliğine uygunluk göstermektedir.

Sığır ve kobay trakea düz kas dokusunda HA'e verilen kontraktıl cevaplar sırasında cGMP seviyelerinde artış gözleendiğinden (26) çalışmamız süresince Ach'e alınan kontraktıl cevapları cGMP'nin etkileyip etkilemediğini anlamak amacıyla solubl guanilat siklaz inhibitörü olan (23) metilen mavisinden yararlanıldı. Ortama metilen mavisi ilave ettikten sonra Ach'in 32 ng/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarında alınan kontraktıl cevaplar istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi. Bu artış Ach'in kontraktıl cevaplarına cGMP'-

nin iřtirak ettiđini dūřundūrmūřtur. Dolayısıyla bazal olarak bulunan veya Ach etkisi ile oluřumu indūklenen cGMP Ach'den beklenmesi gereken kontraktil cevapların dūřmesine; bu nedenle cGMP oluřumunun önlenmesi veya azaltılması Ach'e verilen kontraktil cevapların artmasına neden olacaktır.

7. Ö Z E T

İzole koyun trakea şeritleri kullanılarak yapılan bu çalışmada :

1 - Ach'e verilen kontraktıl cevaplar sırasında trakea düz kasının duyarlılığını değiştiren herhangi bir faktörün epitelden salgılanmadığı ; diğer bir deyişle trakea epitelinden inhibitör veya eksitatör bir madde veya maddeler salgılanıyorsa dahi bunun koyun trakea düz kasında etkisiz olduğu gözlemlendi.

2 - 32 ng/ml ve daha fazla konsantrasyondaki Ach'e verilen kontraktıl cevapların solubl guanilat siklaz inhibitörü olan metilen mavisi tarafından artırıldığı saptandı. Ancak bu artışın epitelli ve epiteli tahrip edilmiş dokular-
da farklı olmadığı gözlemlendi.

3 - Koyun trakeasında etkisiz olduğu belirtilen PGF_2 alfa Ach'e verilen kontraktıl cevapları anlamlı bir şekilde azalttı. Ancak bu azalışın epitelli ve epiteli tahrip edilmiş dokularda farklı olmadığı saptandı.

4 - PGE_2 ve sodyum nitroprussiyat epitelli ve epiteli tahrip edilmiş preperatlarda Ach'e verilen kontraktıl cevapları azaltırken iki doku arasındaki cevapların anlamlı bir farklılık göstermediği gözlemlendi.

8. S U M M A R Y

These results have been obtained in our study :

1 - No factor changing the sensitivity of sheep tracheal smooth muscle was released from the epithelium during the contractile responses to Ach, in other words, if an inhibitory or excitatory factor(s) are released from sheep tracheal epithelium, they are ineffective in isolated sheep tracheal smooth muscle strips.

2 - Contractile effects to 32 ng/ml or more Ach, were enhanced by a soluble guanylate cyclase inhibitor, methylene blue, but this enhancement was not different both in intact and epithelium denuded tracheal tissue.

3 - PGF_2 alpha ; which is known to be ineffective on isolated sheep tracheal tissue, attenuated the contractile responses to Ach. But this attenuation was not different both in intact and epithelium denuded tracheal tissue.

4 - PGE_2 and Na nitroprussid attenuated the contractile responses to Ach both in intact and epithelium denuded tracheal tissue and no significant difference was found between these responses.

9. L I T E R A T Ü R L İ S T E S İ

- 1 - AARRHUS, L.L., RIMELE, T.J., VANHOUTTE, P.M. (1984) : Removal of epithelium causes bronchial supersensitivity to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. *Ped. Proc.* 43 : 995.
- 2 - AIZAVA, H., MIYAZAKI, N., SHIGEMATSU, N., TOMOOKA, M. (1988) : A possible role of airway epithelium in modulating hyperresponsiveness. *Br. J. Pharmacol.*, 93 : 135-145.
- 3 - AKÇASU, A. (1959) : The physiologic and pharmacologic characteristics of the tracheal muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 122 : 201.
- 4 - BARNES, P.J., CUSS, F.M., PALMER, J.B. (1985) : The effect of airway epithelium on smooth muscle contractility in bovine trachea. *Br. J. Pharmacol.*, 86 : 685-691.
- 5 - BEWLEY, J., BHOOLA, K.D., CROTHERTS, D.M., CINGI, M.I. (1987) : Biphasic responses of the isolated guinea-pig tracheal muscle strip to kallidin and bradykinin. *Br. J. Pharmacol.*, 92 : pSupp 597.
- 6 - BRUNELLESCHI, S., HAYE-LEGRAND, I., LABAT, C., NOREL, X., BENVENISTE, J., BRINK, C. (1987) : Platelet activating factor-acether induced relaxation of guinea-pig airway muscle : Role of prostaglandin E₂ and the epithelium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 243 : 356-363.

- 7 - CİNGİ, M.İ., EROL, K., CİNGİ, C., CİNGİ, E. (1989) : The role of epithelium on the responsiveness of guinea-pig tracheal muscle to contractile and relaxant agonists. *J. Health Sci.*, 1 : 169-174.
- 8 - CİNGİ, M.İ., İLHAN, M., EROL, K., TUNCEL, N., FİDAN, M. (1987) : Koyun trakea epitelinden gevşetici faktör salıverilmesinin biyoassay yöntemi ile araştırılması. *İstanbul Tıp Fakültesi 9. Kurultayı, Bildiriler, 4. Cilt* : 106-110.
- 9 - FARMER, S.G., FEDAN, J.S., HAY, D.W.P., RAEBURN, D. (1986) : The effects of epithelium removal on the sensitivity of guinea-pig isolated trachealis to bronchodilator drugs. *Br. J. Pharmacol.*, 89 : 407-414.
- 10- FARMER, S.G., TOGO, J. (1990) : Effects of epithelium removal on relaxation of airway smooth muscle induced by vasoactive intestinal peptide and electrical field stimulation. *Br. J. Pharmacol.*, 100 : 73-78.
- 11- FERNANDES, L.B., GOLDIE, R.G. (1990) : Pharmacological evaluation of a guinea-pig tracheal epithelium-derived inhibitory factor (E_p DIF). *Br. J. Pharmacol.*, 100 : 614-618.
- 12- FLAVAHAN, N.A., AARRHUS, L.L., RIMELE, T.J., VANHOUTTE, P.M. (1985) : Respiratory epithelium inhibits bronchial smooth muscle tone. *J. Appl. Physiol.*, 58 (3) : 834-838.
- 13- GARDINER, P.J. (1989) : Eicosanoids and airway smooth muscle. *Pharmac. Ther.*, 44 : 1-62.

- 14- GOLDIE, R.G., PAPADIMITRIOU, J.M., PATERSON, J.W., RIGBY, P.J., SELF, H.M., SPINA, D. (1986) : Influence of the epithelium on responsiveness of guinea-pig isolated trachea to contractile and relaxant agonists. *Br.J.Pharmacol.*, 87 : 5-14.
- 15- GOLDIE, R.G., FERNANDES, L.B., FARMER, S.G., HAY, D.W.P. (1990) : Airway epithelium-derived inhibitory factor. *TIPS*, 11 : 67-70.
- 16- HAY, D.W.P., FARMER, S.G., RABBURN, D., ROBINSON, V.A., FLEMING, W.W., FEDAN, J.S. (1986) : Airway epithelium modulates the reactivity of guinea-pig respiratory smooth muscle. *Eur.J.Pharmacol.*, 129 : 11-18.
- 17- HAY, D.W.P., RABBURN, D., FARMER, S.G., FLEMING, W.W., FEDAN, J.S. (1986) : Epithelium modulates the reactivity of ovalbumin-sensitized guinea-pig airway smooth muscle. *Life Sci.*, 38 : 2461-2468.
- 18- HAY, D.W.P., RABBURN, D., FEDAN, J.S. (1987) : Regional differences in reactivity and in the influence of the epithelium on canine intrapulmonary bronchial smooth muscle responsiveness. *Eur.J.Pharmacol.*, 141 : 363-370.
- 19- HOLROYDE, M.C. (1986) : Influence of epithelium on the responsiveness of guinea-pig isolated trachea. *Br.J. Pharmacol.*, 87 : 501-507.
- 20- HOLTZMAN, M.J., HANSBROUGH, J.R., ROSEN, G.D., TURK, J. (1988) : Calcium dependent release of eicosanoids in human

- cultured bronchial epithelia cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 963 : 401-413.
- 21- IGNARRO, L.J., LIPPTON, H., EDWARDS, J.C., BARICOS, W.H., HYMAN, A.L., KADOWITZ, P.J., GRUETTER, C.A. (1981) : Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide : Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 218 (3) : 739-748.
- 22- IGNARRO, L.J., HARBISON, R.G., WOOD, K.S., WOLIN, M.S., McNAMARA, D.B., HYMAN, A.L., KADOWITZ, P.J. (1985) : Differences in responsiveness of intrapulmonary artery and vein to arachidonic acid : Mechanism of arterial relaxation involves cyclic guanosine 3':5':monophosphate and cyclic adenosine 3':5':monophosphate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 233 (3) : 560-568.
- 23- IGNARRO, L.J., HARBISON, R.G., WOOD, K.S., KADOWITZ, P.J. (1986) : Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein : Stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237 (3) : 893-900.
- 24- İLHAN, M., ŞAHİN, İ. (1986) : Tracheal epithelium releases a vascular smooth muscle relaxant factor : Demonstration by bioassay. *Eur. J. Pharmacol.*, 131 : 293-296.
- 25- IRIARTE, C.F., PASCUAL, R., VILLANUEVA, M.M., ROMAN, M.,

- CORTIJO, J., MORCILLO, E. J. (1990) : Role of epithelium in agonist-induced contractile responses of guinea-pig trachealis : Influence of the surface through which drug enters the tissue. *Br. J. Pharmacol.*, 101 : 257-262.
- 26- KATSUYAMA, H., SUZUKI, S., NISHIYE, E. (1990) : Action of second messengers synthesized by various spasmogenic agents and their relation to mechanical responses in dog tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 100 : 41-48.
- 27- KAYAALP, S. O. (1990) : Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt 2, Feryal Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti., ANKARA.
- 28- LAITINEN, L. A., HEINO, M., LAITINEN, A., KAVA, T., HAAHTELA, T. (1985) : Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 13 : 599-606.
- 29- LAMPORT, S. J., FEDAN, J. S. (1990) : Modulation of the reactivity of the guinea-pig isolated trachealis by respiratory epithelium : Effects of cooling. *Br. J. Pharmacol.*, 99 : 369-373.
- 30- LIEDTKE, C. M. (1986) : Interaction of epinephrine with isolated rabbit tracheal epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 251 : c209-215.
- 31- MURLAS, C. (1986) : Effects of mucosal removal on guinea-pig airway smooth muscle responsiveness. *Clin. Sci.*,

70 : 571-575.

- 32- NAPOLI, S.A., GRUETTER, C.A., IGNARRO, L.J., KADOWITZ, P.J. (1980) : Relaxation of bovine coronary arterial smooth muscle by cyclic GMP, cyclic AMP and analogs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 212 (3) : 469-473.
- 33- NIJKAMP, F.P., FOLKERTS, G. (1987) : Reversal of arachidonic acid-induced guinea-pig tracheal relaxation into contraction after epithelium removal. *Eur.J. Pharmacol.*, 131 : 315-316.
- 34- RAEBURN, D., HAY, D.W.P., FARMER, S.G., FEDAN, J.S. (1986) : Epithelium removal increases the reactivity of human isolated tracheal muscle to methacoline and reduces the effect of verapamil. *Eur.J.Pharmacol.*, 123 : 451-453.
- 35- RAEBURN, D., HAY, D.W.P., ROBINSON, V.A., FARMER, S.G., FLEMING, W.W., FEDAN, J.S. (1986) : The effects of verapamil is reduced in isolated airway smooth muscle preparations lacking the epithelium. *Life Sci.*, 38 : 809-816.
- 36- RAEBURN, D. (1990) : Eicosanoids, epithelium and airway reactivity. *Gen.Pharmac.*, 21 (1) : 11-16.
- 37- SMALL, R.C., GOOD, D.M., DIXON, J.S., KENNEDY, I. (1990) : The effects of epithelium removal on the actions of cholinomimetic drugs in opened segments and perfused tubular preparations of guinea-pig trachea. *Br.J. Pharmacol.*, 100 : 516-522.

- 38- TSCHIRHART,E.,LANDRY,Y. (1986) : Airway epithelium releases a relaxant factor : Demonstration with substance P.Eur.J.Pharmacol.,132 : 103-104.
- 39- TSCHIRHART,E.,FROSSARD,N.,BERTRAND,C.,LANDRY,Y. (1987) : Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor.J.Pharmacol.Exp.Ther., 243 : 310-316.