

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

İZOLE DAMAR FİZYOLOJİK YANITLARINI
ÖLÇEBİLMEK İÇİN KUYUCUKLU ÖLÇÜM
TEKNİĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE KLASİK ORGAN
BANYOSUYLA KARŞILAŞTIRILMASI

Melike Nur AKBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

İZOLE DAMAR FİZYOLOJİK YANITLARINI
ÖLÇEBİLMEK İÇİN KUYUCUKLU ÖLÇÜM
TEKNIĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE KLASİK ORGAN
BANYOSUYLA KARŞILAŞTIRILMASI

Melike Nur AKBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Cahit NACİTARHAN

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Farmakoloji Programında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 26/06/2019

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Cahit NACİTARHAN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Coşkun USTA
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Dr Öğr. Üyesi Şükriye YEŞİLOT
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Melike Nur AKBAŞ

İmza

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Cahit NACİTARHAN

İmza

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin her aşamasında sahip olduğu bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Doç Dr. Cahit NACİTARHAN'a değerli fikirleri, rehberliği ve akademik gelişimime olan katkıları için,

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Coşku USTA'ya ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda görev alan tüm değerli hocalarıma çalışmalarımız ve kişisel gelişimimize verdiği destekler için,

Yüksek lisansım ve lisansım süresince beraber eğitim gördüğüm, beni her aşamada destekleyen ve yardımcı olan Şevval AKSOYALP'e ve Ayşe Gül Gönen, Ayşe BARUTÇUGİL, Dilara SAMUR başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Hayatımın her aşamasında her türlü desteğiyle yanımda olan sevgili annem, babam, ablama,

tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Amaç: Bu projenin amacı, çoklu kuyucuklu organ banyosu (MuWOB) modelinin modifiye ederek geliştirmek ve bu yöntemi klasik organ banyosu sonuçları ile karşılaştırmaktır.

Yöntem: 96'lık plate'ler, plate'in altından teleobjektif takılmış monokron 10Mp çözünürlükte kamera ile görüntülenmektedir. Kameranın plate'e uzaklığı aynalar kullanılarak daha küçük bir alana indirgenmiştir. Alınan görüntüden yazılım aracılığıyla damarların pikselleri sayılıp, bu veri damarın fizyolojik yanıtlarını belirlemede kullanılmıştır. Damar fizyolojik yanıtları olarak kasılma yanıtları (fenilefrinle 10^{-11} - 10^{-6} M kümülatif ve 68 mM KCI ile) ve gevşeme yanıtları (asetilkolin 10^{-11} - 10^{-6} M kümülatif ve SNP (sodyum nitroprussid) 10^{-11} - 10^{-6} M kümülatif) ölçülmüştür.

Bulgular: Modifiye ettiğimiz MuWOB sisteminde, distorsiyonun ortadan kalktığı, neredeyse tüm kuyucuklardan görüntü alınabildiği ortaya çıkmıştır. Kameradan elde edilen görüntüler karşılaştırıldığında, modifiye MuWOB ile plate'in neredeyse tümünde net bir biimde görüntü elde edilebilmiştir. Endotelin ne derece korunduğuna ilişkin karşılaştırmada ise, modifiye MuWOB sisteminde endotel yanıtlarının klasik organ banyosu sonuçlarına göre daha iyi korunduğu görülmüştür. Aynı zamanda kuyucuklarda, gazlanmış ve gazlanmamış Krebs solüsyonu kullanımı açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Modifiye MuWOB sisteminde alttan görüntüleme sağlanarak kırılma indisinin etkisi ortadan kaldırılmıştır

Sonuç: Organ banyosuna alternatif olmaya aday MuWOB sisteminin, klasik organ banyosuna göre avantajları bulunmaktadır. Bizim geliştirdiğimiz modifiye MuWOB sistemi de MuWOB'un pratikte kullanılabilirliğini artırılmasına ve ticarileştirilmesine katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: organ banyosu, kuyucuk, aort

ABSTRACT

Objective: The aim of this project is to modify and improve the multi-well organ bath (MuWOB) model and compare this method with the results of classical organ bath.

Method: 96-well plates are displayed with a lens fitted monochrom 10 Mp resolution camera attached to the bottom of the plate. The distance of the camera to the plate is reduced to a smaller area using mirrors. The pixels of the vessels were counted from the downloaded image. This data was used to determine the physiological responses of the vessel. Contraction responses (phenylephrine 10^{-11} - 10^{-6} M cumulative and 68 mM KCl) and relaxation responses (acetylcholine 10^{-11} - 10^{-6} M cumulative and SNP (sodium nitroprusside) 10^{-11} - 10^{-6} M cumulative) were measured as physiological responses of the vessel.

Results: In the modified MuWOB system, distortion disappeared and images were obtained from almost all wells. Comparing the images obtained from the camera, the modified MuWOB was able to produce a clear image in almost all of the plate. In the comparison of the degree of protection of endothelium, it was observed that endothelial responses were better preserved in the modified MuWOB system compared to classical organ bath results. Also, there was no significant difference in the use of gassed and non-gassed Krebs solution in the wells. In the modified MuWOB system, the effect of the refractive index was eliminated by providing visualization from the bottom.

Conclusion: The MuWOB system, which is an alternative to an organ bath, has advantages over a conventional organ bath. The modified MuWOB system that we developed can also contribute to the practical use and commercialization of MuWOB.

Key words: organ bath, well, aorta

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Normal Arter Yapısı	3
2.1.1 Endotel Yapısı ve Fonksiyonları	3
2.1.2. Düz Kas Hücresi	4
2.1.3. Adventisyum	5
2.1.4. Periadventisyal Adipoz Doku	5
2.2. Arteriyel Tonüs Regülasyonu	5
2.2.1. Endotel Türevi Kasıcı Faktörler	6
2.2.2. <i>Ex-vivo</i> Kasıcı Yanıtlar	8
2.2.3. Endotel Türevi Vazodilatör Faktörler	9
2.2.4. <i>Ex-vivo</i> Gevşetici Yanıtlar	12
2.3. Klasik İzole Organ Banyosu Deneyleri	13
2.3.1. İzole Damar Halka Parçaları	15
2.3.2. Kanüle Edilmiş Perfüze Sistemlerin Kullanıldığı İzole Damar Parçaları	17
2.4. Vasküler Düz Kasta Kasılma Mekanizmaları	18
2.4.1. Düz Kasta Ca^{2+} Bağımlı Kasılma	18
2.4.2. Ca^{2+} Duyarlılaştırıcı Mekanizma ve Düz Kas Kasılması	20
	iii

2.5. Vasküler Düz Kasta Gevşeme Mekanizmaları	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Normal bir arterdeki duvar katmanlarının şematik gösterimi	4
Şekil 2.2.	Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE)/ACE-2 etkisi ve biyoaktif anjiyotensin peptidlerinin sentezi	7
Şekil 2.3.	NO sentezi ve vasküler düz kas hücresinin gevşemesi	10
Şekil 2.4.	Halka şeklinde kesilmiş damar preparatlarının organ banyosuna yerleştirilmesi	16
Şekil 2.5.	Bir perfüzyon sisteminin şematik diyagramı	18
Şekil 2.6.	Düz kasta kasılmanın düzenlenmesi	19
Şekil 2.7.	Vasküler düz kasta vazodilatasyonun düzenlenmesi	22
Şekil 4.1a	Multi-well organ bath (MuWOB) sistemi	25
Şekil 4.1b	Modifiye MuWOB sistemi	26
Şekil 4.2a	MuWOB sisteminden görüntü	27
Şekil 4.2b	Modifiye MuWOB sisteminden görüntü	27
Şekil 4.3a	Rat abdominal aortasının organ banyosunda ve modifiye MuWOB sistemindeki Fenilefrin (FE)-Asetilkolin (ACh) konsantrasyon yanıt eğrileri	28
Şekil 4.3b	Borges ve arkadaşlarının oluşturduğu Multi-well organ bath (MuWOB) sistemindeki Fe-ACh konsantrasyon yanıt eğrisi	28
Şekil 4.4	Karışım gazıyla gazlanmış ve gazlanmamış rat abdominal aorta preparatınının 70 mM KCl çözeltisiyle oluşturduğu kasılmaların karşılaştırılması.	29

Şekil 4.5	MuWOB sistemindeki damar preparatının yerleri ile Şekil 4.5b'deki modifiye MuWOB sistemindeki damarların karşılaştırılması.	30
Şekil 4.6	Doku üzerinde bazal gerilim oluşturulması.	31
Şekil 4.7	Stok solüsyonlar için 37°C derecede sabit ısıtma sağlayan sistem	32
Şekil 4.8	MuWOB ve modifiye MuWOB sistemleri arasında görüntüleme sistemlerinin karşılaştırılması.	33
Şekil 4.9	Yazılım arayüzü	34
Şekil 4.10.	Modifiye MuWOB sistemi	35

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACE	:	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
Ang I	:	Anjiyotensin I
AT1R	:	Anjiyotensin 1 reseptörü
AT2R	:	Anjiyotensin 2 reseptörü
BH4	:	Tetrahidrobiyopterin
BK2	:	Bradikinin-2
Ca²⁺	:	Kalsiyum
Ca,Mg-ATPaz	:	Kalsiyum, Magnezum ATPaz
cGMP	:	Siklik Guanozin Monofosfat
COX	:	Siklooksijenaz
DG	:	Diaçilgliserol
ET-1	:	Endotelin
FE	:	Fenilefrin
IP3	:	İnositol Trisfosfat
KATP	:	ATP'ye Duyarlı Potasyum Kanalı
KCa	:	Kalsiyum İle Aktive Olan Potasyum Kanalı
KCl	:	Potasyum Klorür
Kir	:	İçe Yönelik Doğrultucu Potasyum Kanalı

KV	:	Voltaj Bağımlı Potasyum Kanalı
MLC kinaz	:	Miyozin Hafif Zincir Kinazın
MuWOB	:	Çoku kuyucuklu Organ banyosu; Multiple Well Organ Bath
NA	:	Noradrenalin
Na⁺/K⁺ ATPaz	:	Sodyum/Potasyum ATPaz
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NO	:	Nitrik oksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz
PGF2α	:	Prostaglandin F2 alfa
PGI₂	:	Proostasiklin
RhoGEF	:	Guanin Nükleotid Değişim Faktörü
ROC	:	Reseptör Bağımlı Kanal
sGC	:	Çözünür Guanilat Siklaz
SNP	:	Sodyum Nitroprussid
SOC	:	Depo Aracılı Kanal
TRP	:	Transient Reseptör Katyon Kanalı
TXA₂	:	Thromboksan A ₂
VSMC	:	Vasküler Düz Kas Hücreleri

1. GİRİŞ

Vasküler düz kas hücreleri (VSMC), yalnızca kan damarlarının vazokonstriksiyon, vazodilatasyon ve hücre dışı matriks üretimi gibi fizyolojik fonksiyonlarında değil, aynı zamanda ateroskleroz ve hipertansiyon gibi vasküler hastalıkların patogeneğinde, özellikle önemli rol oynamaktadır. İzole dokular üzerinde yapılan kasılma-gevşeme çalışmaları, kardiyovasküler, sindirim ve solunum yolları üzerinde etkili olan ilaçların mekanizmalarını anlamamız konusunda temel oluşturmuştur. Bu sebeple araştırmacılar *in-vivo* fizyolojik durumu taklit eden izole organ banyosu çalışmalarını sıklıkla kullanmaktadır. İzole edilen dokudaki kasılma çalışmaları geleneksel olarak organ banyolarında gerçekleştirilmektedir. Bu klasik organ banyolarında yapılan çalışmalarda bir parça kontraktıl doku sıcaklığı kontrol altında tutulan fizyolojik bir çözelti içine daldırılmaktadır. Bu Organ banyosu ünitesi, ayrıca havalandırma sistemi, fizyolojik solüsyonları değiştirmek için tasarımına dahil edilen sıvı aktarma valflerine de sahiptir . Kasılmayı kaydetmek için, doku izometrik veya izotonik transdüslere bağılı olarak bulunmaktadır (Kenakin, 2001). Bu *in vitro* teknik önemli bir değeri olmasına karşın, organ banyolarının kullanımının yavaş olması, çok fazla tezgah alanı kaplıyor olması, çok miktarda etkin madde tüketiliyor olması ve önemli sayıda eğitilmiş personel gerektiriyor olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır. İzole edilmiş vasküler dokular ilaç testi için sıklıkla kullanılmaktadır ve sıçan aort halkaları vazoaaktif ilaçların tayini için temel bir preparat olmaya devam etmektedir (Borges ve ark., 1989).

Ön-gerim yokluğunda düz kas kasılmasını ölçmek için kullanılan yöntemler daha önce akciğer dilimlerinde doğrulanmıştır (Perez ve Sanderson, 2005). Bu yaklaşımlarda mikrovasküler yapı gözlemlenerek mikroskop altında luminal alanları tahmin etmek için çalışmamızdakine benzer bir yöntem kullanılmıştır. Bu teknik, ilacın taranması için uygun olmamasına rağmen arteriollerde ve bronşiollerdeki gözlemleri kombine edilebildiği son derece ilginçtir. Perfüze edilmiş sistemler de *in-vivo* fizyolojik radyal gerimi taklit eden diğer yöntemlerden biridir (Hrdina ve ark., 1967; Borges ve ark., 1989; Falloon ve Heagerty, 1994).

Borges ve arkadaşları sıçan aort halkasının otomatik kasılma analizleri için çoklu-kuyucuk plakeleri kullanarak, optik metodlara dayanan neredeyse tüm laboratuarlarda uygulanabilecek bir yazılım sistemi geliştirilmiştir. Sıçan aort halkaları (≈ 0.5 mm uzunluğunda) 96 96-çoklu-kuyucuklu plakalara yerleştirilmiştir. Lümen damar alanları ise yeni geliştirilen algoritmalar kullanılarak uygulanan USB kamera ile sürekli izlenmiştir. Çoklu kuyucuklu organ banyosu (MuWOB) metodunda transdusor bulunmamaktadır. Bu yüzden klasik organ banyolarında gözlemlenen endotelin mekanik hasarının bu model ile engellendiği belirtilmektedir. MuWOB modelinin daha küçük tezgah alanı (≈ 60 cm) kapladığı ve ayrıca hayvan sayısını, kullanılan ilaç ve tampon miktarını azalttığı ve bununla ilişkili olarak maliyette tasarruf sağladığı belirtilmiştir. Bu durum, doku kasılma-gevşeme çalışmalarını yapmak isteyen, ancak uygun teçhizattan yoksun laboratuvarlar için önemlidir. Ayrıca, spontan hipertansif sıçanlar (SHR), yaşlı, hayvanlar veya kronik tedavi alanlar gibi hayvansal materyalin sınırlı olduğunda deneylerde çoklu kuyucuklu organ banyosu modelinin fayda sağlayacağı belirtilmektedir. (Borges ve ark., 2016).

Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde bu çalışmada MuWOB modelinin bu avantajları sebebiyle modifiye MUWOB modeli oluşturulup, eksikliklerinin giderilmeye çalışılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Normal Arter Yapısı

2.1.1. Endotel Yapısı ve Fonksiyonları

Endotel dolaşım sisteminde damar duvarı permeabilitesinin sürdürülmesinde görevli, mezoderm kökenli tek katlı yassı epitel dokusundan oluşan organdır. Birçok fizyolojik ve patolojik olaylarda görev alır ve kan ile damar düz kası arasında lokalizedir (Cines ve ark., 1998). Dolaşımdaki kanın 1928'de William Harwey tarafından keşfedilmesinden kısa bir süre sonra kan ve dokuların fiziksel olarak ayrımını tanımlayan Malpighi'nin çalışmaları ile dolaşımdaki damar ağları aydınlatılmıştır (Fishman, 1982). Bunun yanında 1953'te Pallade'nin damar duvarındaki mikroskobik çalışmaları ve 1959'da Gowan'ın fizyolojik incelemeleri endotele olan ilgiyi artırmış ve gelecekteki çalışmalara ışık tutmuştur (Fishman, 1982).

Erişkin bir insanda endotel hücrenin yüzeyi yaklaşık olarak 6×10^{13} hücreden oluşmaktadır. Ağırlığı ise yaklaşık olarak 1 kg olup 1-7 m²lik bir yüzey alanına sahiptir (Augustin ve ark., 1994).

Endotel hücrelerinin:

- 1) düz kas hücrelerinin çoğalmasının stimülasyonu veya inhibisyonu;
- 2) plateletlerin adhezyonu veya agregasyonunun önlenmesi veya stimülasyonu
- 3) trombogenez ve fibrinolizis;
- 4) vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon arasındaki dengeler üzerinde önemli görevleri bulunmaktadır (Feletou ve Vanhoutte, 2007).

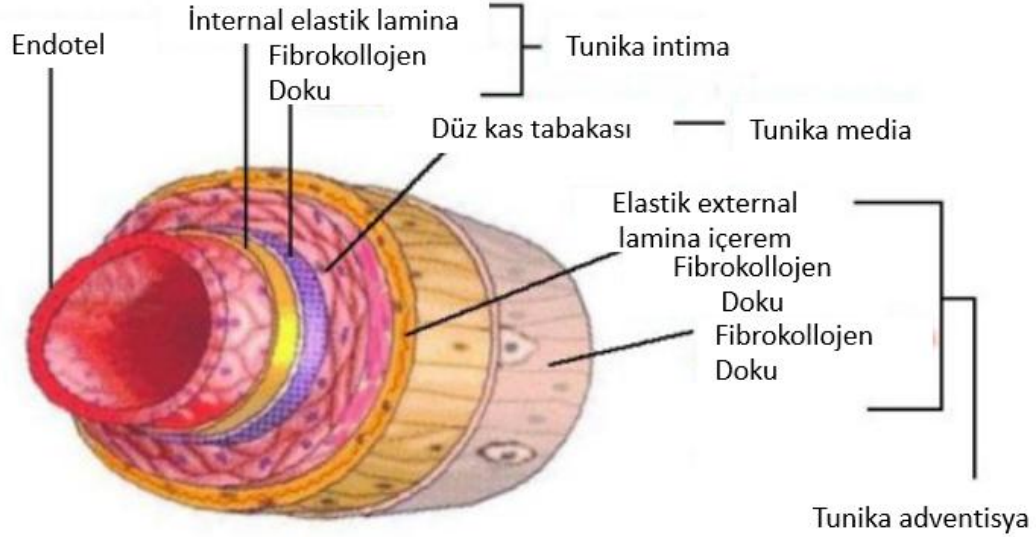
Endotelyum, önemli bir bariyer fonksiyonuna sahip olmasının yanı sıra, sadece elektronik tonüsün yayılmasını değil, aynı zamanda iyonların ve küçük moleküllerin transferine izin veren miyoendotel gap junctions vasıtasıyla vasküler düz kaslarla

iletişim kuran aktif transvasküler difüzyonunu da desteklemektedir (Feletou ve Vanhoutte, 2007).

Endotel hücreleri, sıvı, shear stress ve gerilim gibi belirli mekanik faktörlere de yanıt vermektedir. Endotel hücreleri tarafından algılanan bu faktörler ile hücre içi sinyalizasyon, gen ve protein ekspresyonları modifiye edilerek fonksiyonel düzenleme getirilmektedir (Esper ve ark., 2006).

2.1.2. Düz Kas Hücresi

İnternal elastik lamina tunika intimayı tunika mediadan ayırmaktadır. Tunika media katmanlar halinde sıralanan düz kas hücrelerinden oluşmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Normal bir arterdeki duvar katmanlarının şematik gösterimi

Ekstraselüler matriks çoğunlukla elastik fibriller ve kollajen, daha az oranda da proteoglikan içeriği ile düz kas hücrelerini bir arada tutmaktadır. Artmış elastin içeriği kalpten kanın çıkarılmasını sağlayan büyük arterlerin önemli bir özelliğidir. Oysa ki rezistans damarları olarak işlev gören daha periferik arterler kan basıncı değişikliklerini düzenleyebilmek için tipik olarak çok sayıda düz kas hücresine sahiptir. Vasküler düz kas tonüsü çeşitli biyolojik sinyaller nörotransmitterler ve hormonlar ile kontrol edilmektedir (Stocker ve Keaney, 2004).

2.1.3. Adventisyum

Tunica adventisya, vasküler duvarın en dış tabakasıdır ve genellikle elastin matriksi, düz kas hücresi, fibroblast ve kollojenden oluşmaktadır. Santral sinir sistemi aracılı arteriyel tonüs düzenlemesinin büyük bir kısmı bu katmana yönlendirilmektedir. Uzun yıllar boyunca adventisyum, vasküler yapı ile ilgisi olmayan oldukça pasif bir yapı olarak kabul edilmiştir. Günümüzde adventisyumun, vazomosyon, vasküler proliferasyon hipertrofi, ateroskleroz gibi oluşumlarda rolü olduğu düşünülmektedir (Pagano ve Gutterman, 2007).

2.1.4. Periadventisyal Adipoz Doku

Periadventisyal adipoz doku, merkezi sinir sisteminin bazı bölümleri hariç, arteriyel dolaşım boyunca geniş bir şekilde dağılmıştır. Periadventisyal adipoz doku aktif bir renin-anjiyotensin sistemine ve fonksiyonel endotelial Nitrik oksit sentaz'a (eNOS) sahip olup vasküler yapı ve fonksiyonu modüle etmektedir (Bujak-Gizycka ve ark., 2007). Obez sıçanların aortalarını çevreleyen yağ oranının artması, vasküler düz kas hücresi çoğalmasının yanı sıra, inflamatuvar hücrelerin birikmesine yol açan kemokinlerin üretilmesine ve salgılanmasına neden olmaktadır (Ketonen, 2010). Birçok kan damarının etrafını saran bu doku komşu dokularda kasılma meydana geldiğinde damarlara mekanik bir koruma da sağlamaktadır (Szasz ve Webb, 2012). Özetle periadventisyal adipoz doku ve diğer katmanlar arasındaki etkileşim sağlıklı ve hasta damarlar arasındaki dengeyi sağlamada majör role sahiptir (Ketonen, 2010).

2.2. Arteriyel Tonüs Regülasyonu

Arteriyel tonüs, vasküler düz kas hücrelerinin (VSMC) vazodilatasyon vazokonstriksiyonu arasındaki denge ile belirlenmektedir. Endotel, arteriyel tonüsün kontrolünde çift etkili bir fonksiyona sahiptir, farklı uyarıcılara cevap olarak hem gevşetici faktörleri (nitrik oksit (NO), prostasiklin (PGI₂), hiperpolarize edici faktörler gibi) hem de kasıcı faktörleri (angiotensin II (Ang II), endotelin-1 (ET-1), PGF₂ α (prostaglandin F₂ alfa), tromboksan A₂ (TXA₂) ve superoksid gibi) salgılamaktadır (Ketonen, 2010). Damar tonüsü, bu faktörler arasındaki dengeye ve VSMC'nin bunlara cevap verme yeteneğine bağlı olarak düzenlenmektedir (Vanhoutte, 1989). Sağlıklı bir

endotel, arteriyel tonüs ve kan viskozitesinin devamlılığını sağlar, anormal kan pıhtılaşmasını ve kanamasını engeller, inflamasyonu sınırlar ve düz kas hücre proliferasyonunu baskılar. Sağlıklı olmayan bir endotelde ise artmış inflamasyon, VSMC hipertrofisi, tromboz oluşumuna ve aterosklerotik plak oluşumuna meyil ve vazokonstriksiyon görülmektedir. Büyük arterlerdeki endotel regülasyonunda bozukluk sistol sırasında kalbin iş yükünü artıran arteriyel sertliğe yol açmaktadır. Ayrıca, periferik arterlerde endotel bütünlüğünün bozulması anormal vazomotor tonüsüne ve kan basıncının artmasına neden olmaktadır (Ketonen, 2010).

2.2.1. Endotel Türevi Kasıcı Faktörler

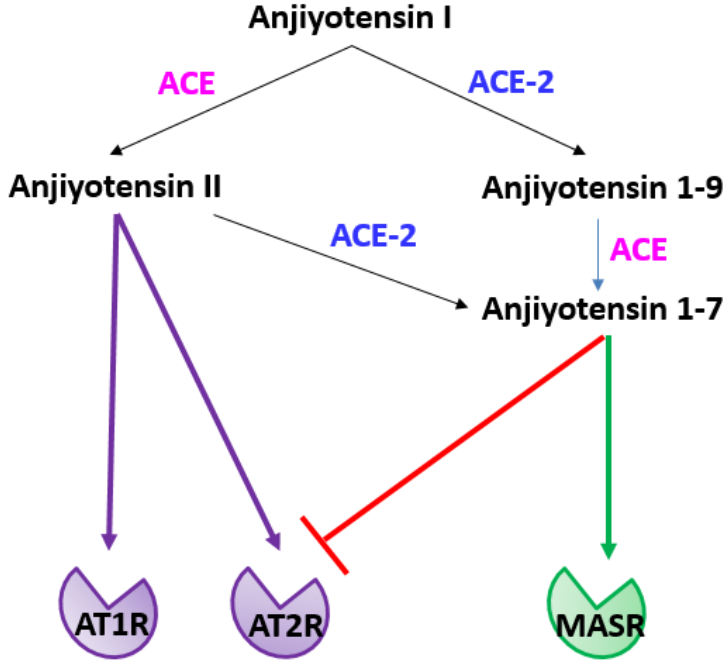
Anjiyotensin II (Ang II)

Ang II, kardiyovasküler sistemde vasküler tonüsü koruma ve miyokard aktivitesini arttırmadaki rolü ile büyük bir fizyolojik öneme sahiptir. Ang II, aldosteron sentezinin ve salıverilmesinin artırılması, sodyum reabsorbsiyonunun arttırması gibi aktivitelerle kan volümünün ve susama isteğinin artmasına sebep olmaktadır (Mehta ve Griendling, 2007). Vasküler, endotelial ve kardiyak hücrelerde patolojik olarak artan Ang II, reaktif oksijen türlerinin üretimine, inflamasyona, platelet aktivasyonuna, büyümeye ve fibrozise sebep olmaktadır. Bu patolojik oluşumlar ile hipertansiyon, ateroskleroz, kalp yetmezliği, kronik böbrek hastalıkları, insülin direnci gibi ciddi rahatsızlıklar meydana gelebilmektedir (Ketonen, 2010).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) insan ve hayvan endotelinde eksprese edilmektedir (Ketonen, 2010). Öncelikle renin anjiyotensinojeni parçalar ve böylece decapeptid yapıda anjiyotensin I (Ang I) meydana gelmektedir. Oktapeptit yapıdaki Ang II potent vazokonstriktördür ve ACE ile Ang I'den meydana gelmektedir. Ang I ayrıca ACE-2 ile anjiyotensin 1-9'a (Ang 1-9) dönüşebilmektedir. Anjiyotensin 1-7 (Ang 1-7) ise Ang 1-9'dan ACE ile meydana gelmekle birlikte alternatif olarak Ang II'den ACE-2 ile de oluşabilmektedir. Ayrıca, Ang 1-7'nin MAS reseptörü için endojen bir ligand olduğu da belirtilmektedir (Kanasaki ve ark., 2011) (Şekil 2.2).

Ang II'nin vasküler kasılma yanıtına VSMC'deki Anjiyotensin 1 reseptörü (AT1R) aracılık etmektedir. Ang II, serbest oksijen radikallerinin üretilmesi ve siklooksijenaz

(COX)-1'e bağlı kasıcı prostanoidlerinin oluşumunu artırması yoluyla vazokonstriksiyonu öne çıkarmaktadır (Jerez ve ark., 2008; Lu ve ark., 2008). Ang II, endotelde bulunan anjiyotensin reseptörlerine bağlanarak da etki oluşturmaktadır (Stennett ve ark., 2009). Anjiyotensin 2 reseptörünün (AT2R) AT1'in etkilerine karşı denge oluşturmak üzere fizyolojik etkileri olduğu düşünülmektedir (Ketonen, 2010).



Şekil 2.2. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE)/ACE-2 etkisi ve biyoaktif anjiyotensin peptidlerinin sentezi

Endotelin-1

21-amino asit peptidinden oluşan endotelin-1 (ET-1), kardiyovasküler sistemde 3 endotelin izoformu içerisinde vazoaktif etkisi en belirgin olan endotelin formudur. ET-1'in farmakolojik etkileri ETA ve ETB reseptörleri ile meydana gelmektedir. Damarlarda ET-1, doğrudan VSMC'deki ETA reseptörünü uyarmaktadır. Ayrıca dolaylı olarak TXA₂'nin endotel bağımlı üretimini aktive edip vazokonstriksiyona neden olmaktadır (Itoh ve ark., 1988; Bohm ve Pernow, 2007).

ET-1in reseptöre bağlanması fosfolipaz C'yi aktive etmektedir. Fosfolipaz C fosfotidil inozitol bifosfatı hidrolize edip inozitol trifosfat (IP₃) ve diaçilgliserol (DG) meydana getirmektedir. Bu olay intraselüler Ca²⁺ (kalsiyum iyonu) konsantrasyonunda artış

meydana getirir. L tipi Ca^{2+} kanalları da açılarak içeri Ca^{2+} girişi hızlanıp vazokonstriksiyon meydana gelmektedir (Ortega Mateo ve de Artinano, 1997; Kawanabe ve Nauli, 2005). ET-1 ayrıca endotel türevi ETB reseptörlerini de uyarabilmektedir. Bu uyarılma sonucu NO ve PGI_2 oluşup vazodilatasyon meydana gelmektedir. Bu nedenle ETA ve ETB reseptörleri arasındaki denge ET-1'in kardiyovasküler sistemdeki etkisini belirlemede düzenleyici bir rol oynamaktadır (Ketonen, 2010).

Hipertansiyon ve ateroskleroza olan hastalarda ET reseptör stimülasyonuna karşı artan vasküler duyarlılık mevcuttur. ET-1, serbest oksijen radikallerinin üretimini artırarak ve proinflamatuvar ve proatherosklerotik olayların aktivitesini ve / veya ekspresyonunu artırarak endotel fonksiyon bozukluğuna ve oksidatif strese neden olmaktadır (Bohm ve Pernow, 2007; Mundy ve ark., 2007).

Siklooksijenaz Türevi Kasıcı Faktörler

Araşidonik asidin COX ile metabolizması sonucu oluşan prostaglandin H_2 ve TxA_2 ve $PGF_{2\alpha}$ potent vazokonstriktör ajanlardır. Endotel hücrelerinde COX-1 yapısal olarak bulunmaktayken, COX-2 indüklenebilir formu ile bulunmaktadır. Bu iki izoform arasındaki en önemli fark, COX-1 ile karşılaştırıldığında, COX-2'nin aktivasyon için daha düşük bir eşik değerine ve prostanoitleri sentezlemek için daha yüksek bir kapasiteye sahip olmasıdır (Ketonen, 2010).

2.2.2. Ex-vivo Kasıcı Yanıtlar

Adrenerjik Agonistler

Noradrenalin (NA) ve fenilefrin (FE), izole kan damarlarında endotel bağımlı ve bağımsız gevşeme yanıtları çalışmalarında ön gerim uygulamak için en yaygın kullanılan maddelerdir (Faraci ve Sigmund, 1999). Bu ajanlar α -1 adreno reseptöre bağlanarak bazı vasküler yataklarda konsantrasyona bağlı olarak kasıcı yanıt meydana getirmektedir. NA ayrıca α -2 adreno reseptöre de bağlanıp vazodilatasyonu indükleyebilmektedir. α -1-agonist aracılı vazokonstriksiyon için ana mekanizma, Ca^{2+} 'un sarkoplazmik retikulumdan salınmasını ve ardından klorür kanallarının aktivasyonu ile depolarizasyonu içermektedir. Bu sonuç Ca^{2+} 'nın VSMC membranında

bulunan voltaj kapılı L-tipi Ca^{2+} kanallarından içeri girişini artırmaktadır. Ca^{2+} deki genel artış sonrasında kasılma yanıtı meydana gelmektedir (van Breemen ve ark., 1986; Karaki, 1987; Mironneau ve Macrez-Lepretre, 1995).

Potasyum Klorür

Yüksek konsantrasyonlarda potasyum klorür (KCl), membran depolarizasyonu yaparak, sinir uçlarından NA salıverilmesini artırarak, Na^+/K^+ ATPaz'ı (sodyum/potasyum ATPaz) inhibe ederek vazokonstriksiyon yapmaktadır. Agonist kaynaklı kontraktıl yanıtlar çoğunlukla KCl tarafından indüklenen kontraksiyon ile karşılaştırılmaktadır. Bununla birlikte, düşük konsantrasyonlarda KCl (5-25mM), hiperpolarizasyonu indükleyebilir ve böylece küçük rezistan arterlerde vazodilatasyona neden olabilmektedir (Edwards ve ark., 1998).

2.2.3. Endotel Türevi Vazodilatör Faktörler

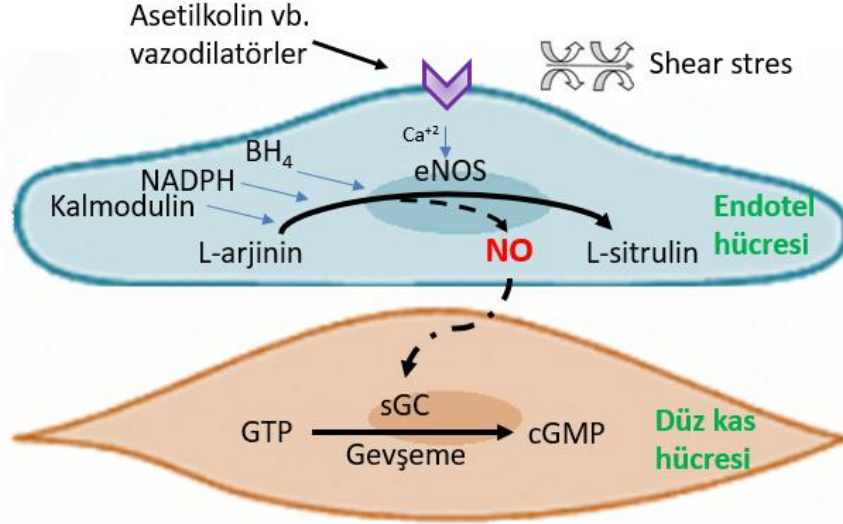
Nitrik Oksit (NO)

Endotel kaynaklı NO, kardiyovasküler homeostazın kritik bir düzenleyicisidir. Vasküler tonüsün korunmasındaki önemli rolüne ek olarak, NO hem merkezi hem de periferik sinir sistemlerinde nörotransmitter işlevi üzerinde önemli etkilere sahiptir ve hücrel savunma sistemine katılmaktadır. Ayrıca, NO antiinflamatuvar, antiapoptotik, antiplatelet ve antiproliferatif özelliklere dayanan ana bir antiaterosklerotik molekül olarak kabul edilmektedir. Endotelial NO oluşumunun azalması bir çok kardiyovasküler hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır (Fleming ve Busse, 1999; Moncada ve Higgs, 2006).

Endotel kaynaklı gevşetici faktör olarak da bilinen NO, eşleşmemiş bir elektron taşıyan yüksüz bir moleküldür. Bu yüzden etki bölgesine serbestçe difüze olabilir ve depolanamaz. Yarı ömrü ise 3-5 saniyedir (Michel ve Feron, 1997).

Nitrik oksit enzimatik olarak vücudumuzda bulunan L-arjinin amino asidinden sentezlenmektedir (Knowles ve Moncada, 1994). L-arjinin'den L-sitrulin oluşurken bu reaksiyondan NO açığa çıkar ve bu reaksiyonu katalizleyen enzim nitrik oksit sentaz (NOS)'dır. Bu reaksiyon sırasında moleküler oksijen ile kofaktör olarak flavin adenin

dinükleotit, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), flavin mononükleotit, tetrahidrobiyopterin (BH₄) ve hem kullanılmaktadır (Şekil 2.3) (Knowles, 1997).



Şekil 2.3. NO sentezi ve vasküler düz kas hüresinin gevşemesi

NOS bir enzim grubu olup üç izoformu bulunmaktadır. Bunlar: nöronal NOS (nNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) ve endotelial NOS (eNOS)'tur (Ketonen, 2010). eNOS ve nNOS yapısal NOS olarak kabul edilmektedir. Yapısal NOS'un aktivitesi için Ca²⁺/kalmodülin kompleksinin oluşması gerekmektedir. Buna karşın iNOS bundan bağımsızdır (Forstermann ve ark., 1991).

NO salınması ile vasküler tonüsün düzenlenmesi ayarlanmaktadır. NO salınmasını artıran uyarıcılar: kan akımı (shear stress), bradikinin, ATP kalsiyum gen ilişkili peptid, asetilkolin, katekolamin, serotonin, histamin platelet aktive edici faktör thrombin ADP, Substance-P'dir (Crabos ve ark., 1997; Cannon, 1998; Sessa, 2005).

Endotelden salınan NO, difüzyon ile düz kas hücrelerine geçip çözünür guanilat siklazı (sGC) aktif hale getirmektedir. Aktifleşmiş sGC, guanozin trifosfat'tan siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşturmaktadır. cGMP ise hücre içi kalsiyum miktarını düşürüp vazodilatasyona sebep olmaktadır (Şekil 2.3) (Michel ve Feron, 1997).

Prostasiklin

Non steroidan antiinflamatuvar ilaçların kardiyovasküler sistem üzerindeki potansiyel yan etkiler ortaya çıkarmasından bu yana prostaglandinlere olan ilgi büyük oranda artmıştır. Kan akışına bağlı mekanik kuvvetlere ve dolaşımdaki hormonlara cevap olarak, PGI₂, enzimatik olarak COX-1 tarafından endotel hücrelerinden oluşmaktadır (Dusting ve ark., 1977; Weksler ve ark., 1977). PGI₂, hücre yüzeyindeki IP reseptörü için baskın bir agonisttir (Weksler ve ark., 1977). VSMC ve trombositlerdeki IP reseptörlerinin uyarılması, yüksek siklik adenozin mono fosfat konsantrasyonları üreten adenilat siklaz aktivasyonuna yol açmaktadır (Schwarz ve ark., 2001; Mitchell ve ark., 2008). Bu olaylar, çoğu hedef hücrede Ca²⁺ konsantrasyonunun azalmasına sebep olan protein kinaz A'nın fosforilasyonuna sebep olmaktadır. Sonuç olarak, PGI₂ antiplatelet etki sağlayan, vazodilatasyonu uyarıcı, VSMC'nin remodellingini ve kolesterol alımında bir azalmaya sebep olan önemli bir mediatördür. PGI₂'nin bu özellikleri, kardiyoprotektif etkilere katkıda bulunmaktadır (Mitchell ve ark., 2008).

Bradikinin

Bradikinin, kinin ailesinin bir üyesidir ve doku hormonudur. Endotel hücrelerinde yerleşmiş olan Bradikinin-2 (BK2) reseptörleri ile birleşmesi sonucu gelişen bir dizi reaksiyonla NO sentezi yapılmaktadır. Bu şekilde indirekt vazodilatasyon yanıtına sebep olmaktadır. Ayrıca, BK2 reseptörleri aracılığı ile direkt düz kasta gevşeme meydana getirebilmektedir (Ferro ve Webb, 1997).

Endotel Bağımlı Hiperpolarizasyon

VSMC'nin endotel bağımlı hiperpolarizasyonu, hayvan ve insan çalışmalarında gösterildiği gibi vazodilatasyon için güçlü bir araçtır. Endotel bağımlı hiperpolarizasyonun, arterlerin çaplarındaki azalma ile belirginleştiği bilinmektedir (Ketonen, 2010). NOS ve COX'un eşzamanlı farmakolojik blokajından sonra ortaya çıkan vazodilatasyon, endotel bağımlı hiperpolarizasyon olarak adlandırılmaktadır (Feletou ve Vanhoutte, 2007). Endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörü, VSMC'nin plazma membranının hiperpolarizasyonu yoluyla vazodilatasyona yol açan endotelden üretilen ve salgılanan biyolojik olarak aktif herhangi bir bileşiği ifade etmektedir.

VSMC'de birkaç potasyum kanal tipinin aktivasyonu, ağırlıklı olarak endotel bağımlı hiperpolarizasyona aracılık etmektedir. Bu kanallar: kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalı (KCa), ATP'ye duyarlı potasyum kanalı (KATP), içe yönelik doğrultucu potasyum kanalı (Kir) ve voltaj bağımlı potasyum kanalı (KV)'dır (Ko ve ark., 2008). KCa'nın üç alt tipi bulunmaktadır. Endotelyal orta kondüktanslı kalsiyum kanalı (IKCa) ve küçük kondüktanslı kalsiyum kanalı (SKCa) aktivasyonu, nitrik oksit (NO) oluşumuna katkıda bulunur ve endotel bağımlı hiperpolarizasyonları ortaya çıkarmak için gereklidir. Buna ek olarak sitokrom P450 türevi epoksieikazotrienoik asit, prostasiklin, hidrojen peroksit ve bazı durumlarda da NO, BKCa'yı aktive ederek VSMC'de hiperpolarizasyon ve vazodilatasyon meydana getirmektedir. BKCa'nın aksine, IKCa ve SKCa endotelde eksprese edilmektedir (Feletou, 2009).

2.2.4. *Ex-vivo* Gevşetici Yanıtlar

Endotel Bağımlı Gevşeme Yanıtları

Asetilkolin, sağlam bir endotel tabakasında muskarinik (M) reseptörlerinin uyarılmasına bağlı olarak endotel bağımlı vazodilatasyon sağlayan klasik bileşiktir. Asetilkolinin M3 reseptörüne bağlanması endotel bağımlı NO'in ve PGI₂'nin serbestleşmesini ve VSMC'de K⁺ kanallarının açılmasını sağlayarak vazodilatasyona katkı sağlamaktadır (Walch ve ark., 2001; Beny ve ark., 2008). Bununla birlikte, asetilkolinin VSMC'de bulunan M3 reseptörleri üzerindeki direk etkisi sebebiyle endotelden bağımsız kasılmalara neden olabilmektedir (Kirkpatrick ve ark., 2001).

Endotelden Bağımsız Gevşeme Yanıtları

Nitratlar, akut miyokard enfarktüsü ve kronik konjestif kalp yetmezliği olan hastalarda semptomların tedavisinde yaygın olarak kullanılan, antiiskemik ve antianjinal ajanlardır (Abrams 1996). Sodyum nitroprussid (SNP), S-nitroso-N-asetilpenisillamin, veya 3-morfolino-donnonimin içeren nitrovasodilatörler, endotelden bağımsız vazodilatasyon elde etmek ve VSMC'nin organ banyosu çalışmalarında bütünlüğünü doğrulamak için kullanılmaktadır. Genel olarak, eksojen nitrat uygulamasının, eNOS tarafından üretilen NO ile aynı sinyal yolunda etki ettiği düşünülmektedir. Sonuç olarak, bu bileşikler vasküler duvarla etkileşimleri sırasında metabolize olurlar ve sGC'ı hem NO bağımlı hem de bağımsız yollar ile aktive ederler (Ketonen, 2010).

2.3. Klasik İzole Organ Banyosu Deneyleri

Farmakoloji, ilaç keşfi sürecinin önemli basamaklarından biridir. Farmakolog sentezlenen, izole edilen bir bileşiği fizyolojik aktivite için test eden bilim insanıdır. Farmakoloji, ilaçların etkilerini ve bu etkilerini nasıl ortaya çıkardıklarını inceleyen bilim dalıdır (Scheindlin, 2001).

İzole organ banyoları farmakoloji deneylerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yüzden farmakolojinin tarihi geçmişi de önem taşımaktadır. Oswald Schmiedeberg (1838-1921), genel olarak modern farmakolojinin kurucusu olarak bilinmektedir. Schmiedeberg, 1866'da tıp doktorasını kandaki kloroform ölçümü üzerine bir tezle almış ve 1872'de Strassburg Üniversitesi'nde farmakoloji profesörü olmuştur. Kloroform ve kloralhidrat farmakolojisi üzerinde çalışmıştır. 1869'da Schmiedeberg muskarinin kalp üzerindeki etkisini vagusun elektriksel stimülasyonu yoluyla gerçekleştiğini göstermiştir. 1878'de, Farmakolojinin Anahatları adlı kitabını yayınlamıştır ve 1885'te üretanı hipnotik olarak tanıtmıştır. Schmiedeberg, diğer Alman üniversitelerinde ve birçok yabancı ülkede profesör olanların çoğunu eğitmiştir. II. Dünya Savaşı'na kadar Alman ilaç endüstrisinin öncülüğünden büyük ölçüde kendisinin sorumlu olduğu bildirilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, ilk farmakoloji kürsüsü 1890'da Michigan Üniversitesi'nde, Schmiedeberg altında eğitim görmüş bir Amerikalı olan John Jacob Abel tarafından kurulmuştur. Abel 1893'te uzun ve başarılı bir kariyere sahip olduğu Baltimore'daki Johns Hopkins Üniversitesi'ne gitmiştir. Başlıca başarıları arasında adrenal bezi ekstraktlarından (1897-1898) epinefrin izolasyonu, hipofiz ekstraktından (1919) histamin izolasyonu ve saf kristalli insülinin (1926) hazırlanması yer almaktadır. Onun öğrencisi Reid Hunt, 1906'da adrenal bezinden elde edilen ekstraktlardan asetilkolini keşfetmiştir (Scheindlin, 2001).

Farmakoloji büyük ölçüde laboratuvar hayvanlarında yapılan deneylere dayanmaktadır. Fareler küçük boyutlarından, üreme kolaylıklarından ve kısa üretme sürelerinden dolayı tercih edilmektedir. Sağlam hayvanlar, yeni bir ilaç maddesinin geçirmesi gereken akut, subakut ve kronik toksisite testleri için kullanılmaktadır. Bu testler teratoloji ve kanserojenite gibi önemli parametreler için gereklidir. Farmakoloji, eksize edilmiş (izole edilmiş) organları veya dokuları ve cerrahi olarak hazırlanan ve hedef aktivitelerin

saptanmasına ve incelenmesine yardımcı olmak için çeşitli şekillerde hazırlanmış hayvanları kullanma eğilimindedir(Scheindlin, 2001).

Farmakolojik tekniklerin gelişiminin başlarında, izole edilmiş bir organ veya dokunun, oksijen bulunan ve fizyolojik bir tuz çözeltisi içeren banyoda birkaç saat boyunca işlevsel kalabildiği bulunmuştur. Henrick Magnus (1802-1870) bu yöntemi ilk olarak ince bağırsak şeritlerinde, Jean-François Heymans (1904), memeli kalbinde ve Claude Bernard ise izole edilmiş sinir kas preparatlarında denemiştir. Bu tekniğin gücü: sadeliği ve çok yönlülüğüdür (Scheindlin, 2001). Bu yöntemle, bir antagonistin varlığında veya yokluğunda artan agonist konsantrasyonlarına bağlı olarak meydana gelen yanıtların kaydedilmesi sağlanmaktadır. Bu sayede her bir ilacın ve bağlandığı reseptörün farmakolojik özellikleri hakkında çok sayıda bilgi elde edilebilmesine imkan sağlanmaktadır.

Farmakolojide kullanılan çok yönlü ve kolay erişilebilir izole doku tiplerinden biri izole edilen kan damarıdır. Arterler ve venler, kasılmaya (serotonin, α -adrenerjik), gevşemeye (β -adrenerjik) ve endotel fonksiyonlarına (asetilkolin) aracılık eden geniş bir reseptör çeşitliliğini içermektedir. Kan damarları adventisy tabakası, düz kas hücreleri ve endotelden oluşmaktadır. Mekanik kasılma ve gevşeme düz kas tarafından kontrol edilirken, mediatörler endotel hücrelerinden salınmaktadır (Kenakin, 2001).

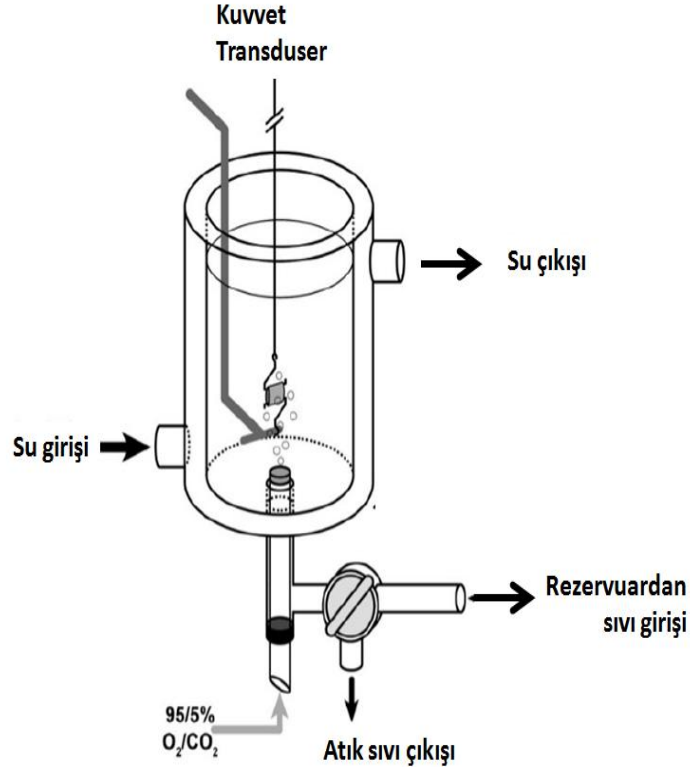
Kan damarları, kan basıncının ve kan akış dağılımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu düzenleyici işlemlerin sağlıklı veya patolojik durumlardaki mekanizmalarını anlayabilmek için, damarların *in-vivo* davranışları ve birbirleriyle etkileşimleri bilinmelidir. Bununla birlikte *in-vivo* koşullar altında damarlar arasında komplike bir etkileşim bulunmaktadır. Buna sebep olan etkileşimler: nörotransmitterler, çevre dokulardan veya kan yoluyla gelen hormonlar, endotel, damarların proksimal ve distal yüzeyleri arasındaki davranışsal değişiklik, shear stres gibi mekanik faktörler sayılabilir. Bu sistemin karmaşıklığı, deneysel bulguların mekanik terimlerle yorumlanma olasılığını büyük ölçüde sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, karmaşık faktörlerin çoğunun kontrol edilebildiği, *in-vitro* yöntemler tanımlanmıştır (Schubert, 2005).

İlk deneyler, büyük kan damarlarının kullanıldığı çalışmalardır. Bununla birlikte, son zamanlardaki teknik gelişmeler, çeşitli damar yataklarından küçük arterler, arteriyoller ve küçük damarlar üzerinde deneylerin yapılmasına da izin vermektedir. Uygulamada, yaklaşık 20 µm ila birkaç milimetre arasında değişen çapa sahip ve yaklaşık 0.1 ila 10 mm uzunluğundaki damar segmentleri kullanılmaktadır. Bu damar segmentleri, tunika intimadaki endotel hücrelerini, tunika mediadaki düz kas hücrelerini ve , tunika adventisyadaki sinir uçları, yağ hücreleri fibroblastlar vb. içermektedir (Schubert, 2005).

Geçmişte spiral şerit şeklinde hazırlanan preparatlar kullanılmıştır. Bu prosedür göreceli olarak çok sayıda hasarlı düz kas ve endotel hücresi ile sonuçlandığından ve normal vasküler yapının bozulmasına neden olduğundan, artık silindirik damar segmentlerinin kullanımı tercih edilmektedir.

2.3.1. İzole Damar Halka Parçaları

Bu metod klasik ve eski bir yaklaşımdır. Damar halkasından gerilim yanıtları alabilmek için damardan elde edilen halka lümenin iki karşıt tarafına kanca geçirilmektedir. Kancanın bir tanesi organ banyosuna bir diğeri ise izometrik dönüştürücüye sabitlenerek ölçüm alınmaktadır (Şekil 2.4) (Kenakin, 2001).



Şekil 2.4. Halka şeklinde kesilmiş damar preparatlarının organ banyosuna yerleştirilmesi(Jespersen ve ark., 2015).

Kancaların veya tellerin çapları, aşırı gerilmeden dolayı damara zarar verebileceği düşüncesiyle damarın çapına göre ayarlanmalıdır. Bu sistemde yaklaşık olarak 14 μm çapındaki küçük tellerin kullanıldığı bildirilmiştir (Bukoski ve ark., 2001). Buna ek olarak, eğer tungsten teli kullanılacaksa, eskiyen tungsten telinin kendiliğinden yüzey oksidasyonuna uğrayabileceği ve bunun da damar gevşeme ve kasılma yanıtları üzerinde hatalara sebep olacağı bildirilmektedir. Böylece, izole organ banyosu deneylerinde altın veya tungsten içermeyen paslanmaz çelik tel kullanılması gerekmektedir (Bukoski ve ark., 2001).

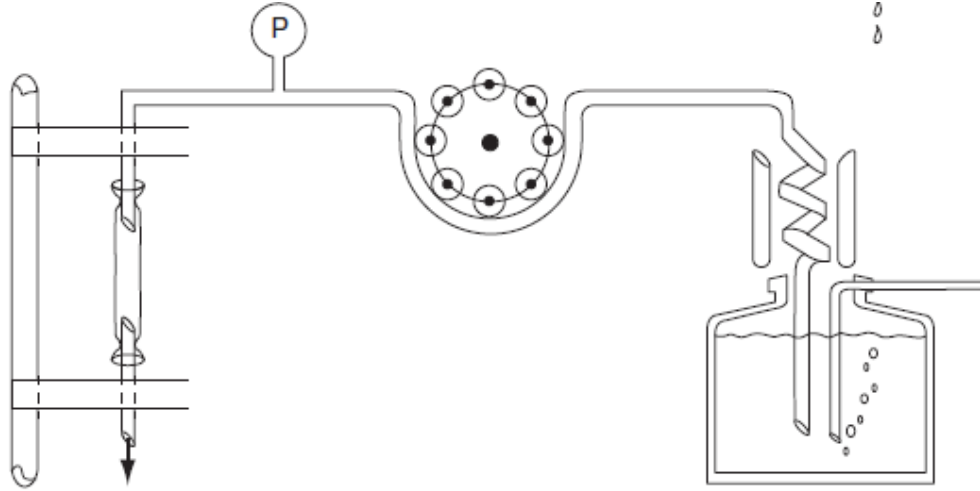
Halka damar parçaları ile deneyin başlangıcında, *in-vivo* fizyolojik koşulları taklit edebilmek için damarların bazal gerilim (preload) ayarlanmalıdır. Bu prosedürün önemli olduğu bildirilmiştir. Çünkü çoğu damar cevabının başlangıçtaki gerilme miktarına bağlı olarak değiştiği vurgulanmaktadır. Bu sebeple damarın nöradrenaline duyarlılığı başlangıç gerimi ile arttığı belirtilmektedir (Price ve ark., 1981; Nilsson ve Sjoblom, 1985). Ayrıca, asetilkolin ile indüklenmiş membran potansiyeli hiperpolarizasyonun,

önceden gerim uygulanmamış preparatlara oranla gerim uygulanmış preparatlarda daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu farkın, önceden gerim uygulanmış preparattaki ilave mekanizmaların (NO, PGI₂ gibi) vazodilatasyona katkı sağlayarak oluştuğu bildirilmiştir (Nilsson ve Sjoblom, 1985). Damar segmentine bazal gerilim uygulayabilmek için, damar ikinci bir kanca veya tel bir mikrometreye bağlanmaktadır. Böylece, kancalar veya teller arasındaki mesafe, yani damarın çevresi artırılabilir. Başlangıç gerimini ayarlama prosedürü "normalizasyon" olarak adlandırılmaktadır. Damarın *in-vivo* basıncına karşılık gelen bir başlangıç gerimi seçilmektedir (Schubert, 2005).

Normalleştirme prosedüründen sonra, dokunun çalışıp çalışmadığı kontrol edilmektedir. Genellikle bu, bazen yüksek konsantrasyonlarda (120 mM) bir potasyum çözeltisi ilavesiyle birlikte yüksek konsantrasyonda bir agonistin 2-3 kez uygulamasını içermektedir. Bu prosedür, damar izolasyonu ve damarın organ banyosuna yerleştirilmesi işlemlerinden sonra stabil kasılma damar yanıtlarını gözlemleyebilmek için gereklidir. Başta bir kez yüksek konsantrasyonda uygulanan agonist, dokunun çalışabilir olduğu hakkında kabaca bir bilgi vermektedir. Buna ek olarak, doyma konsantrasyonundan yaklaşık 100 kat daha küçük bir agonist konsantrasyonu ile test edilmektedir. Bu kasılmaların üzerine asetilkolin gibi endoteli aktive edebilen bir agonist endotelin canlılığını test etmek için organ banyosuna eklenebilmektedir. Damar yanıtları, yani düz kas hücrelerinin aktivasyon seviyeleri, kuvvetteki değişiklikler olarak temsil edilmektedir (Schubert, 2005).

2.3.2. Kanüle Edilmiş Perfüze Sistemlerin Kullanıldığı İzole Damar Parçaları

Son derece dar lümenli damarlar için, fizyolojik bir tuz çözeltisi sabit bir akış hızında perfüze edilip, basınç düz kas tonüsü ölçüsü olarak izlenebilmektedir. Perfüze edilmiş bir damarın yanıtı, genellikle milimetre civa cinsinden perfüzyon basıncındaki bir değişiklik olarak ölçülmektedir. Belirli bir uzunluktaki damar bir tutucu üzerine kanüle edilir ve organ banyosuna yerleştirilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Bir perfüzyon sisteminin şematik diyagramı (Kenakin, 2001).

Perfüzyon sıvısının ya dokuyu perfüze eden sıvıya yayılmasına izin verilebilir ya da ayrı bir kanül yoluyla sistemden dışarı atılarak banyo sıvısından ayrı tutulabilir. Bu durum gerekli ise, Evans mavisi gibi bir boyayı lümen içinden perfüze ederek ve banyo ortamını kolorimetrik olarak test ederek küçük arteriollerden sızıntı olup olmadığının kontrol edilmesi gerekmektedir (Kenakin, 2001).

2.4. Vasküler Düz Kasta Kasılma Mekanizmaları

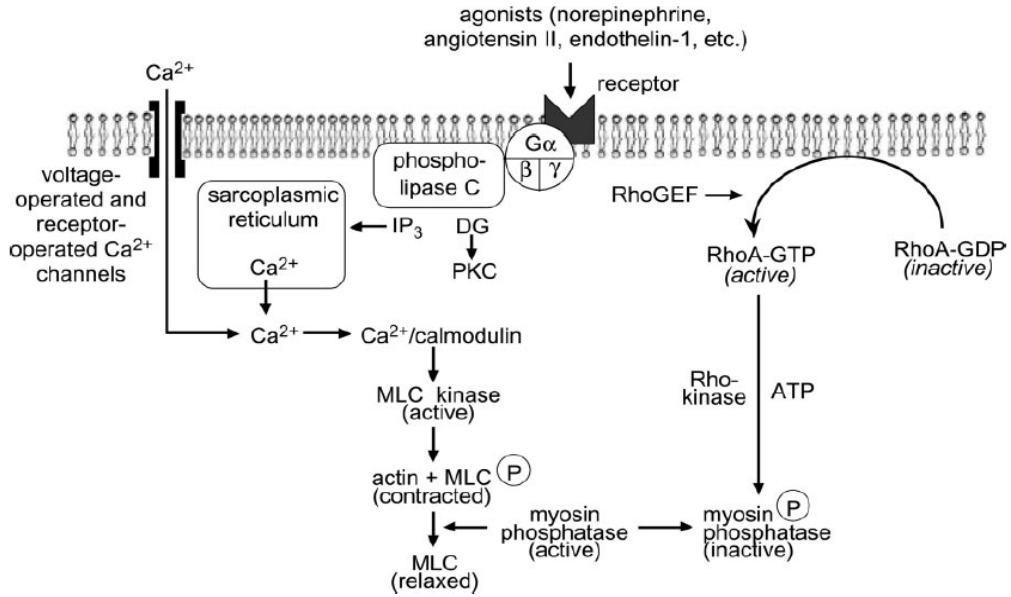
Düz kas hücresinde kasılma işlemi, reseptörler ve aktin-miyozin gibi kontraktıl proteinlerin aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Aksiyon potansiyelinin başlamasıyla veya membrandaki gerilime bağlı iyon kanallarının aktivasyonu ile oluşan membran potansiyelindeki bir değişiklik de kontraksiyonu tetiklemektedir. Kasılmanın gerçekleşebilmesi için miyozin hafif zincir kinazın (MLC kinaz) ATP yardımıyla 20-kDa'lık miozin hafif zincirini fosforillemesi gerekmektedir. Bazı düz kas hücrelerinde, miyozinin hafif zincirinin fosforilasyonu, dış uyaranların yokluğunda (yani reseptör ya da mekanik aktivasyon yok) düşük bir seviyede tutulmaktadır. Bu aktivite düz kas tonüsü olarak bilinmekte ve yoğunluğu dokulara göre değişebilmektedir (Webb, 2003).

2.4.1. Düz Kasta Ca^{2+} Bağımlı Kasılma

Düz kastaki spesifik uyaranlara cevap olarak, Ca^{2+} 'nin hücre içi konsantrasyonu artmakta ve bu aktivatör Ca^{2+} asidik bir protein olan kalmodulin ile birleşmektedir. Bu kompleks, miyozinin hafif zincirini fosforile etmek için MLC kinazı aktive etmektedir.

Sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonu, hücre içi depolardan (sarkoplazmik retikulum) Ca^{2+} salınmasıyla ve ekstraselüler alandan Ca^{2+} kanallarından içeri Ca^{2+} girişi ile daha da artmaktadır. Heterotrimerik bir G proteini kenetli reseptöre bağlanan agonistler (norepinefrin, anjiyotensin II, endotelin vb.) fosfolipaz C aktivitesini uyarmakta ve bu enzim fosfotidil inozitol 4,5 bisfosfat'ı katalize edip iki potent ikincil haberci meydana getirmektedir: IP_3 ve DG (Webb, 2003).

IP_3 'ün sarkoplazmik retikulum üzerindeki reseptörlere bağlanması, Ca^{2+} 'nin sitozole salınması ile sonuçlanmaktadır. DG, Ca^{2+} ile birlikte, spesifik hedef proteinleri fosforile eden protein kinaz C'yi aktive etmektedir (Webb, 2003). Buna ek olarak, depo aracılı kanal (store operated channel; SOC), voltaj bağımlı kanal (voltage operated channel), reseptör bağımlı kanal (receptor operated channel ROC), transient reseptör katyon kanalı (TRP) ve Ca^{2+} geçirgen non selektif katyon kanalı gibi birçok kalsium kanalı aktive edilip, Ca^{2+} 'un hücre içine girişini artırmaktadır. Ca^{2+} kalmodülin ile bağlanarak Ca^{2+} -kalmodülin kompleksi meydana gelmektedir. Bu kompleks MLC kinazda konformasyonel değişiklikleri indükler, onu inaktif formdan aktif forma dönüştürür. Aktive olan MLC kinaz miyozin hafif zincirini fosforiller ve miyozin aktin etkileşimi ile kasılma uyarılmış olur (Şekil 2.6) (Touyz ve ark., 2018).



Şekil 2.6. Düz kasta kasılmanın düzenlenmesi (Webb, 2003).

2.4.2. Ca²⁺ Duyarlılaştırıcı Mekanizma ve Düz Kas Kasılması

MLC kinazın Ca²⁺ bağımlı aktivitesine ek olarak miyozin hafif zincirin fosforilasyon durumu ayrıca MLC fosfataz ile regüle edilmektedir. MLC fosfataz düz kas gevşemesini desteklemek için yüksek enerjili fosfatını miyosin hafif zincirinden uzaklaştırmakla görevlidir. MLC fosfatazın üç alt birimi vardır: 37 kDa katalitik bir alt birim, 20 kDa değişken bir alt birim ve bir 110-130 kDa miyozin bağlayıcı alt birim. Miyozin bağlayan alt birim fosforile olduğunda MLC fosfotazın enzimatik aktivitesini inhibe etmekte ve hafif zincir miyozinin fosforile kalmasını izin vermektedir. Bu sayede kontraksiyonu öne çıkarmaktadır (Webb, 2003).

Küçük G proteini RhoA ve onun downstream hedefi Rho kinaz, MLC fosfataz aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bir serin/treonin kinaz olan Rho kinaz, MLC fosfatazın miyosin bağlayıcı alt birimini fosforiller, aktivitesini inhibe eder ve böylece miyozin hafif zincirinin fosforile durumda kalmasını sağlar. Rho kinazın fasudil ve Y-27632 gibi farmakolojik inhibitörleri enzimin ATP bağlanma bölgesini kompetitif olarak inhibe ederler. Rho kinaz inhibisyonu, birçok farklı agonistle kasılmış izole düz kas segmentlerinin gevşemesini sağlar. Hayvanlarda Rho kinazın farmakolojik inhibitörlerinin, arterlerde düz kas gevşemesine neden olduğu ve kan basıncını düşürücü bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Uehata ve ark., 1997; Chitale ve ark., 2001).

Bununla birlikte, hücre içindeki Ca²⁺ konsantrasyonundaki yükselme geçicidir ve kontraktıl yanıt, miyozin fosfataz aktivitesinin Rho kinaz tarafından inhibe edilerek sağladığı bir Ca²⁺ duyarlılaştırıcı mekanizma ile korunmaktadır. Bu Ca²⁺-duyarlılaştırıcı mekanizma, eşzamanlı olarak fosfolipaz C'nin aktive edildiği zamanda başlatılır ve küçük GTP bağlayıcı protein RhoA'nın aktivasyonunu içermektedir.

RhoA'nın G protein-bağlı reseptör tarafından aktivasyonunun kesin sebebi tamamen açık değildir, ancak bir guanin nükleotid değişim faktörü (RhoGEF) ve RhoA'nın plazma zarına göçünü içerir. Aktivasyon üzerine RhoA, Rho kinaz aktivitesini artırarak miyozin fosfatazın inhibisyonuna yol açar. Bu, kasılma durumunu destekler, çünkü miyosinin hafif zinciri fosforillenemez. RhoGEF proteinlerinin artan ekspresyonu ve/veya aktivitesi, düz kasın kasılma aktivasyonunu arttırabilir ve bu nedenle bazı hastalıkların

(astım, hipertansiyon vb) patogeneğinde rol oynadığı düşünölmektedir (Şekil 2.6) (Webb, 2003).

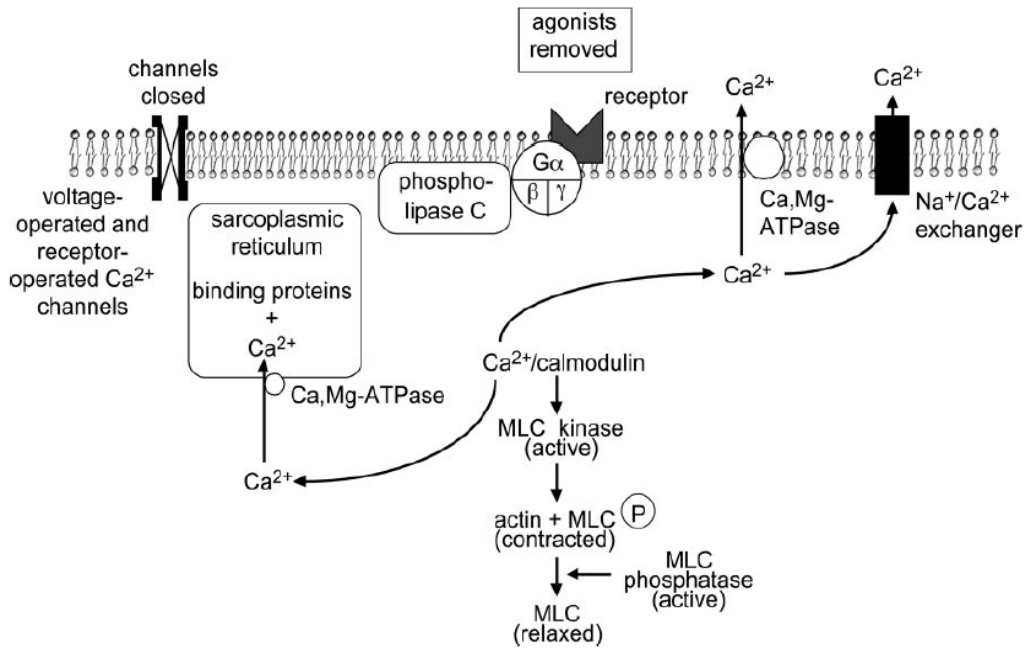
2.5. Vasköler Düz Kasta Gevşeme Mekanizmaları

Düz kas gevşemesi, ya kasılma uyarıcısının ortadan kabolması ya da kasılma mekanizmasının inhibisyonunu uyarıcı bir maddenin doğrudan etkisinin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Her ne olursa olsun, gevşeme süreci, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun düşmesini ve MLC fosfataz aktivitesinin artmasını gerektirmektedir (Morgan, 1990; Sah ve ark., 2000).

Düz kas gevşemesi, ya kasılma uyarıcısının ortadan kabolması ya da kasılma mekanizmasının inhibisyonunu uyarıcı bir maddenin doğrudan etkisinin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Her ne olursa olsun, gevşeme süreci, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun düşmesini ve MLC fosfataz aktivitesinin artmasını gerektirmektedir (Morgan, 1990; Sah ve ark., 2000). Hücre içi kalsiyumu sekestre eden veya ortadan kaldıran veya MLC fosfataz aktivitesini artıran mekanizmalar düz kas gevşemesine katkıda bulunmaktadır. Hücre içi aktivatör Ca^{2+} konsantrasyonunun azalması vasköler düz kas gevşemesini ortaya çıkarmaktadır. Sitolitik Ca^{2+} 'un uzaklaştırılmasında çeşitli mekanizmalar vardır ve bu olaya sarkoplazmik retikulum ve plazma membranı dahil olmaktadır. Sarkoplazmik retikulum içine Ca^{2+} alımı ATP hidrolizine bağlıdır. Sarkoplazmik retiköler Ca,Mg-ATPaz (Kalsiyum, Magnezum ATPaz), fosforile edildiğinde, daha sonra sarkoplazmik retikulumun luminal tarafına translokasyona uğrayan ve salıverilen iki Ca^{2+} iyonunu bağlar. Magnezyum, enzimin aktivitesi için gereklidir; reaksiyona aracılık etmek için ATPaz'ın katalitik bölgesine bağlanır. Sarkoplazmik retiköler Ca,Mg-ATPaz birkaç farklı farmakolojik ajan tarafından inhibe edilir: vanadat, thapsigargin ve siklopiazonik asit. Sarkoplazmik retiköler Ca^{2+} bağlayıcı proteinler de ayrıca hücre içi Ca^{2+} seviyelerinin azalmasına katkıda bulunur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar kalsekstrin ve kalretikulin'i düz kasta sarkoplazmik retiköler Ca^{2+} bağlayıcı proteinler olduğu tanımlamıştır. Plazma zarı ayrıca hücrede aktivatör Ca^{2+} konsantrasyonunu azaltmak için ek bir mekanizma sağlayan Ca,Mg-ATPaz içermektedir. Bu enzim, sarkoplazmik retiköler proteinden farklıdır. Çünkü bu

enzim plazma zarında Ca^{2+} pompasının stimülasyonuna neden olan kalmodulin tarafından bağlanabilen otoinhibitör domaine sahiptir (Webb, 2003).

Na/Ca^{2+} exchanger'ı da plazma membranında bulunup hücre içi Ca^{2+} 'nin azaltılmasına yardımcı olmaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi ROC ve VOC gibi kanallar kontraksiyonda görevlidir ve bu kanalların inhibe edilmesi vasküler düz kas gevşemesini ortaya çıkaracaktır. Dihidropiridin, fenilalkilamin ve benzotiyazepin gibi kanal antagonistleri, kanal proteini üzerinde farklı reseptörlere bağlanarak ve düz kasta Ca^{2+} girişini inhibe etmektedirler (Webb, 2003).



Şekil 2.7. Vasküler düz kasta vazodilatasyonun düzenlenmesi (Webb, 2003).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

İzole organ banyosu deneyleri için 96 kuyucuklu hücre kültürü plateleri kullanılmıştır. Deney hayvanları ünitesinden temin edilen sıçanlara üretan anestezi metodu uygulanmıştır. Sıçanların abdominal kaviteleri linea alba üzerinden yapılan insizyon ile açılmış olup abdominal aorta heparinize (1000unit/kg IV) yapıldıktan sonra çıkarılmıştır. 4°C'de 95% O₂ ve 5% CO₂ ile gazlanmış Krebs solüsyonu içeren petri kabına çıkarılan aort alınmıştır. Yaklaşık 1-2 mm kalınlığında aort halkaları kesilmiştir ve platelerdeki kuyucuklar krebs solüsyonuyla doldurulup, dokular bu solüsyonun içine lümeni yukarı bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Doku krebs solüsyonu ile her 15 dakika bir yıkanarak 60 dakika dinlendirilmiştir.

Platein alt tarafı görüntüyü engellemeyecek şekilde iletken tel ile döşenmiştir ve bu sayede plate kuyucukları içerisindeki sıvının sıcaklığının 37 °C'de tutulması sağlanmıştır.

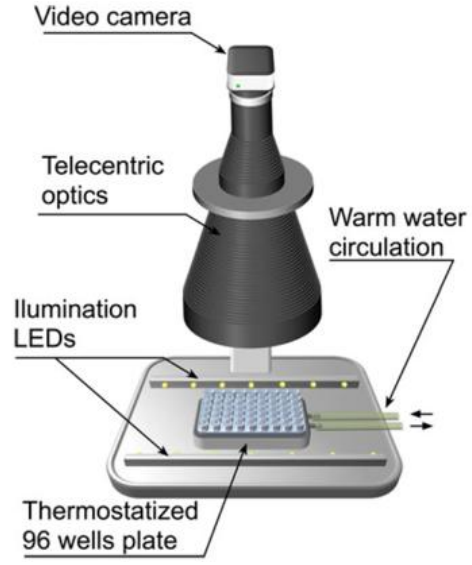
Görüntüde distorsiyon olmaması için kameranın plate'e uzaklığı aynalar sayesinde artırılmıştır. Oluşturulan sistemde karışım gazı uygulanmış ve uygulanmamış doku üzerinde çalışılmıştır. Aynı çalışmalar benzer şekilde organ banyosunda da çalışılıp, elde edilen veriler hem kendi aralarında hem de organ banyosu sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Deneyin ilk aşamasında her iki grup üzerinde FE ($10^{-11} - 10^{-6}$ M) ile kümülatif ve tek doz KCI (30mM) ile kasılma yanıtları incelenmiş ve bu amaçla abdominal aorta halkalarında konsantrasyon yanıt eğrileri elde edilmiştir.

Deneyin ikinci aşamasında her iki grupta endotel bağımlı gevşemeler incelenmiştir. Submaksimal konsantrasyonda fenilefrin ile ön kasılma oluşturulan abdominal aorta halkalarında asetilkolin ($10^{-11} - 10^{-6}$ M) ve endotel-bağımsız gevşeme oluşturan SNP'ye ($10^{-11} - 10^{-6}$ M) konsantrasyon-yanıt eğrileri oluşturulmuştur.

Sıçanların her birinden alınan abdominal aortalardan mümkün olduğu kadar fazla halka elde edecek şekilde hesaplamalar yapılp gereken sıçan sayısı elde edilmiştir. Veriler ortalama \pm SS olarak verilmiştir.

4. BULGULAR



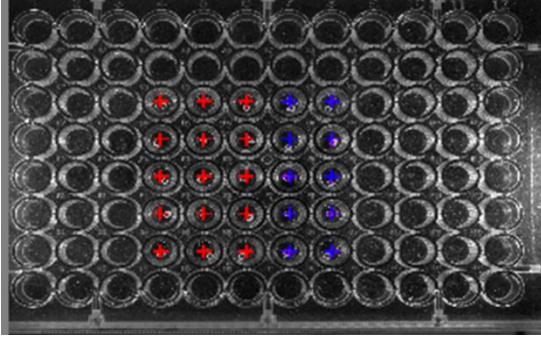
Şekil 4.1a. Multi-well organ bath (MuWOB) sistemi (Borges ve ark., 2016)



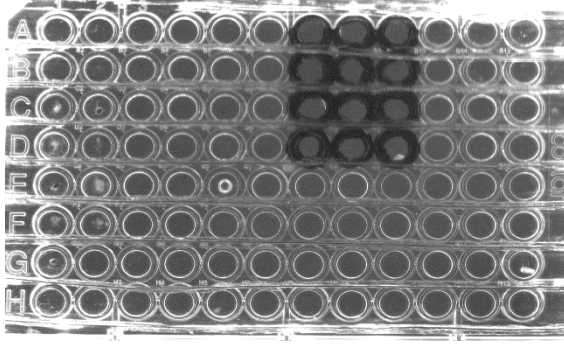
Şekil 4.1b. Modifiye MuWOB sistemi

Şekil 4.1a ve Şekil 4.1b: Multi-well organ bath (MuWOB) ile modifiye MuWOB görüntüleme sisteminin detayları

Şekil 4.1a'da MuWOB sisteminin telesentrik lens sistemi ile Şekil 4.1b'de modifiye MuWOB sisteminde yer alan telemetrik lens ve ayna sistemi görülmektedir. İki sistem arasında bu farklılık görüntülemenin üstten veya hücre kültür platelerinin altından yapılmasına neden olmaktadır. Telementrik sistem yakından görüntünün özellikle dış kısımlarının deforme olmadan görüntü sağlayan bir sistemdir ve de maliyeti yüksektir. Telesentrik lens ve ayna sistemi ise göreceli olarak daha ucuzdur.

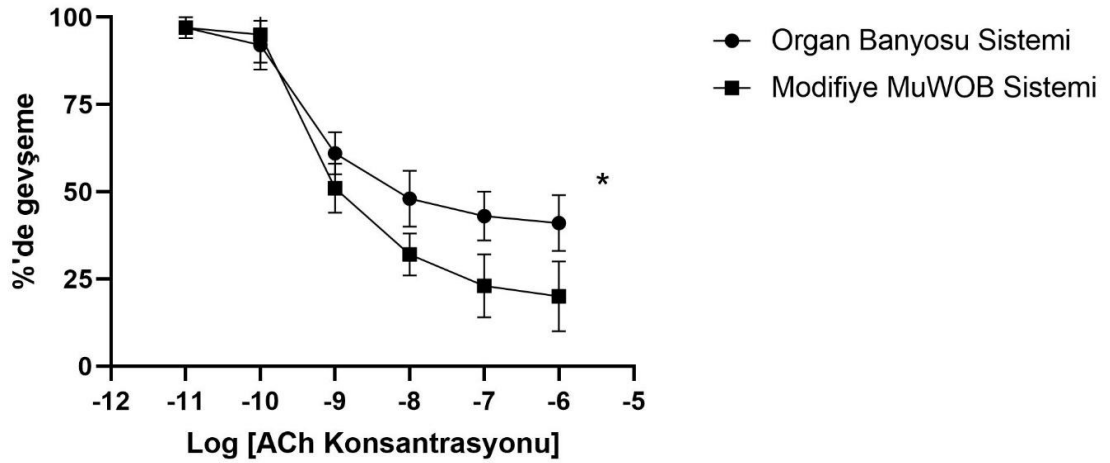


Şekil 4.2a. MuWOB sisteminden görüntü (Borges ve ark., 2016)

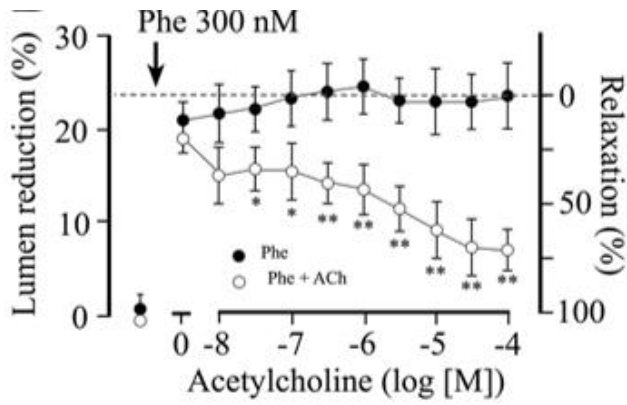


Şekil 4.2b. Modifiye MuWOB sisteminden görüntü

Şekil 4.2a ve Şekil 4.2b: MuWOB ve modifiye MuWOB sistemlerinde görüntünün bozulma dereceleri. MuWOB ve modifiye MuWOB sisteminde kameradan elde edilen görüntüler karşılaştırıldığında, ilkinde özellikle plate'in dışlarına doğru, görüntüde bozulmalar görünürken, ikincide neredeyse hiç bozulma görünmemektedir.

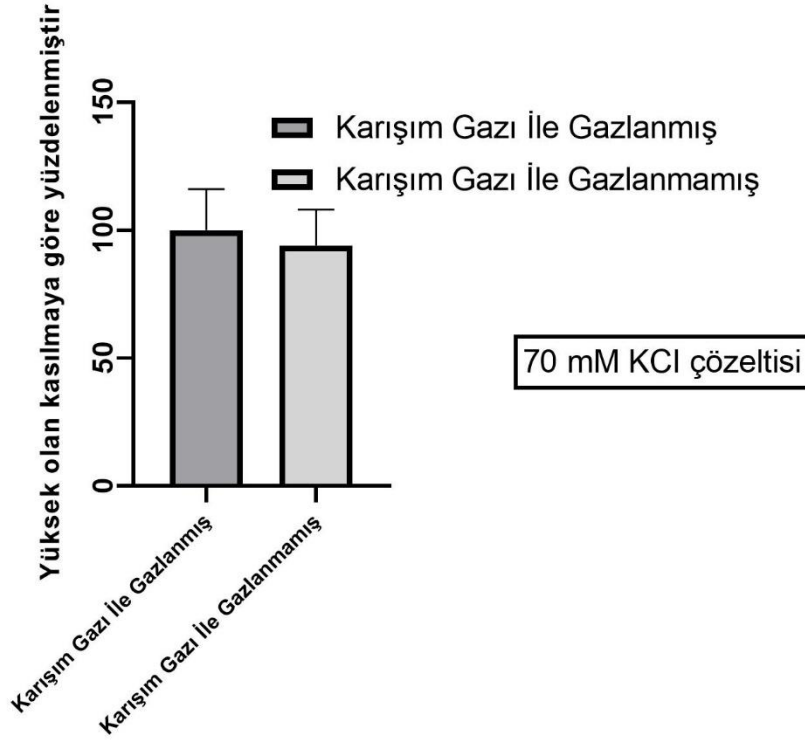


Şekil 4.3a. Rat abdominal aortasının organ banyosunda ve modifiye MuWOB sistemindeki Fenilefrin (FE)-Asetilkolin (ACh) konsantrasyon yanıt eğrileri



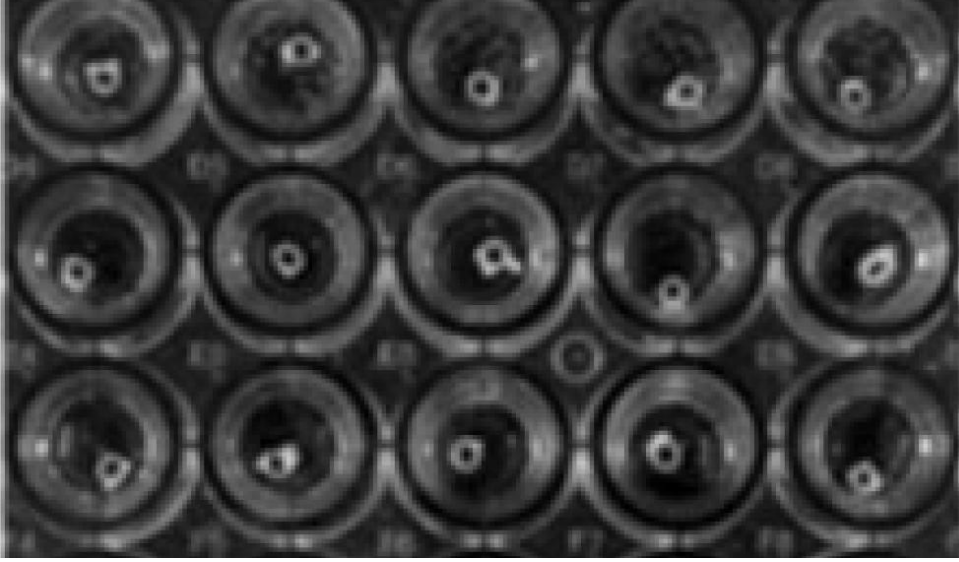
Şekil 4.3b. Borges ve arkadaşlarının oluşturduğu Multi-well organ bath (MuWOB) sistemindeki Fe-ACh konsantrasyon yanıt eğrisi (Borges ve ark., 2016)

Şekil 4.3a. ve Şekil 4.3b Klasik organ banyosu, MuWOB sistemi ve modifiye MuWOB sisteminin kullanımı sırasında endotelin ne derece korunduğuna ilişkin karşılaştırmada, organ banyosunda (n=7) ve modifiye MUWOB sisteminin (n=7) pD₂ değerleri sırasıyla 5,40±0,36 ve 6,63±0,42 olarak bulunmuştur (MuWOB sistemine ait pD₂ değeri yoktur). Modifiye MuWOB sisteminde endotel yanıtlarının daha iyi korunduğu görülmüştür. Veriler ortalama ± SS olarak verilmiştir. p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

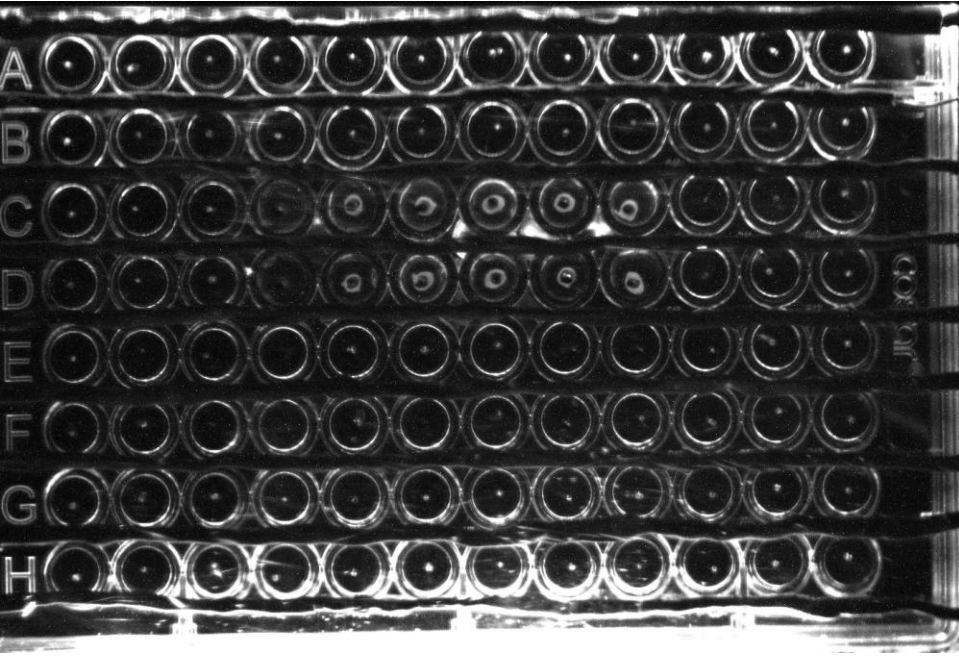


Şekil 4.4: Karışım gazıyla gazlanmış ve gazlanmamış rat abdominal aorta preparatının 70 mM KCl çözeltisiyle oluşturduğu kasılmaların karşılaştırılması.

Rat abdominal aorta preparatlarına %5 CO₂ ve , %95 O₂ içeren karışım gazı uygulanmış, uygulanmamış gruplarda 70mM KCl solüsyonuyla kasılma yanıtları alınmıştır. Her ne kadar gazlanan grupta kasılma yanıtları daha fazla olsa da gruplar arasında istatistiksel farklılık görülmemiştir.

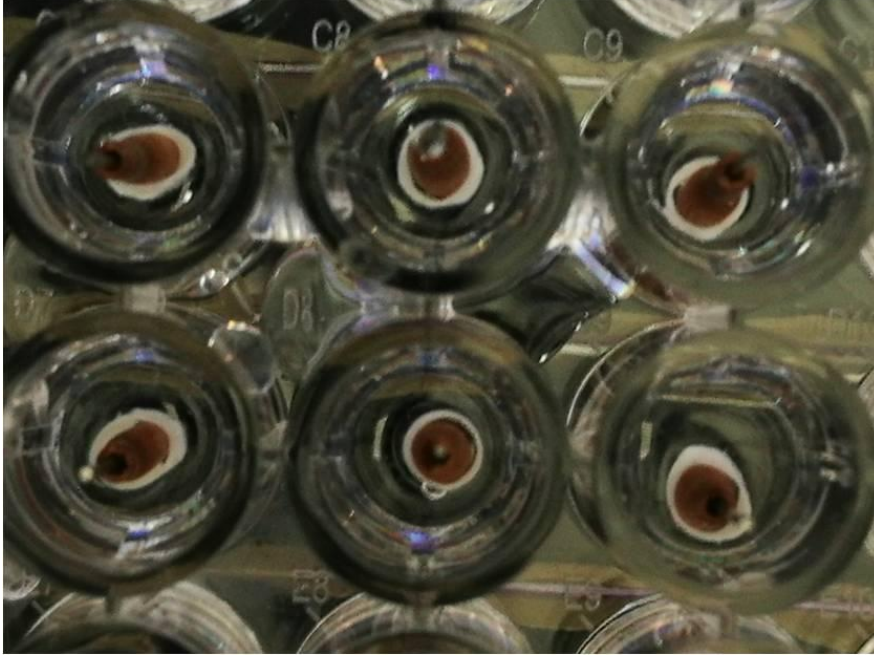


Şekil 4.5a. (Borges ve ark., 2016)

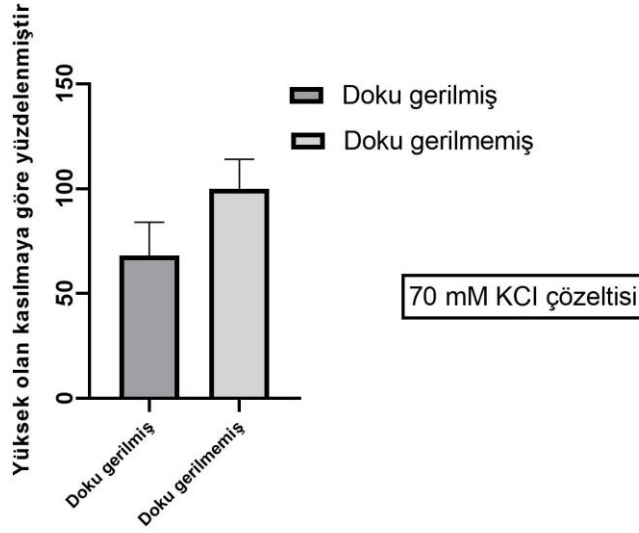


Şekil 4.5b.

Şekil 4.5a ve Şekil 4.5b. Şekil 4.5a'da MuWOB sistemindeki damar preparatının yerleri ile Şekil 4.5b'de ki modifiye MuWOB sistemindeki damarların karşılaştırılması. MuWOB ve modifiye MuWOB sistemlerinde plate içine yerleştirilen 2 mm yüksekliğindeki damarların pipetleme sırasında yer değiştirip değiştirmediğine bakılmış, MuWOB sisteminde dokunun yerinin değiştiği, modifiye MuWOB sisteminde ise değişmediği görülmüştür.

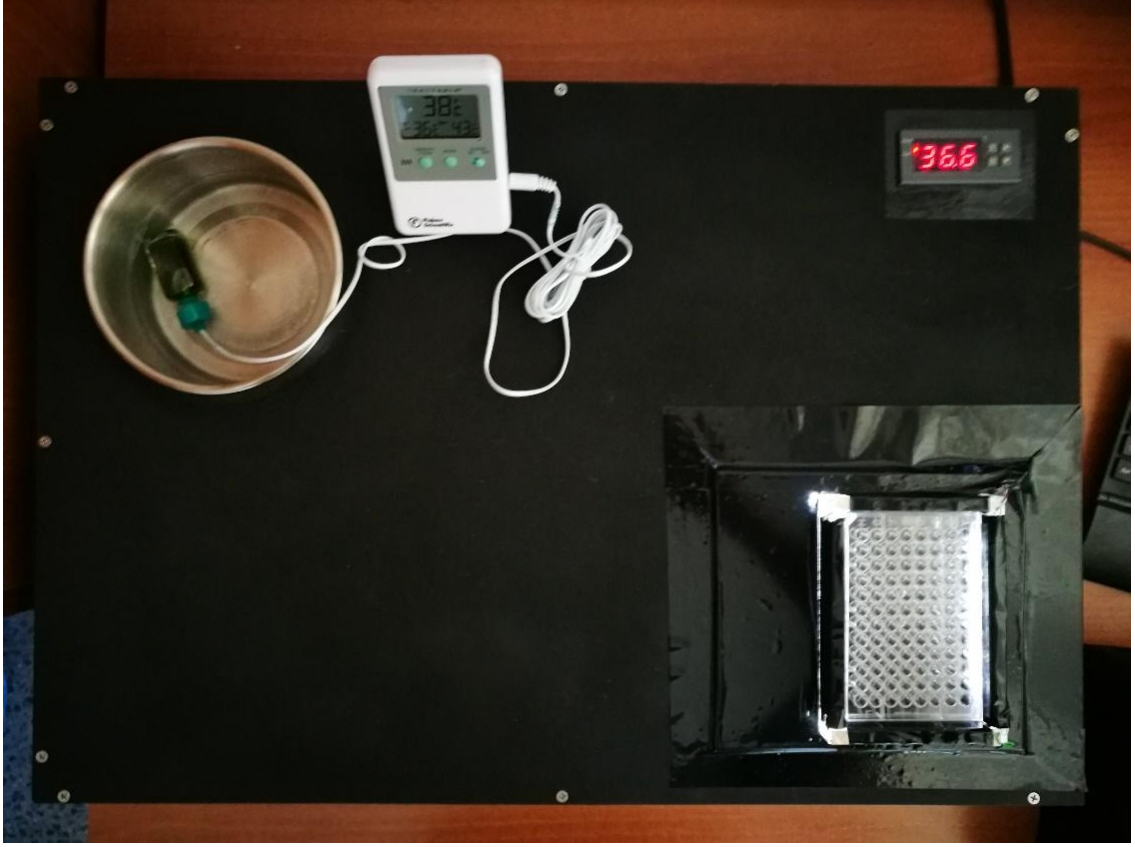


Şekil 4.6a.



Şekil 4.6b.

Şekil 4.6a ve Şekil 4.6b. Doku üzerinde bazal gerilim oluşturulması. Modifiye MuWOB sisteminde, MuWOB sisteminde olmayan bazal gerilimi oluşturabilmek için, polikarbon yapıda suyla genişleyen bir materyal kullanılmıştır. Doku üzerinde gerilim oluşturulmuştur fakat kullanılan materyal suyla genişleyince dahi damar tarafından bastırılabilir sertlikten daha fazla sertlik olduğu için damar daralamamış, bu nedenle görüntüleme sistemiyle bu değişikliğin sonucu kesin olarak ölçülemediği (n=3).



Şekil 4.7. Stok solüsyonlar için 37°C derecede sabit ısıtma sağlayan sistem

Solüsyonlar için oluşturulmuş bu alan, hem Krebs solüsyonunun, hem de hazırlanmış madde çözeltilerinin sisteme uygulamak için gerekli sıcaklıkta bekletilmesini sağlamaktadır.

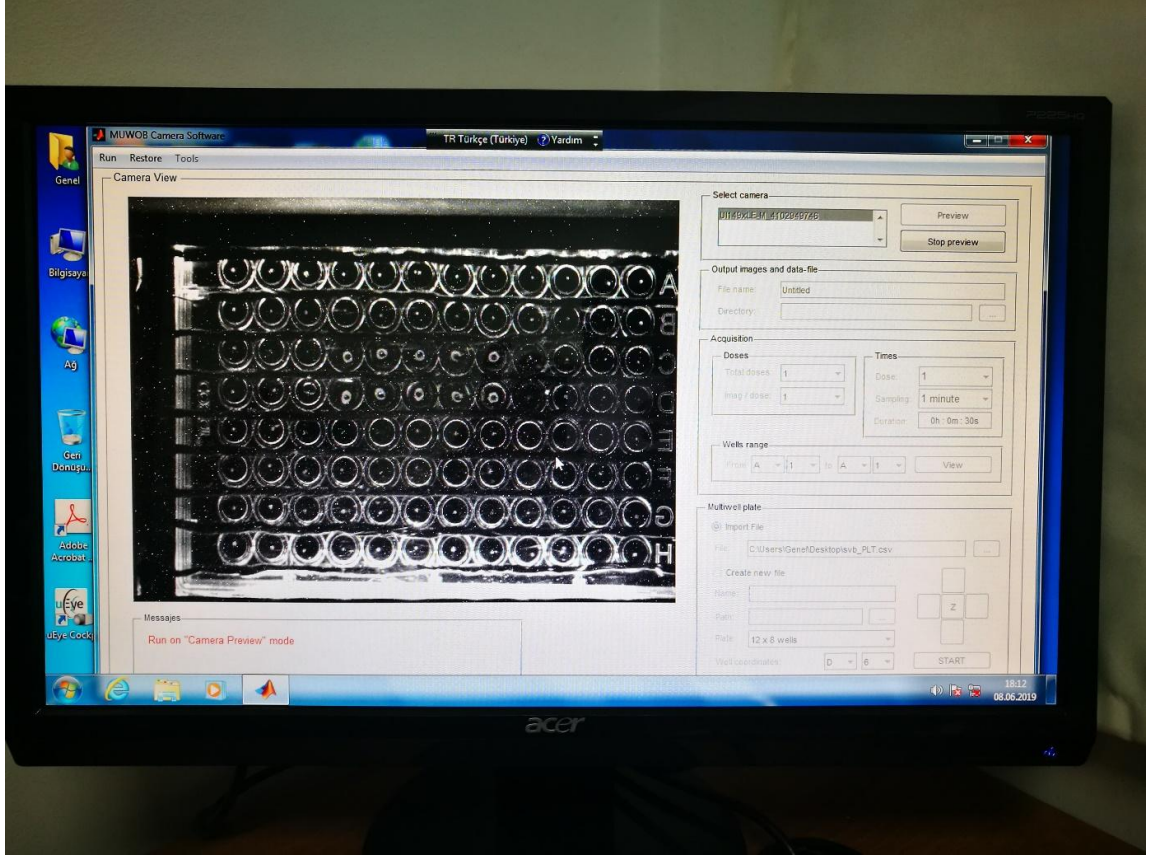


Şekil 4.8a.



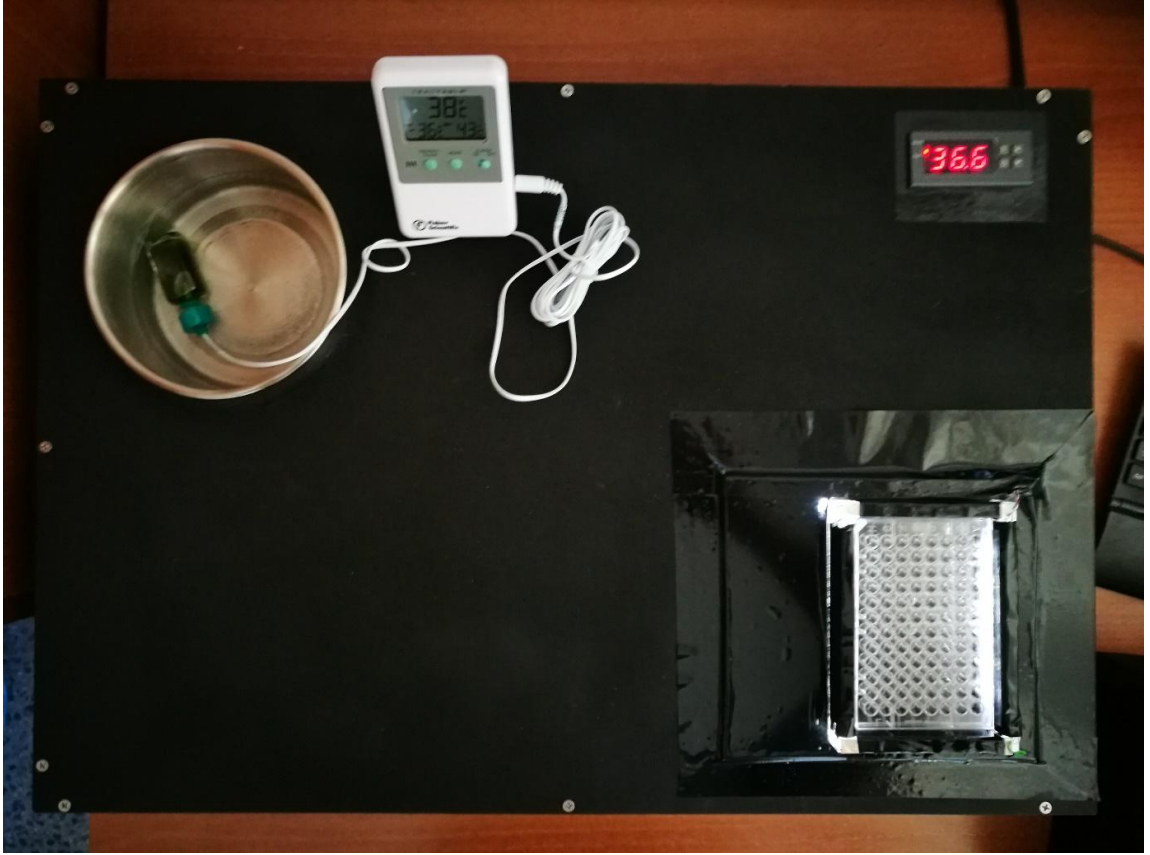
Şekil 4.8b.

Şekil 4.8a ve Şekil 4.8b: MuWOB ve modifiye MuWOB sistemleri arasında görüntüleme sistemlerinin karşılaştırılması. MuWOB sistemi ile modifiye MuWOB sisteminde damar preparatının olduğu kuyucuklara eklenen çözülmüş maddeler kuyucukların içindeki solüsyon miktarını artırmaktadır. Bu artış MuWOB sisteminde damarın daha büyük olarak görüntülenmesine eden olurken, modifiye MuWOB sisteminde görüntü plate'in altından alındığı için değişiklik olmamaktadır.



Şekil 4.9. Yazılım arayüzü (Borges ve ark., 2016).

Şekil 4.9’da Borges ve ark. nın geliştirdiği MuWOB yazılımının arayüzü görünmektedir. Yazılım MatLab üzerinden oluşturulmuş, anlık değil belirli aralıklarla görüntü alıp, işleme mantığıyla çalışmaktadır.



Şekil 4.10. Modifiye MuWOB sistemi

Geliştirmiş olduğumuz modifiye MuWOB sistemi, sistem solüsyonlar için ayarlanabilir stok alanının yanında, plate'in konulduğu yüzeyinde elektronik olarak ısıtılmasını kontrol eden bir ısıtma sistemine sahiptir.

5. TARTIŞMA

Damar fizyolojik yanıtlarının değerlendirilmesi için organ banyosu mantığıyla çalışan pek çok sistem vardır. Bu sistemlerde esas olan damarın bir taraftan sabit bir noktaya tutturulurken, diğer taraftan mesafesi dolayısıyla damar üzerindeki gerilimin ayarlanabildiği güç transdüserine tutturulmasıdır. Sisteme takılan dokunun, Krebs veya modifiye Krebs vb. solüsyonlar içinde ve uygun sıcaklıkta, fizyolojik yanıtları analog olarak alınır, A/D dönüştürücüyle bilgisayar sistemine ulaştırılır. Sistem 3-4mm uzunluğunda 4-8 arasında damar preparatı asılacak şekilde oluşturulmuştur (Kenakin, 2001). Damar preparatından iki adet tel geçirildiği ve sonrasında bunlar gerildiği için endoteli tam olarak sağlam şekilde sisteme asma olasılığı düşüktür. MuWOB sisteminde ise mekanik bir ölçüm yoktur, görüntüsü alınan damarın görüntüdeki piksel sayısına göre fizyolojik yanıtları hesaplanabilmektedir. Sisteme 1-2 mm uzunluğunda damarın eklenmesi yeterlidir, yani bir damar daha fazla yerde kullanılabilir ve sistemde aynı anda teorik olarak 96 dokunun ölçümü yapılabilir. Herhangi bir sisteme takmak gerekmediği için, daha fazla dokunun sisteme yerleştirilip, görüntülenebilmesi için daha kısa bir zamana ihtiyaç vardır. Halbuki organ banyosunda banyoların önceden kalibre edilmesi ve sonra damarların tek tek asılıp, gerilmesi çok daha uzun sürenin harcanmasına neden olmaktadır.

Ticari olarak satılan organ banyolarının haznelerinin hacimleri sıklıkla 5, 10, 20, 30 ve 50ml'den biridir. MuWOB'da kullanılan plate'in kuyucuğu ise 250-300µL hacme sahiptir, bu durum organ banyolarında aynı deney için aşırı madde harcanması anlamına gelmektedir.

Birazda MuWOB ve bizim geliştirdiğimiz modifiye MuWOB'u karşılaştırsak, MuWOB sistemi güzel bir sistem fakat geliştirilebilecek/geliştirilmesi gerekli yönleri de var, bu projeye MuWOB sisteminde gördüğümüz eksikler nedeniyle başladık.

İki sistem arasında en temel farklılık görüntüleme tekniğindedir. MuWOB üstten telesentrik lens ile görüntü almaktadır, bu lensler amaca yönelik özel olarak tasarlanan ve klasik lenslere göre yakın mesafeden görüntüde distorsiyon yapmadıkları veya daha

az yaptıkları kabul edilen lenslerdir, modifiye sistemde bizim kullanmış olduğumuz lensler ise telemetriktir, telemetrik lenslerde görüntü distorsiyonu azdır fakat objeyi uzaktan ancak görüntüleyebilirler, yani uzaktaki objeyi büyütüp, görüntülemekte kullanılan bir lens sistemidir, bu nedenle kamerayla plate'in konulduğu alan uzak olmalıydı, bunu sağlamak için kutu içinde aynalarla yansıtarak bu mesafeye daha kısa alanda ulaşabildik, elde ettiğimiz görüntüde, şekillerden de anlaşılacağı gibi daha az distorsiyon oluştu (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

Distorsiyonun neden bu kadar önemli olduğuna gelirsek, yazılım kameradan gelen görüntüde damarın açık rengini ayırıp gördüğü halkanın piksellerini sayarak damarın fizyolojik yanıtını hesaplamakta, bu sırada görüntü direk karşıdan halka şeklinde alınırsa sistem en iyi şekilde çalışmaktadır. Şekil 4.2b'de görüldüğü gibi plate'in dışlarına doğru görüntü düz değil yandan gelmektedir, bu da bu alandaki damarların yan duvarlarının da görüntüye gireceğini ve görüntüyü işlerken sorun olacağını göstermektedir. Bu nedenle MuWOB sistemi ile gerçekte 96 dokuyu aynı anda çalışmak mümkün değilken, bizim sistemimizde bu mümkündür. İki sistemdeki temel avantajlarımızdan biri budur.

Organ banyosu, MUWOB ve modifiye MuWOB'u asılan veya sisteme yerleştirilen damarlarda endotelin ne kadar sağlam kaldığını karşılaştırdığımızda, organ banyosuna göre her iki sistemde de endotel daha fazla oranda korunmaktadır. Bunun çalışmalarda dokunun in vivo'ya daha yakın yanıt vermesini sağlayabileceğini düşünmekteyiz (Şekil 4.3).

Organ banyosunda karışım gazı kullanmak gerekirken, olasılıkla plate'in kuyucuğunun hacmi az olduğundan ve havadan Krebs solüsyonu içine çözünen oksijen yeterli olduğundan, sistemde gazlanmış ve gazlanmamış dokulardaki kasılma yanıtlarının istatistiksel olarak fark görülmemesi, bize karışım gazı ihtiyacının olmadığını da düşündürmektedir (Şekil 4.4). Bu da hem maliyetin azalacağı, hem daha küçük alanda çalışma olanağı hem de karışım gazındaki hatalardan dolayı deneyin etkilenmeyeceği anlamına gelmektedir (Şekil 4.4).

MuWOB sisteminden farklı olarak damar preparatlarını kuyucukların ortasına sabitlediğimiz 0,35mm çapındaki çelik tellere geçirdik, bu durum kuyucuk içindeki

solüsyonu pipetlerken damarın ortadan, köşelere doğru kaçma olasılığını ortadan kaldırmış oldu. Kuyucuğun dış çeperi sistemde beyaz olarak görüntülediği için, damarın dışarı doğru kaçması, yazılımın bu alanları da algılayıp yanlış sayım yapmasına neden olabilmektedir. Bu şekilde bu olasılık da ortadan kaldırılmış olmuştur (Şekil 4.5).

Sistemin eksiklerinden biri, her ne kadar sistem bu şekilde de çalışsa da, damara bazal gerilim uygulanamamasıdır. Bazı araştırmalarda damar cevabının başlangıçtaki gerilme miktarına bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir (Price ve ark., 1981). Bu bazal gerilimi sağlamak için polikarbon yapıda suyla genişleyen bir materyali damarın içinden geçebilecek kadar inceltip, kuyucuğun ortasına yerleştirdik, amaç damarı buraya geçirdikten sonra Krebs solüsyonu ile bu materyalin şişip, damara gerilim uygulamasının sağlanmasıydı. Olasılıkla materyal sert olduğu için damar tarafından sıkıştırılmadı bu nedenle damarın kasılma sistem tarafından yeterince etkili bir şekilde ölçülememiştir. Bu amaçla kullanmak için daha farklı materyalleri halen araştırmaktayız.

Sistemimizde görüntünün kuyucuğun altından alınmasının sağladığı diğer bir avantajı; deney sırasında eklenen Krebs çözeltisi veya herhangi bir çözelti kuyucuk içindeki sıvının seviyesinin yukarı çıkmasına neden olmaktadır, bu durumu üstten bakıldığında kırılma indisi değiştiği için, damarın daha büyük görünmesi ve ölçümün hatalı olmasına neden olmaktadır, görüntünün kuyucuğun altından alınması ise bu sorunu çıkarmayıp, hataya neden olmamaktadır (Şekil 4.8).

Sonuç olarak, organ banyosuna alternatif olmaya aday MuWOB sisteminin, organ banyosuna göre pek çok avantajları vardır. Bizim geliştirdiğimiz modifiye MuWOB sistemi de MuWOB'un geliştirilmesinde, kullanılabilirliğini artırılmasına ve ticarileştirilme olasılığına katkıda bulunabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

MuWOB sistemi, kolay uygulanabilir olması, daha az tezgah alanı kaplaması, daha az hayvan ve daha az kimyasal kullanımına olanak sağlaması gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır. Bizim modifiye ettiğimiz sistemde diğer sistemin eksiklikleri giderilmeye çalışılmıştır. Görüntülemeye kullanılan kuyucuk sayısının artması, distorsiyonun engellenmesi ve endotel hasarının azalması en büyük avantajlarıdır. Bununla birlikte bazal gerilim oluşturmak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Tüm bu avantajlarla ve geliştirdiğimiz/geliştirilebilecek özellikleri ile MuWOB sistemi pratikte kullanılabilir potansiyeline sahiptir.

KAYNAKLAR

- Augustin, H. G., Kozian, D. H., & Johnson, R. C. Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays*. 1994; 16 (12): 901-906.
- Beny, J. L., Nguyen, M. N., Marino, M., & Matsui, M. Muscarinic receptor knockout mice confirm involvement of m3 receptor in endothelium-dependent vasodilatation in mouse arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008; 51 (5): 505-512.
- Bohm, F., & Pernow, J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2007; 76 (1): 8-18.
- Borges, R., Carter, D. V., von Grafenstein, H., Halliday, J., & Knight, D. E. Ionic requirements of the endothelin response in aorta and portal vein. *Circ Res*. 1989; 65 (2): 265-271.
- Borges, R., Diaz-Martin, D., Hernandez-Jimenez, J. G., Rodriguez-Valido, M., & Beltran, B. Analyzing isolated blood vessel contraction in multi-well plates. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2016; 389 (5): 521-528.
- Bujak-Gizycka, B., Madej, J., Wolkow, P. P., Olszanecki, R., Drabik, L., Rutowski, J. Measurement of angiotensin metabolites in organ bath and cell culture experiments by liquid chromatography - electrospray ionization - mass spectrometry (lc-esi-ms). *J Physiol Pharmacol*. 2007; 58 (3): 529-540.
- Bukoski, R. D., Shearin, S., Jackson, W. F., & Pamarthi, M. F. Inhibition of ca²⁺-induced relaxation by oxidized tungsten wires and paratungstate. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 299 (1): 343-350.
- Cannon, R. O., 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: Focus on the endothelium. *Clin Chem*. 1998; 44 (8 Pt 2): 1809-1819.
- Chitale, K., Weber, D., & Webb, R. C. RhoA/rho-kinase, vascular changes, and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2001; 3 (2): 139-144.
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998; 91 (10): 3527-3561.
- Crabos, M., Coste, P., Paccalin, M., Tariosse, L., Daret, D., Besse, P. Reduced basal no-mediated dilation and decreased endothelial no-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol*. 1997; 29 (1): 55-65.
- Dusting, G. J., Moncada, S., & Vane, J. R. Prostacyclin (pgx) is the endogenous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. *Prostaglandins*. 1977; 13 (1): 3-15.
- Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J., & Weston, A. H. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. 1998; 396 (6708): 269-272.

- Esper, R. J., Nordaby, R. A., Vilarino, J. O., Paragano, A., Cacharron, J. L., & Machado, R. A. Endothelial dysfunction: A comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol.* 2006; 5: 4.
- Falloon, B. J., & Heagerty, A. M. In vitro perfusion studies of human resistance artery function in essential hypertension. *Hypertension.* 1994; 24 (1): 16-23.
- Faraci, F. M., & Sigmund, C. D. Vascular biology in genetically altered mice : Smaller vessels, bigger insight. *Circ Res.* 1999; 85 (12): 1214-1225.
- Feletou, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: Therapeutic options? *Br J Pharmacol.* 2009; 156 (4): 545-562.
- Feletou, M., & Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarizations: Past beliefs and present facts. *Ann Med.* 2007; 39 (7): 495-516.
- Ferro, C. J., & Webb, D. J. Endothelial dysfunction and hypertension. *Drugs.* 1997; 53 (1): 30-41.
- Fishman, A. P. Endothelium: A distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci.* 1982; 401: 1-8.
- Fleming, I., & Busse, R. No: The primary edrf. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31 (1): 5-14.
- Forstermann, U., Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Sheng, H., Mitchell, J. A., Warner, T. D. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42 (10): 1849-1857.
- Hrdina, P., Bonaccorsi, A., & Garattini, S. Pharmacological studies on isolated and perfused rat renal arteries. *Eur J Pharmacol.* 1967; 1 (2): 99-108.
- Itoh, Y., Yanagisawa, M., Ohkubo, S., Kimura, C., Kosaka, T., Inoue, A. Cloning and sequence analysis of cdna encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: Identity of human and porcine endothelin. *FEBS Lett.* 1988; 231 (2): 440-444.
- Jerez, S., Sierra, L., Coviello, A., & de Bruno, M. P. Endothelial dysfunction and improvement of the angiotensin ii-reactivity in hypercholesterolemic rabbits: Role of cyclooxygenase metabolites. *Eur J Pharmacol.* 2008; 580 (1-2): 182-189.
- Jespersen, B., Tykocki, N. R., Watts, S. W., & Cobbett, P. J. Measurement of smooth muscle function in the isolated tissue bath-applications to pharmacology research. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* 2015; (95): e52324.
- Kanasaki, M., Nagai, T., Kitada, M., Koya, D., & Kanasaki, K. Elevation of the antifibrotic peptide n-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline: A blood pressure-independent beneficial effect of angiotensin i-converting enzyme inhibitors. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2011; 4: 25.
- Karaki, H. Use of tension measurements to delineate the mode of action of vasodilators. *J Pharmacol Methods.* 1987; 18 (1): 1-21.
- Kawanabe, Y., & Nauli, S. M. Involvement of extracellular ca²⁺ influx through voltage-independent ca²⁺ channels in endothelin-1 function. *Cell Signal.* 2005; 17 (8): 911-916.

- Kenakin, T. Isolated blood vessel assays. *Curr Protoc Pharmacol.* 2001; Chapter 4: Unit4 4.
- Ketonen, J. Vascular dysfunction in diet-induced hypertension and obesity in mice. 2010.
- Kirkpatrick, C. J., Bittinger, F., Unger, R. E., Kriegsmann, J., Kilbinger, H., & Wessler, I. The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: Evidence and possible pathobiological significance. *Jpn J Pharmacol.* 2001; 85 (1): 24-28.
- Knowles, R. G. Nitric oxide biochemistry. *Biochem Soc Trans.* 1997; 25 (3): 895-901.
- Knowles, R. G., & Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994; 298 (Pt 2): 249-258.
- Ko, E. A., Han, J., Jung, I. D., & Park, W. S. Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 2008; 44 (2): 65-81.
- Lu, C., Su, L.-Y., Lee, R. M., & Gao, Y.-J. Superoxide anion mediates angiotensin ii-induced potentiation of contractile response to sympathetic stimulation. *European journal of pharmacology.* 2008; 589 (1-3): 188-193.
- Mehta, P. K., & Griendling, K. K. Angiotensin ii cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292 (1): C82-97.
- Michel, T., & Feron, O. Nitric oxide synthases: Which, where, how, and why? *J Clin Invest.* 1997; 100 (9): 2146-2152.
- Mironneau, J., & Macrez-Lepretre, N. Modulation of Ca^{2+} channels by $\alpha 1a$ - and $\alpha 2a$ -adrenoceptors in vascular myocytes: Involvement of different transduction pathways. *Cell Signal.* 1995; 7 (5): 471-479.
- Mitchell, J. A., Ali, F., Bailey, L., Moreno, L., & Harrington, L. S. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol.* 2008; 93 (1): 141-147.
- Moncada, S., & Higgs, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006; 147 Suppl 1: S193-201.
- Morgan, K. G. The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the Ca^{2+} indicator aequorin. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1990; 4 (5): 1355-1362.
- Mundy, A. L., Haas, E., Bhattacharya, I., Widmer, C. C., Kretz, M., Baumann, K. Endothelin stimulates vascular hydroxyl radical formation: Effect of obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293 (6): R2218-2224.
- Nilsson, H., & Sjoblom, N. Distension-dependent changes in noradrenaline sensitivity in small arteries from the rat. *Acta Physiol Scand.* 1985; 125 (3): 429-435.
- Ortega Mateo, A., & de Artinano, A. A. Highlights on endothelins: A review. *Pharmacol Res.* 1997; 36 (5): 339-351.
- Pagano, P. J., & Gutterman, D. D. The adventitia: The outs and ins of vascular disease. *Cardiovascular research.* 2007; 75 (4): 636-639.

- Perez, J. F., & Sanderson, M. J. The frequency of calcium oscillations induced by 5-HT, ACh, and KCl determine the contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary bronchioles. *J Gen Physiol.* 2005; 125 (6): 535-553.
- Price, J. M., Davis, D. L., & Knauss, E. B. Length-dependent sensitivity in vascular smooth muscle. *Am J Physiol.* 1981; 241 (4): H557-563.
- Sah, V. P., Seasholtz, T. M., Sagi, S. A., & Brown, J. H. The role of rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000; 40: 459-489.
- Scheindlin, S. A brief history of pharmacology. *Modern drug discovery.* 2001; 4 (5): 87-88.
- Schubert, R. (2005). Isolated vessels. In *Practical methods in cardiovascular research* (pp. 198-211): Springer.
- Schwarz, U. R., Walter, U., & Eigenthaler, M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol.* 2001; 62 (9): 1153-1161.
- Sessa, W. C. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100 Suppl 1: 15-18.
- Stennett, A. K., Qiao, X., Falone, A. E., Koledova, V. V., & Khalil, R. A. Increased vascular angiotensin type 2 receptor expression and NOS-mediated mechanisms of vascular relaxation in pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 296 (3): H745-755.
- Stocker, R., & Keaney, J. F., Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004; 84 (4): 1381-1478.
- Szasz, T., & Webb, R. C. Perivascular adipose tissue: More than just structural support. *Clin Sci (Lond).* 2012; 122 (1): 1-12.
- Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovascular research.* 2018; 114 (4): 529-539.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 1997; 389 (6654): 990-994.
- van Breemen, C., Leijten, P., Yamamoto, H., Aaronson, P., & Cauvin, C. Calcium activation of vascular smooth muscle. State of the art lecture. *Hypertension.* 1986; 8 (6 Pt 2): II89-95.
- Vanhoutte, P. M. Endothelium and control of vascular function. State of the art lecture. *Hypertension.* 1989; 13 (6 Pt 2): 658-667.
- Walch, L., Brink, C., & Norel, X. The muscarinic receptor subtypes in human blood vessels. *Therapie.* 2001; 56 (3): 223-226.
- Webb, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in physiology education.* 2003; 27 (4): 201-206.

Weksler, B. B., Marcus, A. J., & Jaffe, E. A. Synthesis of prostaglandin i2 (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977; 74 (9): 3922-3926.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Melike Nur	Uyruğu	TC
Soyadı	AKBAŞ	Tel no	0544 933 3994
Doğum tarihi	19/07/1990	e-posta	melike_akb@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Burdur Anadolu Lisesi	2008
Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2014
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Farmakovijilans Uzmanı	Bölükbaşı İlaç San. Tic ve LTD Şti	2015-2018
Fitofarmasi Uzmanlık Öğrencisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2018-halen

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	Yökdil	78

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayımlar ve Bildiriler: