

Ahmet YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024 - ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERİTROSİTLERİN FENİLEFRİN ARACILI
VASKÜLER KASILMA YANITLARINA KATKISI

Ahmet YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERİTROSİTLERİN FENİLEFRİN ARACILI VASKÜLER KASILMA YANITLARINA KATKISI

Ahmet YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Pınar ÜLKER

Bu tez TYL-2022-5878 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından ve 123S997 proje numarası ile Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı Fizyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 10 / 01 / 2024.

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Pınar ÜLKER
Akdeniz Üniversitesi

e-imzalıdır.

Üye : Prof. Dr. Vecihe Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi

e-imzalıdır.

Üye : Prof. Dr. Filiz BASRALI
Akdeniz Üniversitesi

e-imzalıdır.

Üye : Prof. Dr. Nazmi YARAŞ
Akdeniz Üniversitesi

e-imzalıdır.

Üye : Prof. Dr. Selma Arzu VARDAR
Trakya Üniversitesi

e-imzalıdır.

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. Melike CENGİZ

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.

Ahmet YILDIRIM

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Pınar ÜLKER

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince kıymetli bilgi, birikim ve tecrübesiyle bana yol gösteren ve destek olan danışman hocam Doç. Dr. Pınar ÜLKER'e saygılarımı sunar ve teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında sağlamış olduğu imkanlardan dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Filiz BASRALI'ya ve öğrenimime sağlamış oldukları katkılarından dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Eğitimime sağlamış oldukları desteklerden dolayı Prof. Dr. Aysel AĞAR, Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÇAKIN ve Türk Fizyolojik Bilimler Derneği'ne teşekkürlerimi sunarım.

Tez deneylerim boyunca özverili yardımları için Uzm. Dr. Ülkü ARSLAN YILDIZ'a teşekkür ederim.

Bana sağladıkları katkılardan dolayı çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Nur ÖZEN ve Arş. Gör. Leyla ABUEİD'e teşekkürü bir borç bilirim. Bölümdeki asistan arkadaşlarıma ve teknikerimiz Akın BÜYÜKAKAR'a da ayrıca teşekkür ederim.

Manevi desteklerinden dolayı dostlarım Başak GÖNEN ve Canberk YAYLA'ya ve yardımları için Çağla KAPLAN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her konuda arkamda olduklarını hissettiğim, benden sevgilerini ve desteklerini asla esirgemeyen, annem Fatma YILDIRIM'a ve babam Abamislil YILDIRIM'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Barut kokusundan çiçeklerin solduğu topraklarda mutlu çocukların yetiştiği barışçıl bir dünya görmek ümidiyle...

ÖZET

Amaç: Bu çalışmayla fenilefrin aracılı vazokonstriksiyonda eritrositlerin etkisinin incelenmesi ve bu etkinin mekanizmasının araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: 8-10 haftalık Wistar ırkı albino sıçanlardan elde edilen torasik aorta segmentleri doku banyosuna asılarak, Krebs solüsyonu ve eritrosit süspansiyonu (%40 hematokrit) varlığında fenilefrin (10^{-9} - 3×10^{-4} M) konsantrasyon-yanıt eğrileri incelenmiştir. Eritrosit süspansiyonlarını hazırlamak için kan örnekleri 18-45 yaş arası sağlıklı gönüllülerden alınmıştır. Deney protokolleri non-selektif β ve selektif α_1 adrenoseptör antagonisti Carvedilol, non-selektif siklooksijenaz inhibitörü İndometazin, Tromboksan A sentaz inhibitörü Dazoxiben, Tromboksan A_2 reseptör antagonisti GR 32191B ve Prostaglandin $F_{2\alpha}$ reseptör antagonisti AL 8810 varlığında tekrarlanmıştır. Bu ölçümlerin ardından doku banyosunda alınan örneklerde Tromboksan B_2 ve serbest hemoglobin ölçümleri yapılmıştır.

Bulgular: Sadece Krebs solüsyonuna kıyasla eritrosit süspansiyonlarının bulunduğu ortamda alınan kasılma yanıtlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.001$). Carvedilol tüm gruplarda vazokonstriksiyon yanıtlarını inhibe etmiştir ($p < 0.001$). Eritrositlerin bulunduğu ortamda gerçekleşen kasılma yanıtlarındaki artış indometazin varlığında baskılanmıştır ($p < 0.01$). Dazoxiben ve GR32191B varlığında eritrosit içeren ve içermeyen doku banyoları arasındaki yanıt farkının ortadan kalktığı bulunmuştur. AL8810 inkübasyonu ile eritrosit varlığında alınan vazokonstriksiyon yanıtlarının etkilenmediği görülmüştür ($p < 0.01$). Fenilefrine cevaben eritrosit süspansiyonu grubunda Tromboksan B_2 miktarının arttığı ($p < 0.001$) ve serbest hemoglobin düzeylerinin gruplar arasında farklılık göstermediği bulunmuştur.

Sonuç: Bu çalışma, fenilefrin aracılı aorta kasılma yanıtlarına eritrositlerin aracılık ettiğini göstermiştir. Eritrositler bu etkilerini adrenerjik reseptör aktivasyonu ile uyarılan ve siklooksijenaz yolağı ile üretilen Tromboksan- A_2 salınımlarıyla gerçekleştirmektedir. Bu durum eritrositlerin vazoregülatör etkilerine eritrosit aracılı kasılma mekanizmasının da eklenmesini sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Eritrosit, fenilefrin, tromboksan A_2 , vazokonstriksiyon

ABSTRACT

Objective: This study aimed to examine the effect of erythrocytes on phenylephrine-mediated vasoconstriction and to investigate the mechanism of this effect.

Methods: Thoracic aorta segments obtained from 8-10 week old Wistar albino rats were placed in a tissue bath and phenylephrine (10^{-9} - 3×10^{-4} M) concentration-response curves were examined in the presence of Krebs solution and erythrocyte suspension. Blood samples were taken from healthy volunteers aged 18-45. The protocols were repeated in the presence of adrenoceptor antagonist Carvedilol, non-selective cyclooxygenase inhibitor Indomethacin, Thromboxane synthase inhibitor Dazoxiben, Thromboxane-A₂ receptor antagonist GR32191B and Prostaglandin-F_{2α} receptor antagonist AL8810. Following these measurements, Thromboxane-B₂ and free hemoglobin measurements were made in the samples taken in the tissue bath.

Results: It was observed that the vasoconstriction obtained in the presence of erythrocyte suspensions were significantly higher compared to Krebs solution alone ($p < 0.001$). Carvedilol inhibited vasoconstriction responses in all groups ($p < 0.001$). This increase in vasoconstriction occurring in the presence of erythrocytes was suppressed in the presence of indomethacin ($p < 0.01$). It was found that the difference in response between tissue baths with and without erythrocytes disappeared in the presence of Dazoxiben and GR32191B. It was observed that vasoconstriction responses in the presence of erythrocytes were not affected by AL8810 incubation ($p < 0.01$). It was found that the amount of Thromboxane B₂ increased in the erythrocyte suspension group in response to phenylephrine ($p < 0.001$) and free hemoglobin levels did not differ between groups.

Conclusion: This study demonstrated that phenylephrine-mediated aortic contraction responses were mediated by erythrocytes. Erythrocytes perform these effects through the release of Thromboxane-A₂, which is stimulated by adrenergic receptor activation and produced by the cyclooxygenase pathway. This will enable the erythrocyte-mediated contraction mechanism to be added to the vasoregulatory effects of erythrocytes.

Key Words: Erythrocyte, phenylephrine, thromboxane A₂, vasoconstriction

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Araşidonik Asit Metabolizması	3
2.1.1. Siklooksijenaz yolağı	5
2.1.2. Prostaglandinler ve Prostaglandin	6
2.1.3. Tromboksan A ₂	8
2.2. Adrenoseptörler	21
2.3. Vasküler Tonus ve Kan Basıncının Düzenlenmesinde Eritrositlerin Rolü	24
2.3.1. Eritrosit Aracılı Vazodilatasyon	25
2.3.2. Eritrosit Aracılı Vazokonstriksiyon	28
2.4. Amaç ve Hipotez	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	33
3.1. Kan Örneklerinin Toplanması	33
3.2. Eritrosit Süspansiyonlarının Hazırlanması	33

3.3. Hayvanların Feda Edilmesi ve Damar İzolasyonu	34
3.4. İzole Damarların Asılması, Dinlenme Periyodu ve Vitalizasyon Aşaması	34
3.5. Ex-vivo Damar Banyosu Protokolleri	35
3.5.1. Endotel Sağlamlığı Protokolü	35
3.5.2. KCl-Krebs Aracılı Kasılma Yanıtı Protokolü	36
3.5.3. Fenilefrin Aracılı Kasılma Yanıtı Protokolleri	36
3.5.4. Endotelden Bağımsız Gevşeme Yanıtı Protokolü	38
3.6. TxB_2 Miktarının Belirlenmesi	39
3.6.1. Kit ile Tedarik Edilen Malzemeler	39
3.6.2. Örneklerin Hazırlanması ve Deney Protokolü	39
3.7. Süpernatant Serbest Hemogloblin Ölçümü	40
3.8. Örneklem Büyüklüğünün Belirlenmesi	41
3.9. Verilerin Değerlendirilmesi	41
4. BULGULAR	42
4.1. Vasküler Yanıtların İncelenmesi	42
4.1.1. Eritrositlerin Vasküler Kasılma Yanıtlarına Etkisi	42
4.1.2. Carvedilol Varlığında Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtları	45
4.1.3. İndometazin Varlığında Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtları	46
4.1.4. Dazoxiben Varlığında Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtları	47
4.1.5. GR32191B Varlığında Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtları	48
4.1.6. AL8810 Varlığında Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtları	49

4.1.7. SNP Aracılı Vazodilatasyon Yanıtları	50
4.2. Süpernatant TxB ₂ Ölçümleri	51
4.3. Süpernatant Serbest Hb Ölçümleri	51
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	94



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3. 1. TxB ₂ ELISA kiti içeriği.	39
Tablo 4. 1. SNP aracılı vasküler gevşeme yanıtları.	51



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Araşidonik asit metabolizması	4
Şekil 2. 2. Araşidonik asitten Tromboksan A ₂ sentezlenmesi	9
Şekil 2. 3. TxA ₂ reseptörünün hücre içi sinyal iletim mekanizmaları	13
Şekil 2. 4. TP aracılı vazokonstriksiyon mekanizmaları	15
Şekil 2. 5. Adrenoseptörlerin alt sınıflandırması	23
Şekil 2. 6. Eritrosit aracılı vazokonstriksiyona dair literatürdeki ilk bulgular	29
Şekil 2. 7. Hipoksik vazodilatasyonu araştıran bir çalışmada açığa çıkan eritrosit aracılı vazokonstriksiyon bulguları	30
Şekil 3. 1. Çalışma yönteminin özet şekli	38
Şekil 4. 1. Eritrositlerin vasküler kasılma yanıtlarına katkısı	42
Şekil 4. 2. Farklı koşullarda fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarının incelendiği deneyler sırasında alınan bir kayıt örneği	43
Şekil 4. 3. Süspansiyon ortamındaki eritrosit miktarının vazokonstriksiyon yanıtlarına etkisinin incelenmesi	44
Şekil 4. 4. Eritrosit dışı kan bileşenlerinin fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarına etkisi	44
Şekil 4. 5. Eritrositlerin vasküler kasılma yanıtlarına katkısında adrenoseptörlerin rolü	45
Şekil 4. 6. Eritrositlerin vasküler kasılma yanıtlarına katkısında siklooksijenaz metabolitlerinin rolü	47
Şekil 4. 7. Eritrositlerin vasküler kasılma yanıtlarına katkısında TxA ₂ 'nin rolü	48
Şekil 4. 8. Eritrositlerin vasküler kasılma yanıtlarına katkısında TP agonistlerinin rolü	49

Şekil 4. 9. Eritrositlerin vasküler kasılma yanıtlarına katkısında FP agonistlerinin rolü	50
Şekil 4. 10. Süpernatant TXB_2 miktarları	51
Şekil 4. 11. Süpernatant serbest Hemoglobin miktarları	52
Şekil 4. 12. Çalışma bulgularının özeti	52
Şekil 6. 1. Çalışma sonuçlarını gösteren özet şekil	63



SİMGELER ve KISALTMALAR

AA	: Araşidonik asit
ACh	: Asetilkolin
Ang-II	: Anjiyotensin-II
AR	: Adrenoseptör/ Adrenerjik reseptör
ATP	: Adenozin trifosfat
BH₄	: Tetrahidrobiyopterin
cAMP	: 3'-5'-Siklik adenozin monofosfat
cDNA	: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
cGMP	: 3'-5'-Siklik guanozin monofosfat
COX	: Siklooksijenaz
cPLA₂	: Sitozolik fosfolipaz A ₂
CYP450	: Sitokrom P450
DAG	: Diaçilgliserol
DP	: Prostaglandin D reseptörü
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
EP	: Prostaglandin E reseptörü
ERK1/2	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2
FP	: Prostaglandin F reseptörü
GPBR	: G-protein bağlı reseptör
Hb	: Hemoglobin

HETE	: Hidroksieikozatetraenoik asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IFN	: İnterferon
IP₃	: İnositol 1,4,5-trifosfat
LC/MS	: Sıvı kromatografisi-Kütle spektrometresi
LOX	: Lipoksijenaz
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MLCK	: Miyozin hafif zincir kinaz
MLCP	: Miyozin hafif zincir fosfotaz
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NO	: Nitrik oksit
NOX	: NADPH Oksidaz
O²⁻	: Süperoksit radikali
PG	: Prostaglandin
Phe	: Fenilefrin
PIP₂	: Fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat
PLA₂	: Fosfolipaz A ₂
PLC	: Fosfolipaz C
RhoGEF	: Rho guanin nükleotid değişim faktörü
RNS	: Reaktif azot türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri

sGC : Çözünebilir guanilil siklaz

TBXA2R : Tromboksan A₂ reseptörü geni

TBXAS1 : Tromboksan-A sentaz geni

TLR4 : Toll benzeri reseptör-4

TP : Tromboksan A₂ reseptörü

TxA₂ : Tromboksan A₂

TxAS : Tromboksan A₂ sentaz

TxB₂ : Tromboksan B₂

1. GİRİŞ

Eritrositlerin kardiyovasküler fonksiyonlarda merkezi bir rol oynadığına dair kanıtlar son yıllarda yapılan çalışmalarla giderek artmaktadır. Bu çalışmalar eritrositlerin, hücre içi sinyal mekanizmaları sayesinde, çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde oldukça etkin hücreler olduğunu göstermiştir. Fizyolojik koşullarda eritrositler benzersiz mekanik davranışları (deformabilite ve agregasyon) ile kan viskozitesini belirlerken; aynı zamanda kan basıncının, yerel kan akımının, kalp fonksiyonlarının ve koagülasyonun düzenlenmesinde de rol almaktadır (Ellsworth ve ark., 1995; Cortese-Krott ve Kelm, 2014; Ulker ve Basrali, 2018; Zhuge ve ark., 2023). Patolojik koşullara bakıldığında ise eritrositlerin mekanik özelliklerindeki bozulmanın kan akışkanlığını etkileyerek doku perfüzyonunu azalttığı görülmektedir. Ayrıca eritrosit kaynaklı nitrik oksit (NO) salınımındaki bozukluklar da oksijen türlerinin (ROS) üretiminde artışa neden olarak eritrositlerin diyabet, hipertansiyon, hiperkolesterolem, preeklampsi gibi hastalıklarda gelişen vasküler patofizyolojide başlatıcı rol oynadığını göstermiştir (Zhou ve ark., 2018; Leo ve ark., 2021; Mahdi ve ark., 2023; Zhuge ve ark., 2023). NO biyoyararlanımındaki azalmaya bağlı olarak eritrositlerin iskemi/reperfüzyon hasarı ve tromboz gibi patolojik durumların da başlatılmasında ve ilerlemesinde etkin olarak yer aldığı ortaya koyulmuştur (Akrawinthawong ve ark., 2014; Yang J. N. ve ark., 2018; Mahdi ve ark., 2021; Jiao ve ark., 2023). Vücutta en çok bulunan hücre türünün eritrositler olduğu göz önünde bulundurulduğunda, eritrositlerin bu rollerinin dikkatle incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Enzimatik mekanizmaları sayesinde dolaşım sisteminin aktif hücreleri olan eritrositlerin, vasküler tonusun düzenlenmesindeki etkileri incelendiğinde hem endotel aracılı hem de endotelden bağımsız mekanizmalarla vasküler direncin düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir. Literatüre bakıldığında ise eritrosit aracılı vazoregülasyonu araştıran çalışmaların neredeyse hepsinin eritrosit aracılı vazodilatasyon mekanizmasına odaklanmış olduğu görülmektedir. Bu araştırmalarda ilgi çekici olan ise bazı deneylerde damar segmentlerine eritrositlerin eklenmesiyle damar tonusunun arttığının bildirilmiş olmasıdır (Vedernikov ve ark., 1998; Diesen ve ark., 2008; Liu ve ark., 2013). Ancak eritrosit varlığında gelişen bu yanıtların net ve geçerli bir açıklaması yapılamamıştır ve mekanizması hala açıklanamamıştır.

Bu çalışmalarda damar segmentine fenilefrin verildikten sonra eritrosit eklenmesiyle daha belirgin olarak gelişen ek vazokonstriksiyon yanıtları değerlendirildiğinde, bu sonuçlarda eritrositlerdeki adrenoseptörlerin aktivasyonunun rolü olabileceği düşünülmüştür. Oysa yapılan literatür incelemeleri neticesinde, eritrositlerin adrenerjik agonistler aracılı vasküler kasılma yanıtlarında fonksiyonel bir öneme sahip olup olmadığını ortaya koyan bir çalışmanın yapılmadığı görülmüştür.

Eritrositlerin vazokonstriktör mediyatörler salgılayıp salgılamadığı araştırıldığında ise vazoaaktif otakoidlerin oluştuğu araşidonik asit (AA) metabolizmasında yer alan bazı enzimlerin dolaşımında bulunan olgun eritrositlerde ve eritrosit öncüllerinde de bulunduğu görülmüştür (Rocca ve ark., 2004; Wischmann ve ark., 2020). Bu çalışmalarla, eritrosit öncüllerinde siklooksijenaz (COX) enzimi aracılığıyla üretilen prostaglandin (PG) E₂ ve Tromboksan A₂'nin (TxA₂) farklılaşma mekanizmalarında rol aldığı ve eksojen olarak AA uygulamasının ise eritrositlerde prostanoid sentezini arttırdığı ortaya koyulmuştur. Öte yandan, eritrositlerin trombositler ile inkübasyonunun trombosit aktivasyonunu arttırdığı, COX inhibitörü aspirinin ise trombosit aktivasyonunu tamamen inhibe ettiği bildirilmiştir (Badimon ve ark., 2021).

Ayrıca adrenoseptörlerin uyarımı ile çeşitli hücrelerde AA yolağının aktifleştiği de daha önce gösterilmiştir (Ruan ve ark., 1998; Ben Cheikh ve ark., 2002). TxA₂ ve PGF_{2α}, AA metabolizmasındaki vazokonstriktör prostanoidlerdir. Literatürde özellikle bu yolağın aktivasyonu ile üretilen TxA₂'nin mezenterik yatakta fenilefrin aracılı kasılmaya aracılık ettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Ben Cheikh ve ark., 2002). Ancak, bugüne kadar eritrositlerden TxA₂ salınımı ayrıntılı olarak çalışılmadığı gibi, eritrosit kaynaklı TxA₂'nin vazokonstriksiyon mekanizmasında nasıl bir rolü olabileceği de araştırılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerin sağlıklı sıçanlardan elde edilen aorta segmentlerinde fenilefrin aracılı vasküler kasılma yanıtlarına etki mekanizmasını ve Tromboksan A₂ ve Prostaglandin F_{2α}'nın bu mekanizmadaki rolünü araştırmaktır. Bu çalışmanın sonuçları, damar tonusunun ve kan basıncının düzenlenmesi konusundaki temel bilgilerimize katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Araşidonik Asit Metabolizması

Eikozatetraenoik asit olarak da bilinen AA, ağırlıklı olarak fosfatidilinositol olmak üzere membran fosfolipitlerinin %5-15'inde, gliserol omurgasının ikinci karbon atomuna bir ester bağı ile bağılı olarak bulunan, 20 karbonlu, çoklu doymamış bir omega-6 yağ asididir (Murray ve ark., 2004). AA'nın öncülü ise esansiyel bir yağ asidi olan linoleik asittir (Fraenkel ve Blewett, 1947). AA, membran fosfolipitlerinin bir hidroliz ürünüdür ve aynı zamanda hücresel etkileri başlatabilen bir sinyal molekülü olarak görev almaktadır. Bir dizi enzimin bu yağ asidini oksilipinlerin bir alt grubu olan eikosanoidlere dönüştürmesi AA'yı fizyolojik olarak önemli hale getirmektedir. Eikosanoidlerin diğer çoklu doymamış yağ asidi öncülleri ise eikozatrienoik asit, eikozapentaenoik asit, dokosatetraenoik asit ve dihomo- γ -linoleik asittir (Astarita ve ark., 2015). Bu öncüller arasında hücre membranında en çok bulunan ve eikosanoidlerin en yaygın öncüsü olarak bilinen yağ asidi ise AA'dır (Sonnweber ve ark., 2018).

AA'nın, hücre içinde birden fazla yolağın aktivasyonu sonucunda üretilebildiği bilinse de AA oluşumuna neden olan en önemli yollar Fosfolipaz A₂ (PLA₂) ve Fosfolipaz C (PLC) aktivitesi ile membran fosfolipitlerinin yıkımıdır (Boron ve Boulpaep, 2016). Serotonin, fibroblast büyüme faktörü- β , glutamat, interferon- α (IFN- α), IFN- β ve IFN- γ reseptörlerinin uyarılmasıyla aktifleşen G_{i/o} proteininin $\beta\gamma$ alt ünitesi, PLA₂'yi uyarır ve PLA₂ aktivitesiyle AA içeren fosfolipitler hidrolize olur. Başka bir yolda ise dopamin, adenosin ve noradrenalin reseptörlerinin uyarılmasıyla G_q proteinin α_q alt ünitesi aktifleşerek PLC'yi aktive eder. PLC aktivitesi ise, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatın (PIP₂) inozitol 1,4,5-trifosfat (IP₃) ve diasilgliserole (DAG) yıkımını gerçekleştirir. Ardından DAG-lipaz enzimi aktive olarak ek bir tepkimeyle DAG'den AA ve monoasilgliserol oluşumunu sağlayabilir ya da IP₃, hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunu artırarak sitozolik PLA₂ (cPLA₂) formlarından biri aracılığıyla AA oluşumunu destekleyebilir (Dennis ve ark., 2011). Bu yolların dışında farklı agonistlerin herhangi bir yolla mitojenle aktive olan protein kinazı (MAPK'yi) aktive etmesiyle de AA salınımı gerçekleşebilir (Boron ve Boulpaep, 2016). Sonuç olarak AA salınımının, hormonlar ve sitokinler dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik faktörlere cevaben doğrudan veya dolaylı

yaloklar aracılığıyla sağlanabildiği görölmektedir. Vasküler endotel ve düz kas hücre membranlarından AA salınımı ise anjiyotensin-II (Ang-II), bradikinin, katekolaminler, histamin, trombin ve kayma gerilimi (shear stres) dahil olmak üzere birçok farklı uyararla gerçekleşebilir (Chan ve Cervoni, 1986; Smith W. L., 1986; Mistry ve Nasjletti, 1988; Bos ve ark., 2004). Memeli olgun eritrositlerinde ve eritrosit öncüllerinde de çeşitli uyarılara cevaben hücre membranından AA salınımının olduğu yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve sıvı kromatografi- kütle spektrometresi (LC/MS) yöntemleriyle yapılan farklı çalışmalarla kanıtlanmıştır ve eritrositlerde aktif PLA₂ formlarının bulunduğu da tespit edilmiştir (Rocca ve ark., 2004; Wischmann ve ark., 2020).

Şekil 2.1. Araşidonik asit metabolizması. (Wang ve ark., 2021)'dan düzenlenerek Türkçeleştirilmiştir.

hücre membranındaki reseptörleri üzerinden otokrin veya parakrin etki gösteren, nanomolar düzeylerde bile güçlü etkinliği olan biyolojik olarak aktif endojen maddelerdir. Bu lipid mediyatörler vasküler düz kas kasılması, kan basıncının düzenlenmesi, böbrekte sodyum ve su atılması, enfeksiyon ve hasardan sonra gelişen inflamatuvar yanıt gibi birçok olayda rol oynamaktadır (Smith C. M., 2005; Fava ve Bonafini, 2018; Esser-von Bieren, 2019).

AA metabolizmasında siklooksijenazlar (COX), lipoksijenazlar (LOX) veya sitokrom P450 (CYP450) gibi enzimlerin aktivitesiyle farklı yollardan üç ana grupta birçok otakoid oluşmaktadır (Fahy ve ark., 2009; Alvarez ve Lorenzetti, 2021) (Şekil 2.1). Genellikle aynı hücrelerde bu lipid mediyatörleri oluşturan tüm yollar ve enzimler bulunmamaktadır. AA'nın enzimatik olmayan peroksidasyonu ile oluşan ürünler ise izoprostanlardır (Montuschi ve ark., 2004). İzoprostan sentezi, membrana bağlı AA'nın serbest radikaller tarafından otooksidasyonu ile önce araşidonil radikallerinin, sonra H₂-izoprostan endoperoksitlerin ve ardından COX metabolitlerine benzer D₂-, E₂-, F₂- izoprostan ve izotromboksanların oluşumuyla gerçekleşir (Montuschi ve ark., 2004). AA metabolizmasındaki bu paralel ürünlerin ateroskleroz, inflamasyon ve iskemi-reperfüzyon hasarında ve çeşitli hastalıklarda artmış olduğu tespit edilmiş ancak etkileşimleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır (Musiek ve ark., 2005; Cracowski ve Durand, 2006; Montuschi ve ark., 2007).

LOX yolağında 5-, 8-, 12- ve 15- LOX enzimleriyle üretilen lökotrienler, lipoksinler ve çeşitli hidroksieikozatetraenoik asitler (HETE'ler) ile CYP450 yolağında epoksijenazlar ve ω-hidroksilazlar aracılığıyla oluşan epoksitler, HETE'ler ve dihidroksieikozatrienoik asitler çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Brash, 1999; Cook ve ark., 2016; Tourdot ve Holinstat, 2017; Zhao ve ark., 2021).

2.1.1. Siklooksijenaz yolağı

AA'dan, COX yolağıyla prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlardan oluşan bir eikosanoid alt sınıfı olan dienoik prostanoidler üretilir. Prostanoidler hücrede depo edilmez ancak bir uyarana cevaben *de novo* sentezle üretilir ve hücre dışına salınırlar (Bozza ve ark., 2011). Bu lipid mediyatörlerin her biri farklı G proteinine bağlı reseptör (GPBR) aracılığıyla hücre fonksiyonlarında, kan akımının

düzenlenmesinde, inflamasyonda ve kronik hastalıkların patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır (Ricciotti ve FitzGerald, 2011; Aoki ve Narumiya, 2012).

Prostaglandin-endoperoksit sentaz veya prostaglandin G/H sentaz olarak da bilinen COX enziminin COX-1 ve COX-2 olarak iki farklı izoformu bulunmaktadır (Vane ve ark., 1998). Ayrıca insanlarda aktif olmayan COX-3 olarak adlandırılan bir siklooksijenaz izoenzimi de mevcuttur (Chandrasekharan ve ark., 2002). COX-1 birçok hücrede yapısal olarak ifade edilir ve prostanooidlerin üretilmesinde baskın olan enzimdir (Smith W. L., 1986; Griswold ve Adams, 1996; Doroudi ve ark., 2000). COX-2 seviyeleri ise sitokinler ve kayma gerilimi gibi spesifik fizyolojik veya patofizyolojik uyaranlar tarafından indüklendiğinde artar ve inflamasyon gibi durumlarda prostanooidlerin üretilmesinde daha önemli rol oynar (Smith W. L. ve ark., 1996; Doroudi ve ark., 2000). Asetilsalisilik asit, indometazin ve selekoksib gibi steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar, COX enziminin yağ asidi oksidasyonunu engelleyerek etki göstermektedir (Dannhardt ve Kiefer, 2001).

Hücrelerde COX hem siklooksijenaz hem peroksidaz etkinliği gösteren bir enzimdir. Bu enzimin siklooksijenaz etkinliğiyle AA önce PGG₂'ye dönüştürülür ardından peroksidaz etkinliğiyle de prostanooidler için merkezi ara madde olan PGH₂'ye dönüşüm katalize edilir (Needleman ve ark., 1986; Smith W. L., 1986; Bos ve ark., 2004). PGH₂ son derece kararsız bir bileşiktir ve PGH₂'nin metabolize edilerek farklı prostanooidlerin üretilmesi hücreye özgü olarak değişebilmektedir. Farklı hücre tiplerinde bu otakoidler için G-proteini ile eşleşmiş 9 farklı reseptör bulunur (Kennedy ve ark., 1982; Coleman, 1989; Hirai ve ark., 2001). Bu yolaktaki enzimlerin yokluğunda ise PGH₂'nin non-enzimatik olarak parçalanmasıyla PGE₂ ve PGD₂ oluşabilir (Shen R. F. ve Tai, 1998).

2.1.2. Prostaglandinler ve Prostaglandin

PGH₂'den endoperoksit izomeraz enzimleriyle karbon zincirinin ortasında bir siklopentan halkası bulunan prostaglandinler sentezlenir. PGH₂, endoperoksit D-izomeraz ile PGD₂'ye dönüştürülür. Daha sonra PGD₂, enzimatik olarak 11-epi-PGF_{2α}'ya veya 13,14 dihidro-15-keto-PGD₂'ye ya da non-enzimatik yolla aktif metaboliti PGJ₂'ye dönüşebilir (Fukushima, 1990). PGD₂ bir makrofaj (mast hücresi) ürünü olarak bilinmektedir ancak trombositler tarafından da az miktarda sentezlenmektedir. Prostaglandin D₂ reseptörü-1 (DP₁) ve DP₂ olmak üzere iki farklı

reseptör aracılığıyla etkinlik göstermektedir ve bu prostanoidin kan plazmasındaki yarı ömrü yaklaşık 30 dakika olarak bilinmektedir (Hirai ve ark., 2001). PGD₂'nin öne çıkan etkileri arasında trombosit agregasyonun inhibisyonu ve bazı damar yataklarında vazodilatasyon yer alır (Braune ve ark., 2020). Endoperoksit E-izomeraz ise PGH₂'nin önce PGE₂'ye metabolize olmasına ve ardından 15-dehidrojenaz ile hızla inaktif bir metaboliti olan 13,14 dihidro-15-keto-PGE₂'ye dönüştürülmesine neden olur (Gomez ve ark., 2013). Prostaglandin E₂ reseptörü-1 (EP₁), EP₂, EP₃ ve EP₄ reseptörleri üzerinden etkinlik gösterir ve dolaşım sistemindeki yarı ömrü yaklaşık 30 saniyedir. PGE₂, proinflamatuvar, hiperaljezik, bronkodilatör ve küçük kan damarlarında vazodilatör etkileriyle birlikte gastrointestinal kanalda, böbreklerde, sinir sisteminde ve uterusu da önemli rol oynamaktadır (Cipollone ve ark., 2001; Gross ve ark., 2007; Gomez ve ark., 2013; Braune ve ark., 2020).

PGH₂, endoperoksit redüktaz ile PGF_{2α}'ya indirgenebilir. PGF_{2α} aynı zamanda PGD₂ ve PGE₂'den 11- ve 9- ketoredüktaz enzimleriyle de üretilebilir (Watanabe K. ve ark., 1985). PGF_{2α}'nın yarılanma süresi bir dakikadan azdır ve enzimatik yolla daha stabil olan 15-keto-dihidro-PGF_{2α}'ya parçalanır (Basu ve ark., 1992). Bazı dokularda ise 9-hidroksiprostaglandin dehidrojenaz enzimiyle PGF_{2α}, PGE₂'ye dönüştürülebilir. Etkilerini başlıca Prostaglandin F_{2α} reseptörü (FP) üzerinden G_{α(q)} ile PLC aktivitesini artırarak IP₃ ve DAG salınımının yanı sıra hücre içi Ca⁺² artışıyla sağlar (Watanabe T. ve ark., 1994; Sugimoto ve ark., 1997). Yapılan çalışmalarda EP₃ ve Tromboksan reseptörüne (TP) de düşük afinite göstererek hücre içi IP₃ ve Ca⁺² seviyelerini artırdığı ortaya koyulmuştur (Kashiwagi ve ark., 2019). PGF_{2α}'nın gebelik olsun veya olmasın uterusu oksitosin benzeri etki yaparak tonusu artırdığı ve ritmik kasılmalara neden olduğu, bunun yanı sıra kalp dokusundaki fibroblastlar tarafından üretilerek aritmi, hipertrofi ve fibrozu indükleyebildiği ve bronkokonstriktör etkisinin olduğu bildirilmiştir. Vasküler düz kas hücrelerinde ise PGF_{2α} vazokonstriksiyonu indükleyebilir (Whittle ve ark., 1985; Rice ve ark., 2008; Yu ve ark., 2009).

Prostasiklin sentaz enzimiyle PGH₂ prostasiklin'e (PGI₂'ye) çevrilir (Moncada SRSJ ve ark., 1976). PGI₂ ise non-enzimatik hidrolizle stabil ve inaktif formu olan 6-keto-PGF_{1α}'ya dönüştürülür (Lewis ve Dollery, 1983). PGI₂'nin hızla metabolize olduğu

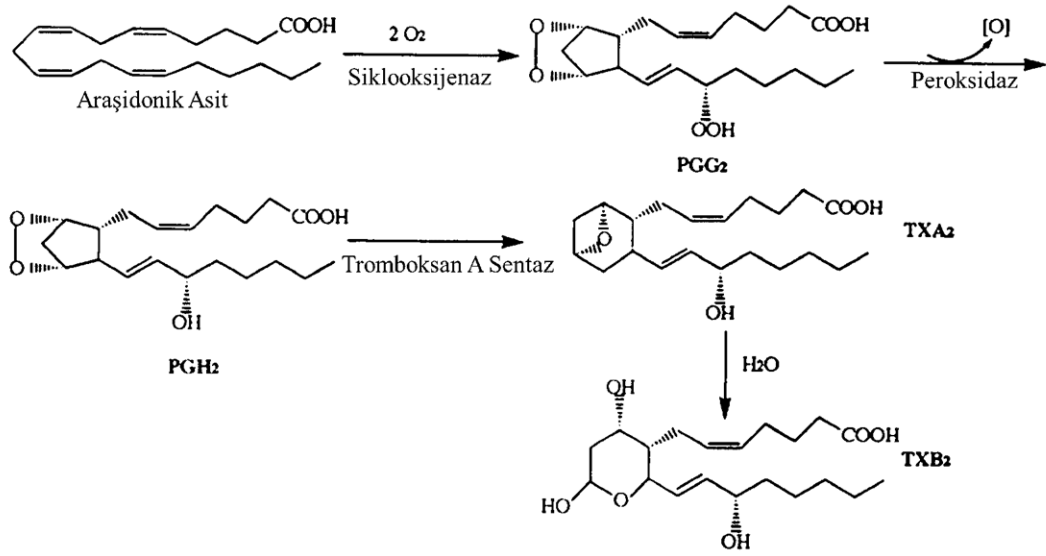
ve yarılanma ömrü yaklaşık 42 saniye olduğu bilinmektedir (Cawello ve ark., 1994). PGI₂, başlıca endotel hücrelerinde, vasküler düz kas hücrelerinde ve trombositlerde ifade edilir ve prostasiklin reseptörü (IP) üzerinden etkilerini gösterir (Chu ve ark., 2015). Sağlıklı kan damarlarında ve yüksek shear stres altında trombosit aktivasyonunu belirgin şekilde inhibe ederek antikoagülan özellikler gösterir, kan basıncını düşürür ve tüm damar yataklarında güçlü vazodilatör etki gösterir (Moncada SRSJ ve ark., 1976; Weiss ve Turitto, 1979; Adelman ve ark., 1981).

2.1.3. Tromboksan A₂

Tromboksan A₂ (TxA₂) ilk olarak 1969 yılında anafilaksi etkisi altındaki kobay akciğerlerinde gösterilmiş ve daha sonra Palmer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tavşan aortunu daraltan bir madde olarak rapor edilmiştir (Piper ve Vane, 1969; Palmer ve ark., 1970). 1973 yılına gelindiğinde ise koyun seminal veziküllerinde PG'lerin biyosentezi incelenirken, AA'nın, PG'lere dönüşmeden önce prostaglandin endoperoksitlerin (PGG₂ ve PGH₂) olduğu keşfedilmiş ve bu maddelerin trombosit agregasyonunu indüklediği bulunmuştur (Hamberg ve Samuelsson, 1973; Hamberg ve ark., 1974). Endoperoksitlerin endojen biyosentezi, AA ile indüklenen trombosit agregasyonunu açıklayamamıştır. Bununla birlikte, trombosit agregasyonunda salınan endoperoksit miktarının, daha önce tanımlanan ve tavşan aortunda kasılmaya neden olduğu gösterilen maddenin aktivitesini açıklamada yetersiz kaldığı da görülmüştür. Buradan yola çıkarak endoperoksitlerin tavşan aortunu daraltan başka bir maddeye dönüştüğü öne sürülmüştür (Hamberg ve Samuelss.B, 1974). 1975 yılında yapılan bir çalışmayla da literatürde ilk defa PGG₂ veya PGH₂'nin insan trombositleriyle inkübasyonu, TxA₂ olduğu kanıtlanmıştır. Bu lipid mediyatör güçlü bir vazokonstriktör olmasının yanı sıra trombosit agregasyonunun da güçlü bir uyarıcısı olduğu için "Tromboksan A₂" olarak tanımlanmıştır (Hamberg ve ark., 1975).

TxA₂ hızlıca, non-enzimatik bir reaksiyonla stabil fakat biyolojik olarak inaktif olan tromboksan B₂'ye (TxB₂'ye) dönüşür. TxB₂ ise kısmen 2,3-dinor-TxB₂'ye dönüştürülür ve böbreklerden itrah edilir. İdrardaki 2,3-dinor-TxB₂ ölçümü TxA₂ biyosentez hızının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. TxA₂'nin yarılanma ömrünün 32 sn olması biyolojik çalışmaları oldukça zorlaştırmıştır. Bu durum, biyolojik sıvılarda veya enzim aktivitelerinde TxB₂'ye karşı antikorların başarılı bir

şekilde geliştirilmesiyle büyük ölçüde iyileştirilmiştir (Ferraris ve ark., 1977; Tai ve Yuan, 1978).



Şekil 2. 2. Araşidonik asitten Tromboksan A₂ sentezlenmesi.

Tromboksan-A Sentaz

TxA₂, tromboksan-A sentaz (TxAS) enzimi tarafından katalizlenen izomerizasyon reaksiyonu ile PGH₂'den üretilir (Şekil 2.2). Aynı enzimin, PGH₂'nin 12-L-hidroksi-5,8,10- heptadekatrienoik asit ve malondialdehit'e bölünmesini de katalize ettiği bilinmektedir (Needleman ve ark., 1976; Haurand ve Ullrich, 1985; Shen R. F. ve Tai, 1986a). İnsanda TxAS, yaklaşık 193 kilo bazlık genomik DNA'yı içeren 13 ekzondan oluşan, 7q34-35 lokalizasyonunda yerleşik TBXAS1 geni tarafından ifade edilir (Miyata ve ark., 1994; Baek ve ark., 1996; Tazawa ve ark., 1996; Zhang L. Q. ve ark., 1997). İlgi çekici bir şekilde TBXAS1'in kromozomal konumu endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) geninin kromozomal konumuyla aynıdır. Birbirine antagonist etkili ürünleri olan bu iki genin ifadesinin koordine edilmesinde uyumlu bir regülasyon mekanizmasının olup olmadığı ise araştırılmaya devam etmektedir (Marsden ve ark., 1993).

TxAS enzimi, 533 aminoasit ile bir polipeptit zincirinden oluşur ve moleküler ağırlığı 60 kDa'dır (Ohashi ve ark., 1992). TxAS, ilk olarak trombositlerde daha sonra ise akciğer, böbrek, mide ve dalak gibi başka dokularda da varlığı kanıtlanmış olan mikrozomal bir enzimdir (Needleman ve ark., 1976; Sun ve ark., 1977). İnsan trombositlerinden (Haurand ve Ullrich, 1985) ve domuz akciğerinden (Shen R. F. ve Tai, 1986a) homojen olarak saflaştırılan bu enzim CYP450 süper ailesinin

özelliklerini sergiler ve CYP5A alt ailesinin tek üyesidir (Yokoyama ve ark., 1991; Félétou ve ark., 2011). TxAS tarafından katalize edilen reaksiyon hızlı bir şekilde gerçekleşir ve birkaç dakika içinde tamamlanır (Shen R. F. ve Tai, 1986a). Bu sebeple TxA_2 oluşumunda birincil kontrol, büyük ölçüde enzimin ve substratın varlığına bağlıdır. Mevcut veriler incelendiğinde TxAS aktivitesini düzenleyen bir endojen faktörün bulunmadığı, ancak in vitro oksidatif ajanlar ve ağır metal iyonları tarafından enzimin önemli ölçüde inhibe edildiği görülmektedir (Shen R.-F., 1985). TxAS'nin fizyolojik koşullarda hem transkripsiyonunda hem de transkripsiyon sonrası seviyelerinde çok dengeli bir düzenleme olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, epigenetik faktörler ve hücre farklılaşması da TxAS mRNA'sının ve proteininin ekspresyonunu etkileyebilir (Shen R. F. ve Tai, 1998).

TxAS'nin, yarışmalı inhibitörler tarafından katalitik inaktivasyonla geri dönüşümsüz bir şekilde inhibe edildiği ortaya koyulmuştur (Shen R. F. ve Tai, 1986a; Jones ve Fitzpatrick, 1991). UK37248 (Vermylen ve ark., 1981), UK38485 (Coker, 1984), OKY046 (Uchida ve Murao, 1981) ve OKY1581 (Feuerstein ve Ramwell, 1981) TxAS'nin güçlü inhibitörleri olarak bilinmektedir. Ancak TxAS'nin inhibe edildiği koşullarda dokuda PGH_2 birikmektedir ve bu molekül bir TxA_2 reseptör (TP) agonistidir. Bu nedenle TxAS enziminin inhibe olduğu koşullarda TP aracılı gerçekleşen reaksiyonlar tamamen inhibe olamaz (Dogne ve ark., 2002). Bu nedenle hem TxAS inhibitörü hem de TP antagonisti olan ilaçlar geliştirilmiştir (Gresele ve ark., 1991). Fakat bu ilaçlar, CYP450 enzimlerini ve NOS'u da inhibe edebildiği için spesifik değildir (Johnson ve ark., 1969). Öte yandan TxAS inhibitörleri tarafından PGI_2 üretimi de uyarılabilmektedir. TxAS'ye karşı hem monoklonal hem de poliklonal antikolar üretilmiş ve enzimin saflaştırılmasında, radyoimmün testlerde ve immünohistokimyasal boyamalar da kullanılmıştır (Shen R. F. ve Tai, 1986b; Nusing R. ve ark., 1990a; Nusing R. ve ark., 1990b).

Tromboksan A₂ Reseptörü

İnsan TxA_2 reseptör proteini ilk olarak Narumiya ve ark. tarafından trombositlerden saflaştırılmıştır (Ushikubi ve ark., 1993). Saflaştırılmış proteinin dizisi incelendiğinde TP'nin yedi transmembran segmentli bir GPBR olduğu görülmüştür. İnsan TP'si glikoprotein yapıdadır ve 19. kromozomun p13.3 lokalizasyonunda yerleşik, 3 ekzondan ve 2 introndan oluşan TBXA2R geninden ifade edilir (Nusing

R. M. ve ark., 1993). İnsan TP cDNA'sı ilk olarak plasentadan klonlanmıştır (Hirata M. ve ark., 1991). Daha sonra insan endotel hücrelerinden, sadece C-terminalinde farklılık gösteren başka bir TP cDNA'sı klonlanmıştır (Raychowdhury ve ark., 1994). Bu nedenle, iki izoform arasındaki fonksiyonel farklılık, C-terminal bölgelerindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Günümüzde, insan plasentasından klonlanan TP, TP α olarak, endotel hücrelerinden klonlanan TP ise TP β olarak adlandırılmaktadır. Sıçan ve farelerde ise insan TP α 'sına benzeyen tek bir TP bulunmaktadır.

İnsanda her iki TP alt tipi için de mRNA'lar trombositler, plasenta, vasküler düz kas hücreleri, beyin, ince bağırsak ve timus dahil olmak üzere çoğu doku ve hücrede tespit edilmiştir (Namba ve ark., 1992; Hirata T. ve ark., 1996; Miggin ve Kinsella, 1998). TP'lerin timus ve dalak başta olmak üzere akciğer, böbrek, aort, plasenta ve çeşitli dokularda ve trombositlerde ifade edildiği de ortaya koyulmuştur (Nakahata, 2008). Ayrıca TP α ve TP β 'ya ligand bağlanmasında hiçbir fark gözlenmemiştir. Yıllar içinde TP'nin hem fizyolojik hem de patolojik koşullar altında çeşitli biyolojik etkilere neden olduğu gösterilmiştir. TP'nin uyarılması, hücre iskeletini, hücre adezyonunu, motiliteyi, nükleer transkripsiyon faktörlerini, proliferasyonu ve apoptozu düzenleyen farklı sinyal kaskadlarının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Nakahata, 2008).

TP'ler diğer GPBR'ler gibi monomerik olarak fonksiyon gösterebilir veya heterodimerler oluşturarak da hücre içi sinyalleri başlatabilir. TP α ve TP β 'nın heterodimer oluşturmasıyla TP aracılı oluşan hücre içi sinyal mekanizmasının değişebileceği gösterilmiştir (Laroche ve ark., 2005). Ayrıca hem TP α hem de TP β eksprese eden hücrelerde TP'nin IP aracılı internalizasyonu bildirilmiştir (Wilson S. J. ve ark., 2004). Yapılan çalışmalarda TP α ve TP β 'nın agonist bağlanmasının ardından hücre yüzeyindeki sayılarının azalmasına bağlı olarak veya TP'nin IP ile karşılıklı regülasyonundan sinyal iletimindeki azalmaya bağlı olarak desensitize olduğu bulunmuştur. Bu durum özellikle TxA₂- PGI₂ dengesinin vasküler homeostaz üzerindeki etkilerinin, reseptör fonksiyonlarındaki farklılıkların yanı sıra bu prostanooidlerin doku seviyelerindeki farklılıkları açısından da önemli kılmalıdır (Wilson S. J. ve ark., 2007). Yine TP'lerin, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını

uyarmak için epidermal büyüme faktörü reseptörleri gibi reseptör tirozin kinazlarla *cross-talking* yaptığı bilinmektedir (Nakahata, 2008).

Tromboksan A₂ Reseptörünün Sinyal İletimi

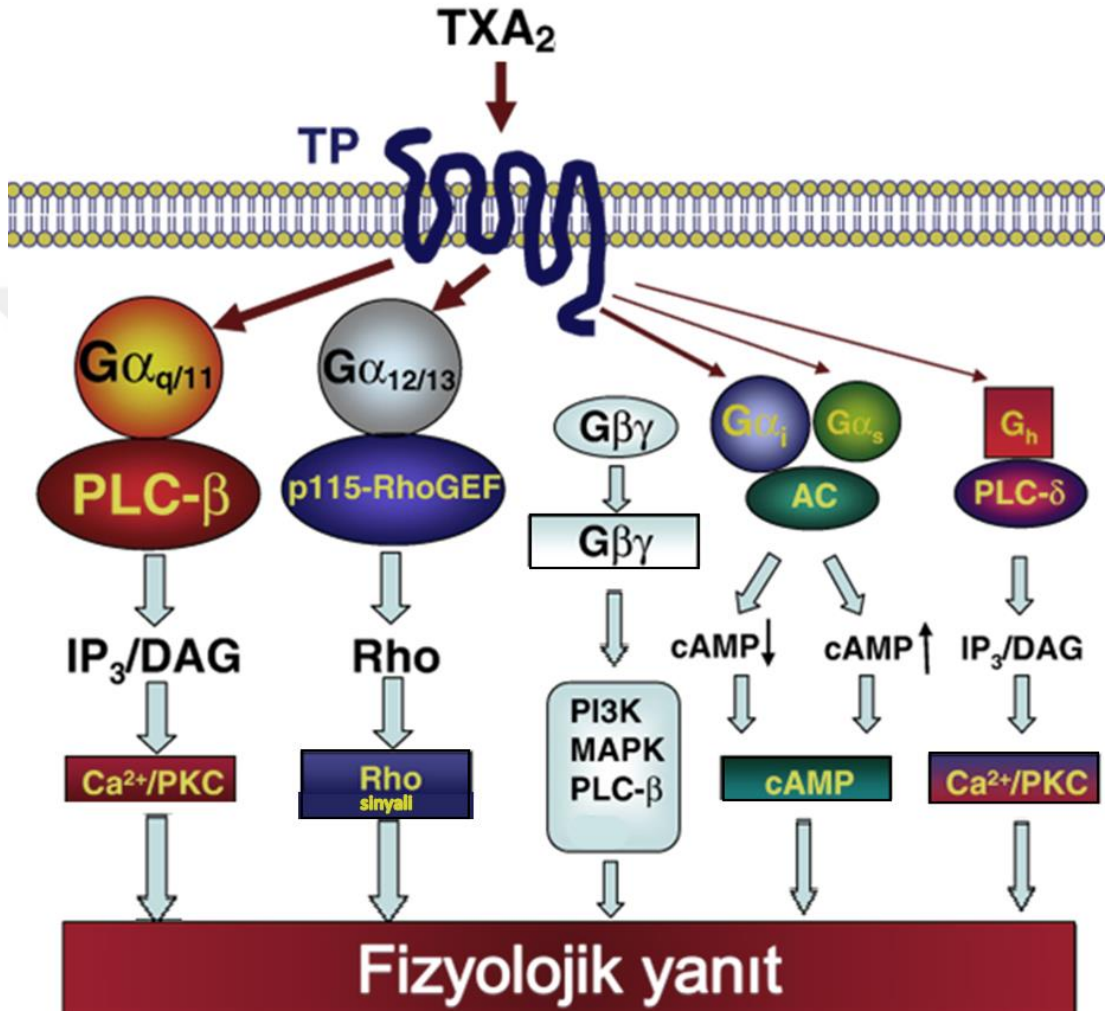
TxA₂, trombosit aktivasyonuna ve vasküler düz kas kasılmasına neden olduğu için bu konuda yapılan ilk çalışmalar TP uyarılmasının PLC yolağının aktivasyonuna neden olduğunu ve bunun da sitozolik Ca²⁺'u arttırdığını göstermiştir (Houslay ve ark., 1986; Nakahata ve ark., 1989). Ancak TP ile bu reseptöre bağlı G proteinleri hücre tipine göre değişiklik gösterebilmektedir. Çeşitli dokulardaki TP reseptörlerinin farklı ligandlara yönelik değişen afinitesi, reseptörün bağlandığı G proteininin türüyle belirlenmektedir. Allan ve arkadaşları TP afinitesinin, TP'nin G_{q/11} veya G_{12/13} ile ilişkili olduğu hücrelerde farklı olduğuna dair kanıtlar sunmuştur (Allan ve ark., 1996). TP ile bağlanan başlıca G proteinleri G_q ve G₁₃'tür. G_q ve G₁₃'ten yoksun trombositler TxA₂'ye tamamen yanıtızsızdır ve bu da G_q ve G₁₃'ün trombosit aktivasyonu için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır (Moers ve ark., 2004) (Şekil 2.3).

TP'nin G_q ailesi proteinlerle ilişkili olduğu hücrelerde, uyarıya cevaben G_q, G₁₁, G₁₅ ve G₁₆ proteinlerinin etkinleşerek PLC-β aktivasyonuna IP₃ ve DAG üretilmesine yol açtığı gösterilmiştir (Offermanns ve Simon, 1995; Kinsella ve ark., 1997). Bu durum hücre içi Ca²⁺ artışına neden olur ve sonuçta protein kinaz C'yi (PKC'yi) aktivasyonu gerçekleşir (Berridge ve Irvine, 1984; Nishizuka, 1984).

TP aracılığıyla G₁₂ ve G₁₃'ün uyarılması ise Rho aracılı sinyalizasyonun aktivasyonunu takiben Rho guanin nükleotit değişim faktörünü (RhoGEF'i) aktive eder (Kozasa ve ark., 1998). Rho sinyali, aktin düzenlenmesi, sitokinez, kasılma, hücre çoğalması, apoptozis, Na⁺ /H⁺ değiştirici ve miyozin hafif zincir fosfataz (MLCP) dahil olmak üzere çeşitli biyolojik olaylara aracılık eder (Voyno-Yasenetskaya ve ark., 1994; Hall, 1998; Harenberg ve ark., 2005). Sıçan kaudal arter düz kasının TxA₂ ile indüklenen kasılması, Ca²⁺ girişi ve G_{12/13}/Rho aracılı aktivasyonuyla gerçekleştiği tespit edilmiştir (Wilson D. P. ve ark., 2005).

TP'nin uyarılmasıyla aktive olan βγ alt üniteleri aynı zamanda fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), PLC-β2, p44/42 MAPK ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK 1/2) aktivasyonuna olur (Zhang S. ve ark., 1996; Maier ve ark., 2000). TP ile

ilişkili diğer G proteinlerinden G_i adenilil siklazı inhibe ederken G_s uyarır, her ikisi de siklik AMP (cAMP) seviyelerinde değişikliklere neden olur. Ayrıca, dimerik bir G proteini olan G_h 'de, TP aktivasyonu ile etkinleşebilir (Vezza ve ark., 1999). Bu durumda TP uyarılmasıyla PLC- δ aktive edilir (Feng ve ark., 1996) ve G_q ile benzer bir cevap oluşur (Vezza ve ark., 1999).



Şekil 2. 3. TxA_2 reseptörünün hücre içi sinyal iletim mekanizmaları. (Nakahata, 2008)'dan düzenlenerek Türkçeleştirilmiştir.

Tromboksan A₂ Reseptörünün Agonistleri ve Antagonistleri

TP agonistleriyle yapılan çalışmalarda TxA_2 , PGH_2 ve F_2 -izoprostanların TP'lere benzer afinite gösterdiği; PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 'nin ise bu reseptörlere düşük afiniteyle bağlandığı ortaya koyulmuştur. Bu zayıf bağlanmanın, TP'nin *in vivo* uyarılmasında kayda değer bir etkisinin olmadığı varsayılmaktadır. 20-HETE ve bazı izoprostanlar ise TP'nin kısmi agonistleri olarak bilinmektedir (Pugliese ve ark., 1985). TxA_2 'nin yarı ömrü çok kısa olduğu için reseptör aktivasyonunda ve diğer

biyolojik çalışmalarda I-BOP ve U46619 gibi stabil TxA_2 analogları kullanılmaktadır (Malmsten, 1976; Morinelli ve ark., 1990). TP antagonistlerine de bu reseptörlere yüksek afiniteyle bağlanan I-SAP, SQ-29548, vapiprost ve domitroban örnek verilebilir (Nakahata, 2008).

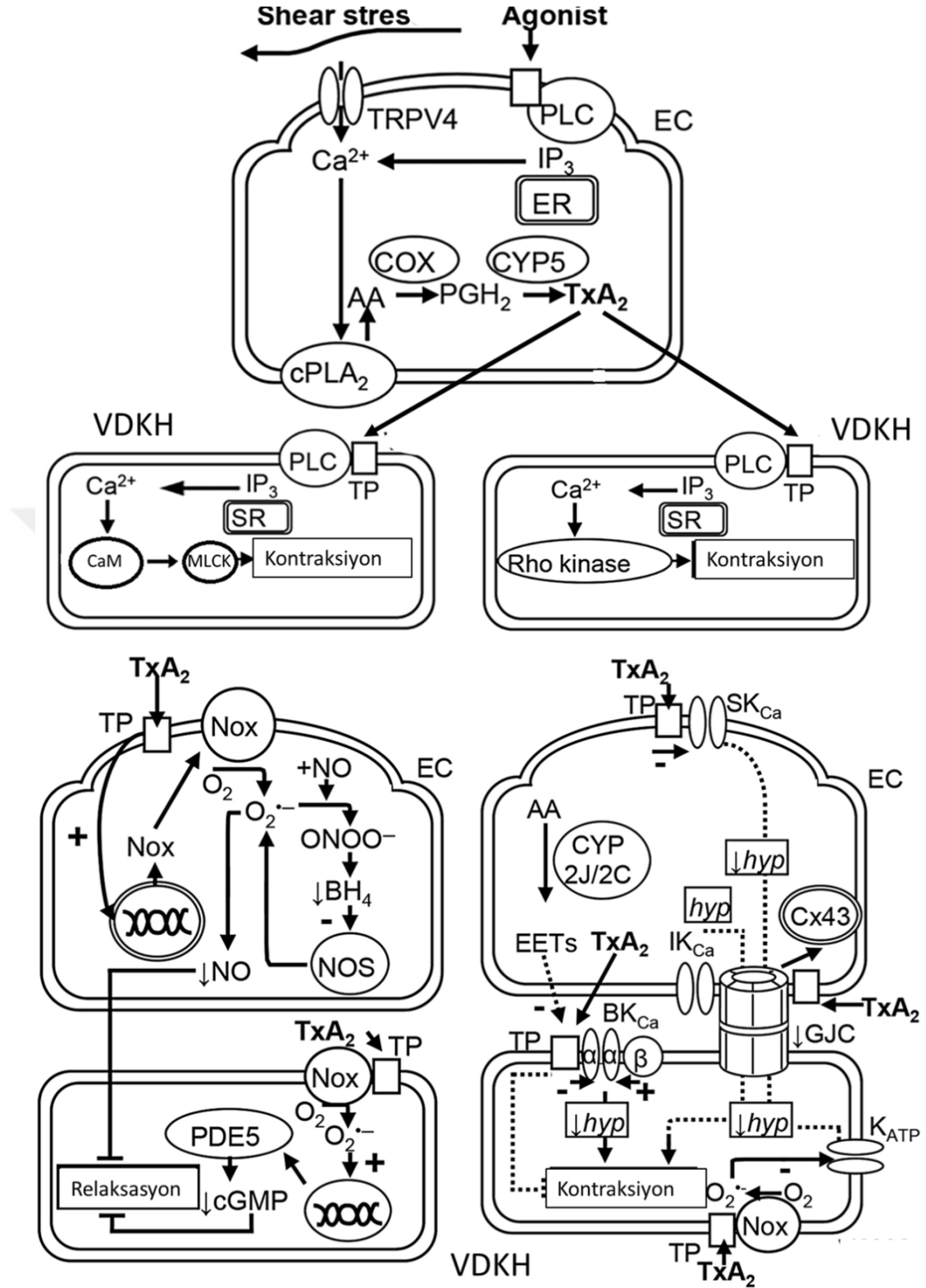
Tromboksen A₂ Reseptörü Aracılı Vazokonstriksiyon

TxA_2 , vasküler düz kastaki TP reseptörüne bağlanarak G proteinleri aracılığıyla direkt vazokonstriksiyona neden olabileceği gibi NO biyoyararlanımını, vazodilatasyonu veya hiperpolarizasyonu inhibe ederek de vasküler düz kasta kasılmaya neden olabilmektedir (Ellinsworth ve ark., 2014) (Şekil 2.4).

$G_{q/11}$ ilişkili bir TP reseptörün aktivasyonu ile $\alpha_{q/11}$ alt ünitesi PLC'yi aktive eder. PLC, PIP_2 'den IP_3 ve DAG sentezlenmesini sağlar. IP_3 , sitozolik Ca^{2+} artışına neden olur; DAG ise PKC'nin aktivasyonunu sağlar. Artan sitozolik Ca^{2+} , CaM'a bağlanır ve miyozin hafif zincir kinaz (MLCK) aktivasyonu ile düz kasta kasılma gerçekleşir (Ellinsworth ve ark., 2014).

$G_{12/13}$ ilişkili reseptöre ligandın bağlanmasıyla spesifik RhoGEF aktivasyonu gerçekleşir ve ardından Rho kinaz aktive olur. Rho kinaz, MLCP'nin inhibisyonunu MLC fosforilasyonunu gerçekleştirir ve kasılma yanıtı açığa çıkar (Tsai ve Jiang, 2006).

TxA_2 aynı zamanda endojen süperoksit radikali (O_2^-) oluşumu yoluyla da vazokonstriksiyona neden olabilir. Endoteldeki TP reseptörlerinin aktivasyonu NADPH Oksidaz-2 (NOX2), NOX4 ve Ca^{2+} 'a duyarlı NOX5'in *up-regülasyonu* yoluyla O_2^- oluşumu artırır. ROS oluşumundaki artış, PKC aktivasyonu ile reaktif azot türlerinin (RNS, peroksinitrit (ONOO^-)) üretimini de artırarak eNOS kofaktörü tetrahidrobiopterin (BH_4)'in oksidasyonuna yol açar. BH_4 'ün azalması eNOS'un ayrışmasına neden olur; bunun sonucunda eşleşemeyen (uncoupled) eNOS, ROS artışına neden olur ve NO biyoyararlanımı azalır. Diğer yandan vasküler düz kasta selektif olarak siklik guanozin monofosfatın (cGMP) hidrolize eden fosfodiesterazların ifadesi de artar. Endotelden NO salınımının azalması ve vasküler düz kasta cGMP'nin azalması vazodilatasyonu baskılar (Ellinsworth ve ark., 2014).



Şekil 2. 4. TP aracılı vazokonstriksiyon mekanizmaları. (Ellinsworth ve ark., 2014)'den düzenlenmiştir.

TP aktivasyonu endotel hücre membranındaki K_{Ca} kanallarının inhibisyonu yoluyla endotel hiperpolarizasyonunu engeller (de Wit ve Griffith, 2010). Endotel hücrelerindeki K^+ artışı özellikle miyoendotelial kavşaklardaki *gap junction*'lar

aracılığıyla düz kas hücresinde depolarizasyona neden olabilir ve vazokonstriksiyon gerçekleşir. Bu mekanizmaya ilişkin ilk kanıt sıçan mezenterik arterlerinde yapılan fonksiyonel çalışmalarla sağlanmıştır. Noradrenalinle ön kasılma yapılan arterlerde asetilkolin (ACh) aracılı vazodilatasyona hem NO hem de vasküler düz kas hiperpolarizasyonunu içeren mekanizmaların aracılık ettiği; buna karşın TxA₂ mimetiği U46619 ile benzer şekilde ön kasılma yapıldığında ise ACh aracılı vazodilatasyona yalnızca NO'nun aracılık ettiği tespit edilmiştir. Bu bulgulara dayanarak TxA₂'nin endotel kaynaklı hiperpolarizasyonun inhibisyonunda rol aldığı ortaya atılmıştır (Angel ve ark., 1987).

Tromboksan A₂'nin Fizyolojik ve/veya Patofizyolojik Roller

TxA₂, Ang-II'ye verilen dipsojenik yanıtta, fetal adrenokortikotropik hormon artışına ve periferik adrenal katekolamin salgılanmasına katkıda bulunmaktadır (Wood C. E. ve ark., 1993; Murakami ve ark., 1998; Kitiyakara ve ark., 2002; Yalcin ve ark., 2006). Astrositler, TP eksprese eder ve TP aktivasyonu interlökin-6 salgılanmasına neden olmaktadır (Obara ve ark., 2005). Oligodendrositler de TP eksprese eder (Blackman ve ark., 1998), TP aktivasyonu bu hücrelerde proliferasyonda rol oynamaktadır. TxA₂ periferik duysal nöronları uyarak pulmoner ve kardiyovasküler refleksleri ortaya çıkarabilir (Karla ve ark., 1992). Ayrıca TxA₂ nefrit ve nefrotik sendromda rol oynar. Mezengial hücrelerde TP uyarılması kasılmaya neden olur, hücre proliferasyonunu uyarır, iyon akışlarının yönünü değiştirir; fibronektin, laminin, kollajen, doku plazminojen aktivatörü ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1'in mRNA seviyelerini artmasına neden olur (Spurney ve ark., 1991). TxA₂'nin astım, rinit ve atopik dermatitte alerjik tepkilerinde etkili olduğu yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Tanaka ve ark., 1998). Alerjik hastalıkların temel patofizyolojisi olan alerjik inflamasyonda ve çeşitli dokulardaki inflamatuvar süreçlerde TxA₂ yer almaktadır (Martin W., 1984). Yapılan bir çalışmada da TxA₂'nin inflamatuvar taşikardiye neden olduğu gösterilmiştir (Takayama ve ark., 2005). TxA₂, CD4+/CD8+ hücrelerinin apoptozunu ve DNA hasarını uyarmaktadır (Ushikubi ve ark., 1993). TP reseptörü bulunmayan fareler kullanılarak yapılan deneylerde TxA₂'nin doğal katil T hücrelerinin kemokinezini indüklediği, dendritik hücre- T hücre adezyonunu bozduğu, T hücrelerinin dendritik hücreye bağlı proliferasyonunu engellediği ortaya koyulmuştur. TxA₂, koroner arter vasküler düz kas hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre türlerinin çoğalmasını

uyarabilmektedir. Hücrelerin TxA_2 ile indüklenen proliferasyonunda p44/42 MAPK/ERK1/2 yolağı rol oynamaktadır (Morinelli ve ark., 1994). Ayrıca inflamasyon bölgelerinde ve diyabetik hastaların arterlerinde olduğu gibi akut veya kronik oksidatif strese maruz kalan dokularda yüksek miktarda izoprostanlar oluşur ve TP aktivasyonu ile etki ederek arteriyel inflamasyonu ve düz kas proliferasyonunu uyartabilir (Chan ve Cervoni, 1986).

Endojen testosteronun dişi tip-2 diyabetik sıçanlarda TxA_2 mimetiği U46619'a cevaben gelişen vazokonstriksiyon yanıtlarına katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Keung ve ark., 2005). 17β -estradiol, domuz koroner arterlerinde U46619 kaynaklı kasılmayı akut olarak azaltmıştır. Cinsiyet hormonlarının etkileri prostaglandinlerin, özellikle TxA_2 ve PGI_2 'nin üretimiyle ilişkili olabilir (Martorell ve ark., 2008). Erkek cinsiyet hormonlarının yoksunluğunda, sıçan aortunda ACh tarafından indüklenen TxA_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve PGE_2 salınımını ve endotel kaynaklı olmayan TxA_2 salınımını arttırdığı gösterilmiştir (del Campo ve ark., 2008). COX-2'den türetilen TxA_2 salınımı, yaşlı sıçanlarda aortta NO biyoyararlanımının azalmasından sorumlu olabilmektedir (de Sotomayor ve ark., 2005). COX-2 inhibitörleriyle yapılan akut ve kronik tedavi, yaşlı ve obez sıçanların mezenterik direnç arterlerinde ACh aracılı gevşeme yanıtlarını normalleştirmiştir. Vazopressin ile uyarılan TxA_2 üretimi hem yaş hem de östrojen replasmanı ile artırılmıştır (Deer ve Stallone, 2016).

• Düz Kas Hücreleri

TP reseptörlerinin aktivasyonu hem kontraksiyonun uyarılması ve hem de vazodilatasyonun inhibisyonu olmak üzere ikili etkiyle damar tonusunu arttırmaktadır (Ellinsworth ve ark., 2014). Böylece TxA_2 damar yataklarında Ang-II'nin etkisinden bile daha güçlü bir vazokonstriksiyona neden olmaktadır (Yamamoto ve ark., 1995). TxA_2 'nin hipertansiyon patofizyolojisindeki rolü de bu temele dayandırılmaktadır (Liel ve ark., 1993). Ayrıca TxA_2 'nin bronşiyal düz kaslar, bağırsak düz kasları, uterus ve mesane düz kasları gibi çeşitli düz kaslarda da kasılmaya neden olduğu bilinmektedir (Wilhelmsson ve ark., 1981; Devillier ve Bessard, 1997; Palea ve ark., 1998; Schultheiss ve Diener, 1999). TxA_2 , vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu ve hipertrofisini de uyarmaktadır (Quest ve Wilson, 1998; Ashton ve ark., 2004). Astım patofizyolojisinde TxA_2 , bronşiyal düz kas kasılmasında, bronşiyal kas hiperplazisinde ve hava yolu yeniden

şekillenmesinde rol oynamaktadır ve TP antagonistleri varlığında iyileşme olduğu tespit edilmiştir (Martin C. ve ark., 2001; Vignola ve ark., 2003).

● Trombositler

TxA₂'nin önemli fizyolojik/patofizyolojik etkilerinden biri de trombosit aktivasyonu olup trombositlerde şekil değişikliğine, degranülasyona ve agregasyona yol açarak trombüs oluşumuna neden olmaktadır (Ally ve Horrobin, 1980; Katugampola ve Davenport, 2001). TxA₂'nin aracılığıyla oluşan trombüs bazen akut miyokard enfarktüsü ve serebral enfarktüse neden olabilir. TxAS inhibitörleri ve/veya TP antagonistleri ile bu durumlar önlenebilmektedir (Hiraku ve ark., 1986; Katugampola ve Davenport, 2001). Trombositleri TxA₂'ye yanıt vermeyen, TP geninde mutasyon olan veya trombosit kaynaklı TxA₂ eksikliği olan hastalarda hemostatik bozukluklar olduğu birçok çalışmayla kanıtlanmıştır (Mestel ve ark., 1980; Hirata T. ve ark., 1994; Shen R. F. ve Tai, 1998).

● Endotel Hücreleri

Vasküler endotelde TP'lerin varlığı, TxA₂'nin bu reseptörlere bağlanması ve endotel bağımlı vazodilatör maddelerin TxA₂ uyarısıyla salınımı yapılan çalışmalarla açığa çıkarılmıştır (Houston ve ark., 1986; Hanasaki ve ark., 1988; Sung ve ark., 1989; Folger ve ark., 1991). Ayrıca TxA₂ endotel hücrelerinde, hücreler arası adezyon molekülü-1, vasküler hücre adezyon molekülü-1 ve endotelial lökosit adezyon molekülü-1 gibi adezyon proteinlerinin yüzey ekspresyonuyla da ilişkilidir (Ishizuka ve ark., 1998). TxA₂ aynı zamanda mikrovasküler endotel hücrelerin göçünde ve anjiyogeneze rol oynamaktadır (Daniel ve ark., 1999). Buna ek olarak, TxA₂ kanser hücrelerinin metastazında da etkilidir. TxA₂, tümör nekroz faktörü- α tarafından indüklenen lökosit adezyon molekülü ekspresyonunu azaltmıştır. Aynı zamanda TxA₂, negatif feedback olarak endotelden vazodilatör PGI₂ üretilmesini uyarabilir (Hunt ve ark., 1992). TxA₂, tümör büyümesi ve kronik inflamasyon sırasında anjiyogenezin modüle edilmesinde de rol oynar. Vasküler endotelial büyüme faktörü, TxA₂'nin aracılık ettiği endotelial hücre göçünü uyarır (Ashton ve Ware, 2004).

• Kan Basıncının Regülasyonu ve Kardiyovasküler Sistem

TxA₂, trombosit agregasyonu, vazokonstriksiyon ve proliferasyon üzerindeki etkileriyle kan basıncının regülasyonunda ve çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda çok önemli bir rol oynamaktadır (Sellers ve Stallone, 2008).

Hayvan modeli çalışmalarında, TP reseptör aktivasyonunun kalp hızında artışa ve vasküler düz kas hücrelerinde kasılmaya neden olduğunu gösterilmiştir. Bu nedenle TxA₂ ve analogları kardiyak aritmileri tetiklemek ve miyokardiyal iskemi oluşturmak için de kullanılabilir. TP geni susturulmuş farelerin, TP agonisti U46619 veya TxA₂ öncüsü AA infüzyonunun neden olduğu kardiyojenik şoka dirençli olduğu görülmüştür (Chen, 2018).

Hipertansiyon, diyabet, aterogenez ve diğer kardiyovasküler hastalıklarda yükselen vazokonstriksiyon yanıtları, COX veya TxAS inhibisyonu ya da TP'ler antagonize edilerek önemli ölçüde azaltılmıştır. Dolayısıyla TxA₂'nin biyoyararlanımının ve/veya etkisinin inhibisyonu, bu hastalıkların önlenmesi için terapötik hedefler olabilir (Sellers ve Stallone, 2008).

Luscher ve Vanhoutte, spontan hipertansif sıçanların (SHR'lerin) torasik aortalarında ACh'nin endotel bağımlı kasılmalara neden olduğunu ve bu kasılmaların non-selektif COX inhibitörü olan indometazin varlığında normalleştiğini bulmuştur (Luscher ve Vanhoutte, 1986). Burada, endotel kaynaklı kasılma faktörlerinin, COX kaynaklı prostanoidler olabileceği öne sürülmüştür ve endotel hücrelerinin, NO ve prostanoidler arasındaki dengeyi kontrol ederek vasküler tonusu koruyabileceği ortaya atılmıştır. Hipertansiyon patofizyolojisindeki endotelial disfonksiyon ele alındığında ROS artışı da oldukça öne çıkmaktadır. H₂O₂'nin, SHR'lerin mezenterik arterlerinde kontrole göre daha yüksek TxA₂ üretimini ve vazokonstriksiyonu tetiklediği görülmüştür. TxA₂ aracılı vasküler kasılma yanıtları, Rho kinaz inhibisyonu ve ROS süpürülmesiyle önemli ölçüde azalmıştır (Garcia-Redondo ve ark., 2015). Ayrıca bu hayvanlarda Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) *up-regülasyonu*, COX-2 ifadesini indükleyerek TxA₂ üretimini artırabilir. TLR4 inhibisyonu, SHR'lerin mezenterik arterlerinde kan basıncını, vazokonstriksiyonu ve TxA₂ salınımını azaltmıştır (Bomfim ve ark., 2012). Ang-II infüze edilen farelerle yapılan başka bir çalışmada ise anti-TLR4 antikor tedavisinin aortada fenilefrin ve ACh aracılı vasküler yanıtları ve kan basıncını düzelttiği gösterilmiştir (Hernanz ve ark.,

2015). Ancak hipertansiyonda artan vazokonstriktif yanıtın TxA₂ salınımının doğrudan bir sonucu olup olmadığı hala tartışmalıdır.

Ateroskleroz, kan ile arter duvarı arasındaki karmaşık etkileşimleri içeren ve çok sayıda faktörden etkilenen kronik bir damar hastalığıdır. TxA₂ ve F₂-izoprostanların yanı sıra PGI₂'nin de trombosit aktivasyonu ve lökosit-endotel hücre etkileşimini kontrol yoluyla aterogenezin başlamasında ve ilerlemesinde rolü olduğu bilinmektedir (Kobayashi ve ark., 1997). Endotel disfonksiyonu, aterogenez gelişiminin bir işaretidir. TxAS inhibitörü ve TP reseptör antagonisti olan BM-573 ile tedavi, ApoE^{-/-} farelerinde mezenterik arterlerde ACh aracılı vazodilatasyonu iyileştirmiştir. eNOS/NO sinyali BM-573'ün koruyucu etkilerinin altında yatan önemli bir mekanizma olabilir. Daha şiddetli aortik ateroskleroz, dişi ApoE^{-/-} farelerde erkeklere kıyasla 15 kat daha yüksek TxA₂ üretimiyle bağlantılı bulunmuştur (Smith D. D. ve ark., 2010). Her ne kadar idrar ve makrofaj TxA₂ metabolitlerinin seviyeleri kontrol farelerine kıyasla önemli ölçüde azalmış olsa da COX-1 geninin kemik iliğinden silinmesi ApoE^{-/-} alıcı farelerde erken aterosklerotik lezyon oluşumunu hızlandırmıştır (Babaev ve ark., 2006).

Kardiyovasküler sistemi etkileyen başlıca prostanoidler PGI₂ ve TxA₂'dir. Bu mediyatörlerin vasküler endotelial hücreler ve trombositler tarafından üretildiği bilinmektedir. PGI₂ ve TxA₂ fonksiyonel antagonistlerdir, yani belirli bir hücre veya doku üzerinde zıt etkiler göstermektedirler (Wang ve ark., 2021). Bu mediyatörlerin üretimlerindeki denge vasküler homeostazın sürdürülmesi için önemlidir. PGI₂ üretiminden TxA₂ üretimine doğru bir kayma, çeşitli trombotik hastalıkların gelişimine katkıda bulunmaktadır. Her iki prostanoid in de kardiyak iskemi ve reperfüzyon sırasında önemli ölçüde arttığı görülmüştür. PGI₂ ve analoglarının *in vivo* kardiyak reperfüzyon hasarını hafiflettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Benzer şekilde, TxAS inhibitörleri ve/veya TP antagonistleri de deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda miyokard enfarktüsü boyutunu azaltmaktadır (Baturova ve ark., 2016).

TxA₂'nin pulmoner arteriyel hipertansiyon ve preeklampsi gibi hastalıkların patofizyolojisinde de rol oynadığı öne sürülmüştür (Farrukh ve ark., 1985; Fitzgerald ve ark., 1990). Gebe sıçanlarda yapılan çalışmalarda mezenterik arterlerde TxA₂ miktarının gestasyonel hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek

olduğu ve TxA_2 'nin kendi reseptörleri üzerinden kasılmaya neden olabildiği gibi, endotelin-1 aracılığıyla da kasılma yanıtlarını potansiyelize ettiği gösterilmiştir. Preeklampsi hastalarıyla yapılan çalışmalarda ise serum ve idrar örneklerinde TxB_2 'nin kontrol bireylerine göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu bildirilmiştir (Chavarria ve Reyes, 2004). Ayrıca preeklampsi hastalarından alınan omental arter örneklerinde TxAS ekspresyonunun kontrole göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Mousa ve ark., 2012a; Mousa ve ark., 2012b).

COX-1 kaynaklı TxA_2 'nin düşük doz aspirin ile geri dönüşümsüz inhibisyonu, vasküler trombotik olaylara karşı profilaksi sağlar ve bu da TxA_2 'nin kardiyovasküler hastalıkta bir trombosit agonisti olarak merkezi rolünün altını çizer. Bununla birlikte, COX-1 inhibitörlerinin gastrointestinal kanama gibi yan etkilerle korelasyonları vardır. Dolayısıyla, TxA_2 'nin fizyolojik/patofizyolojik durumların düzenlenmesindeki rolünü gösteren çeşitli biyolojik eylemleri vardır ve TxA_2 işlevini etkileyen TP antagonistleri ve TxAS inhibitörleri bu patofizyolojik durumların tedavisinde ve önlenmesinde potansiyel terapötik hedefler haline gelmiştir (Nakahata, 2008).

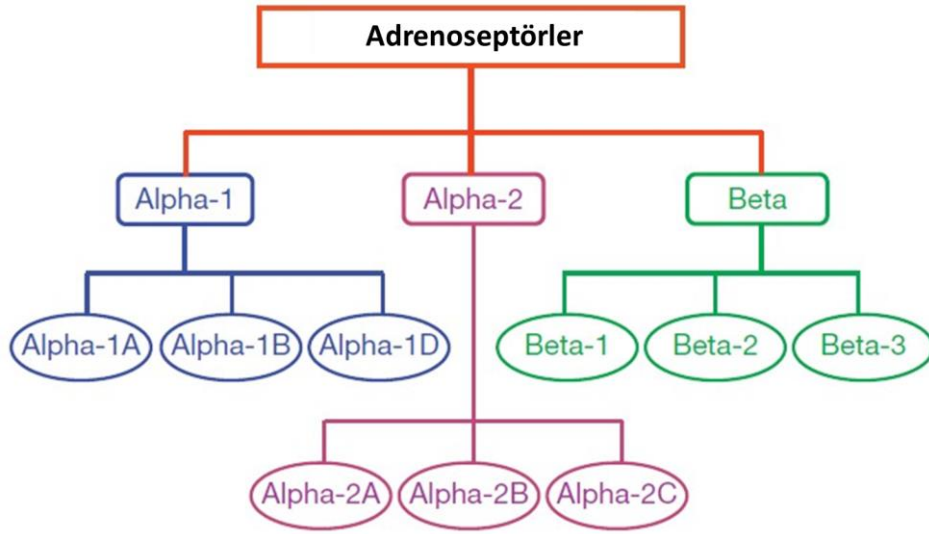
2.2. Adrenoseptörler

Adrenoseptörler (AR'ler), katekolaminlerin ve çeşitli ekzojen agonistlerin yanıtlarına aracılık eden iki tür reseptör ailesinden (α ve β) oluşmaktadır. Vasküler sistemde, her biri farklı derecelerde norepinefrin ve epinefrin tarafından uyarılan AR alt tipleri bulunmaktadır (Hieble ve ark., 1995; Fredriksson ve ark., 2003). Kan damarlarının kasılma yanıtlarında α_1 ve gevşeme yanıtlarında β_2 AR alt tiplerinin klinik olarak önemli olduğu bilinmektedir (Boron ve Boulpaep, 2016). Damarlarda bulunan α_1 reseptörlere norepinefrin epinefrinden daha yüksek afiniteyle bağlanmakla beraber her ikisi de bu reseptörlere bağlanabilmektedir. Fenilefrin ise normal fizyolojik fonksiyona uygun sempatik etkileri gösteren, katekolamin olmayan sentetik bir maddedir ve etkisini sadece efektör organlardaki postsinaptik α_1 -AR'leri etkileyerek gösterir (Mycek ve ark., 1998). Ayrıca fenilefrinin düşük afiniteyle β -AR'lere bağlandığını bildiren çalışmalar da mevcuttur. Damar düz kasında α_1 -AR'lere bağlanarak G_q proteinini etkinleştiren fenilefrin, PLC aktivasyonu ile fosfatidilinozitolenden, IP_3 ve DAG sentezlenmesini sağlar. Bu olaylar sonucu vasküler düz kas hücrelerinde hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu artar ve kasılma gerçekleşir.

α_1 -AR'lerin, üç alt tipi tanımlanmış olmakla birlikte bunların tamamı GPBR ailesinin üyesidir (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) (Şekil 2.5). Bu reseptörler pek çok dokuda ve özellikle kasılmaya aracılık ettikleri düz kasta eksprese edilmektedir (Hieble ve ark., 1995) (Bylund ve ark., 1994). Tüm alt tipler, $G_{q/11}$ protein ailesi yoluyla PLC'yi aktive ettikten sonra, depolarda bulunan Ca^{2+} 'un serbestlenmesine neden olarak ve PKC'yi aktive ederek fizyolojik yanıtın oluşmasını sağlar. Bu reseptörlerin aktivasyonu ile çeşitli hücrelerde AA salınımı gerçekleştiği ve ayrıca diğer ikincil haberci yollarının da aktive edilebildiği bilinmektedir (Ruan ve ark., 1998; Ben Cheikh ve ark., 2002; Schlachetzki ve ark., 2010; Hennenberg ve ark., 2014; Yuui ve ark., 2022). α_1 -AR'ler birçok hücrede MAPK'yi de aktive eder ve bu yanıtların bazıları Ca^{2+} ve PKC'den bağımsız olarak küçük G proteinleri ve tirozin kinazlar aracılığıyla gerçekleşebilir.

α_1 -AR'lerin, özellikle damar düz kasının kasılmasında, hem lokal vazokonstriksiyonda hem de kan basıncının kontrolünde uyarıcı reseptörler olarak fonksiyonu vardır. α_1 -AR ailesi, kan basıncının kontrolündeki önemli rolü nedeniyle özellikle terapötik açıdan önemlidir (Piascik ve ark., 1990a; Piascik ve ark., 1990b; Bylund ve ark., 1994; Minneman ve Esbenshade, 1994). α_1 -AR antagonistleri hipertansiyonda kan basıncını düşürür ancak yaygın olarak kullanılmaz. α_1 -AR agonistleri ise hipotansiyonu tedavi etmek için kullanılabilir. Aynı zamanda α_1 -AR agonistleri şok durumlarında kan basıncını yükseltmek için kullanılan ilaçlardır (Colling ve ark., 2018; Jentzer ve ark., 2018). Hipotansiyonu tedavisi için en çok kullanılan α_1 -AR agonistleri noradrenalin, adrenalin, dopamin ve fenilefrindir. Septik şokta, mevcut vazokonstriktörlerle hipotansiyonun tersine çevrilmesi sınırlıdır, çünkü tedavi devam ettikçe vazokonstriksiyon azalır, bu da yetersiz kan perfüzyonu ve hayati organ yetmezliği ile sonuçlanır. Deneysel hayvan ve insan çalışmaları, preeklampside meydana gelen sempatik sinir sistemi aktivasyonunun sağlıklı gebeliğe göre daha belirgin olduğu ve serum ve idrar katekolamin konsantrasyonlarının preeklampsi koşullarında sağlıklı gebelere göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Preeklampsi koşullarında hem katekolamin konsantrasyonunun hem de katekolaminler ile uyarılan adrenerjik reseptörlerin duyarlılığının artışı olduğu yönünde genel fikir birliği sağlanmıştır (Spradley, 2019). İnsanlarda preeklampsi ve eklampside idrar norepinefrin seviyelerini ölçerek

preeklampside otonom sinir sisteminde aşırı aktivasyon olabileceğini öne sürülmüştür (Zuspan, 1977).



Şekil 2. 5. Adrenoseptörlerin alt sınıflandırması

Vasküler sistemde α_1 -AR'nin üç alt tipi de ifade edilmesine rağmen, farklı arterlerde spesifik alt tiplerin baskınlığı vardır. Bir damarda hangi α_1 -AR alt tipinin baskın olacağının sempatik innervasyon yoğunluğuna ve damar çapına bağlı olarak değiştiği gözlemlenmiştir (Stassen ve ark., 1998). α_{1A} -AR'ler, küçük çaplı mezenterik arter gibi direnç arterlerinde daha baskındır (Methven ve ark., 2009). Ayrıca renal arter ve kuyruk arterinde de yoğunlukla bulunmaktadır (Hrometz ve ark., 1999; Kamikihara ve ark., 2005). α_{1D} -AR'ler ise aorta, femoral, iliak, karotid, pulmoner ve süperior mezenterik arterler dahil olmak üzere daha az innervasyona sahip iletim tipi arterlerde daha yaygındır (Akinaga ve ark., 2019). İletim tipi arterlerde baskın olarak bulunan α_{1D} -AR'ler, damarda katekolamin duyarlılığında artışa neden olur. Ayrıca bu alt tipin aktivasyonu, kalıcı vazokonstriksiyona yol açarak, dolaşımdaki katekolamin seviyelerindeki değişiklikler sırasında damar çapındaki ani değişiklikleri önlemektedir (Akinaga ve ark., 2019).

α_1 -AR bulunmayan (knock-out) fareler üzerinde yapılan çalışmalar da çeşitli α_1 -AR alt tiplerinin kan basıncı regülasyonundaki rolü hakkında fikir vermiştir. α_{1A} -AR'den yoksun farelerde, hem kuyruk manşet ölçümünde hem de invaziv kayıttaki kan basıncında önemli bir düşüş olduğu ancak fenilefrin aracılı vazokonstriksiyon yanıtlarında değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Rokosh ve Simpson, 2002). α_{1B} -AR alt tipinin bulunmadığı farelerde ise, bazal kan basıncı üzerinde herhangi bir etki

görülmemiştir (Cavalli ve ark., 1997; Hosoda ve ark., 2005). Ancak α_{1D} -AR'den yoksun olan farelerde hem kuyruk manşeti hem de invaziv kayıt yoluyla dinlenim kan basıncında önemli bir düşüş ve hem fenilefrin hem de noradrenaline cevaben gelişen vazokonstiksiyon yanıtlarında bir düşüş olduğu bildirilmiştir (Hosoda ve ark., 2005). Sonuç olarak, α_{1D} -AR'ler daha belirgin olmak üzere hem α_{1A} - hem de α_{1D} -AR'ler akut kan basıncı kontrolünde yer almaktadır. Çeşitli hipertansiyon modellerinde de α_{1D} -AR aktivasyonu ile kan basıncındaki artış ilişkili bulunmuştur (Gisbert ve ark., 2002; Vilialobos-Molina ve Ibarra, 2005).

Literatür incelendiğinde eritrositlerde de farklı AR alt tiplerinin bulunduğu daha önce gösterildiği tespit edilmiştir. Norepinefrin ve fenilefrin gibi agonistlerle eritrositlerdeki α_1 -AR uyarılmasıyla eritrosit agregasyonunun arttığı görülmüştür (Muravyov ve Tikhomirova, 2014; Volodchenko ve ark., 2014). Eritrositlerin AR'ler aracılığıyla uyarılmasının vasküler tonusu ve kan akışını etkileyebileceği öne sürülmüştür (Muravyov ve Tikhomirova, 2014; Volodchenko ve ark., 2014). Bu etki mekanizmalarının vazoaaktif mediyatörlerin olduğu AA metabolizması üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu nedenle fenilefrinin eritrositlerde de AA yıkımına neden olan yolakları aktive etmesi olası görülmektedir. Ancak, eritrositlerin adrenerjik agonist aracılı vasküler kasılma yanıtlarında fonksiyonel bir öneme sahip olup olmadığını gösteren, mekanizmayı aydınlatacak bulgular henüz açıklığa kavuşmamıştır.

2.3. Vasküler Tonus ve Kan Basıncının Düzenlenmesinde Eritrositlerin Rolü

Vasküler tonusun fizyolojik olarak düzenlenmesinde, merkezi ve lokal kontrol mekanizmaları rol oynar. Merkezi kontrol mekanizmaları, otonom sinir sistemi aracılı kontrol ve humoral kontrol; lokal kontrol mekanizmaları ise metabolik ve miyojenik otheregölasyon, endotel aracılı kontrol ve eritrosit aracılı kontrol şeklinde özetlenebilir (Guyton ve ark., 1972; Ellsworth ve ark., 1995). Bu mekanizmalar arasından en son tanımlananı eritrosit aracılı kontroldür. Eritrositlerin vasküler tonusu nasıl düzenlediği son yirmi beş yıldır geniş çapta araştırılmaktadır. Bu araştırmalar neticesinde eritrositler tarafından belirli koşullar altında salgılanan vazoaaktif maddelerin endotel aracılı olarak veya endotelden bağımsız olarak damar düz kasında gerim değişimine neden olduğu gösterilmiştir. Dokulara oksijen

sunumunun gerçekleşmesi kan akımıyla ilişkili olduğundan eritrositler tarafından kan akımının düzenlenebiliyor olması fizyolojik açıdan büyük önem taşımaktadır.

2.3.1. Eritrosit Aracılı Vazodilatasyon

Çok sayıda çalışmada, eritrositlerin oksijen ve karbondioksit taşıyıcısı rollerine ek olarak, eritrositlerden NO veya NO biyoaktivitesine sahip moleküller ile adenosin trifosfat (ATP) salındığı gösterilmiştir (Cosby ve ark., 2003; Patel ve Gladwin, 2004; Sprague ve ark., 2009). Eritrositlerden hipoksi ve mekanik stres koşullarında salınan bu moleküller endotelden bağımsız ya da endotel aracılı mekanizmalarla damar düz kasında gevşemeye ve kan akımında artışa neden olmaktadır (Datta ve ark., 2004; Diesen ve ark., 2008; Ulker ve ark., 2013).

a) Eritrositlerden NO ya da NO biyoaktivitesine sahip moleküllerin salınımını

Eritrositlerden bu moleküllerin salınımını 3 farklı mekanizmayla gerçekleştirebilir:

I. Eritrositlerde hem sitozolde hem de membranın iç yüzünde yerleşmiş olarak bulunan eNOS enziminin aktivasyonu ile NO üretilmesi ve salınımı (Kleinbongard ve ark., 2006).

II. NO'nun biyolojik bir metaboliti olan nitritin eritrosit içine girmesiyle ksantin oksidoredüktaz veya deoksihemoglobin aracılığıyla tekrar NO'ya indirgenmesi (Gladwin, 2006).

III. Eritrositler tarafından taşınan, eritrositlerin akciğerlerde oksijen ile yüklenmeleri sırasında endotel tarafından sentezlenen NO'nun eritrosit içine girmesiyle ve oksijen ile yüklü hemoglobinin (Hb'nin) β zincirine bağlanmasıyla oluşan, S-nitrozotiyolden (SNO'dan) hipoksik koşullarda lümene NO salınımı (Jia ve ark., 1996).

Eritrositlerin eNOS ve fonksiyonel çözünür guanilil siklaz (sGC; soluble guanylyl cyclase) dahil olmak üzere NO sinyal yolunun temel unsurlarını bulundurduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Eritrositlerdeki eNOS enzimi hem aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları hem de NO üretim kapasitesi bakımından endotel hücrelerindeki özeştir (Kleinbongard ve ark., 2006). Eritrosit eNOS enziminin NO biyoyararlanımına katkısı endotel hücrelerine oldukça yakın olduğu ve bu nedenle eritrositlerin de endotel hücreleri gibi NO aracılı gerçekleşen fizyolojik ve patofizyolojik mekanizmalarda önemli roller üstlendiği kanıtlanmıştır. Bunlar

arasında fizyolojik açıdan kan basıncının, damar tonusunun düzenlenmesi, endotel fonksiyonları ile kalbin yapı ve fonksiyonlarının korunması yer alırken (Wood K. C. ve ark., 2013; Yang J. ve ark., 2013; Merx ve ark., 2014); patolojik açıdan ise hipertansiyon, miyokardial iskemi-reperfüzyon hasarı, tromboz gelişimi gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıklar bulunur (Cortese-Krott ve ark., 2012; Yang J. N. ve ark., 2018; Yang J. N. ve ark., 2023). Eritrositlerde eNOS aracılı üretilen NO'nun kan basıncının düzenlenmesinde neredeyse endotel kaynaklı NO kadar öneme sahip olduğu, yalnızca eritrosit eNOS enzimi bulunmayan farelerin hipertansif olduğu bulgusuyla kanıtlanmıştır. Ayrıca literatürde, deneysel miyokardiyal iskemi-reperfüzyon ortamında ve akut miyokard enfarktüsü geçiren hastalarda eritrositlerden salınan kardiyoprotektif faktörün eNOS'tan kaynaklandığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Sprague ve ark., 2009; Liu ve ark., 2013).

Önemli olarak, eritrosit eNOS enzimi, substratı olan L-arjinin ya da kofaktörü olan BH₄ ortamda bulunmayınca aktive olamaz ve NO yerine O₂⁻ üretir. Oluşan O₂⁻ bir taraftan lokal çevrede oksidatif stresi artırırken diğer taraftan ortamda bulunan NO'yu peroksinitrite indirgeyerek NO biyoyararlanımının azalmasına ve RNS'nin artışına neden olur. Eritrositlerde bu duruma neden olan en önemli etken ise hücre içinde arjinaz enzim aktivitesinde görülen artıştır. Arjinaz, hücre içinde L-arjininin yıkımından sorumlu bir enzimdir ve arjinaz aktivitesinin artışı, hücre içinde L-arjinin konsantrasyonlarında azalmaya katkı sağlayarak NO üretimini azaltmaktadır. Bu mekanizmanın Tip-2 diyabete bağlı gelişen endotel disfonksiyonun ve miyokardiyal iskemi sonrası reperfüzyon hasarının en önemli nedenlerinden biri olduğu kanıtlanmıştır (Yang J. ve ark., 2013; Yang J. N. ve ark., 2018; Zhou ve ark., 2018). Bu nedenlerle eritrosit eNOS enzimi, eritrosit sayısı da göz önüne alındığında plazma NO havuzuna büyük katkı sağladığı için hastalıkların patofizyolojisinde endotel hücreleri kadar önemlidir.

Diğer taraftan, anemik bireylerde plazma NO konsantrasyonunun sağlıklı bireylere göre düşük olduğu ve bunun anemi koşullarında eritrosit sayısındaki azalma ile eritrosit eNOS enzimin fonksiyonlarındaki bozulmadan köken aldığı ortaya konulmuştur (Wischmann ve ark., 2020). Anemik bireylerde eritrosit sayısındaki azalmaya ve eritrosit eNOS enzim aktivitesindeki bu düşüşe karşı, endotelial ve kardiyak eNOS enzim aktivitelerindeki artışla anemiye adaptasyon geliştiği, bu

kompanzasyonun gerçekleşemediği kişilerde ise akut koroner sendroma yatkınlık olduğu gösterilmiştir (Wischmann ve ark., 2020).

Ex vivo koşullarda yapılan ve eritrositlerin vasküler tonusa etkilerini araştıran çalışmalar, eritrositlerden salınan NO ve NO biyoaktivitesine sahip moleküllerinin önemini gözler önüne sermiştir. Farklı parsiyel oksijen basıncı içeren ortamlarda yapılan bir araştırmada tavşan torasik aort segmentleri fenilefrin aracılığıyla kasılmış ve damar gerimi platoya ulaştığı anda ortama eritrosit eklenmiştir. Bu çalışmada hipoksik koşullarda ortama eritrositlerin eklenmesiyle damar düz kasında %35 oranında gevşeme yanıtı oluşurken, normoksik koşullarda ise kasılma yanıtı geliştiği görülmüştür. Hipoksik koşullarda gözlenen gevşeme yanıtının bir cGMP inhibitörü olan 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) varlığında ise inhibe olduğu bulunmuştur (Datta ve ark., 2004). Patel ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada yine hipoksik koşullardaki ortama eritrosit eklenmesiyle gevşeme yanıtı geliştiğini bildirmiştir (Liu ve ark., 2013). Öte taraftan, Stamler ve arkadaşları ise endotel tabakası sıyrılmış ve yine hipoksik koşullarda bulunan damar segmentlerine eritrosit eklenmesiyle damar düz kas tonusunun azaldığını göstererek eritrositlerin endotelden bağımsız olarak da gevşeme yanıtına neden olduğunu savunmuştur (Diesen ve ark., 2008). Bu çalışmada araştırmacılar eritrositlerde oluşan SNO'nun, NO donörü gibi davranarak, hipoksik koşullarda NO salınımına neden olduğunu bildirmiş ve salınan NO'nun damar düz kasında gevşeme yanıtına neden olduğunu kanıtlamıştır (Diesen ve ark., 2008).

b) Eritrositlerden ATP Salınımı

Eritrositlerden ATP salınımına bağlı olarak gerçekleşen vazodilatasyon ise, literatürde hipoksik vazodilatasyonun temel mekanizmaları arasında yer almaktadır (Datta ve ark., 2004; Sprague ve ark., 2009). Eritrositlerden ATP salınımı, kan akımını düzenlemesinde eritrositlerin tanımlanan ilk rolüdür ve ilk olarak Forrester ve arkadaşları tarafından 1992 yılında yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir. Eritrositlerden plazmaya salınan ATP, parakrin yolla endotel hücreleri üzerinde bulunan purinerjik (P2Y) reseptörlere bağlanarak etkisini gösterir (Sprague ve ark., 1998). Bu reseptörler G_q proteini ile eşleşen GPBR'ler olup aktive olunca PLC'yi uyarak hücre içinde IP₃ yapımını artırırlar. Endotel hücrelerinde NO ve araşidonik asit metabolitlerinin sentezi başlar ve sentezlenen NO, düz kas hücrelerine difüze

olarak burada sGC aktivasyonu üzerinden gevşeme yanıtına neden olur [13, 48]. Eritrositlerden ATP salınımı, fizyolojik ve farmakolojik uyaranların etkisiyle, Pannexin-1 proteini, voltaj bağımlı anyon kanalları ve kistik fibrosis gen ürünü klor kanalının da yer aldığı (Sridharan ve ark., 2010; Sridharan ve ark., 2012) mekanizmalar üzerinden olabilmektedir. Düşük parsiyel oksijen basıncı ve mikrodolaşımdaki mekanik kuvvetler fizyolojik uyaranlar arasında yer alırken, β adrenerjik agonistler ise farmakolojik uyaranlar arasında yer almaktadır (Bergfeld ve Forrester, 1992; Jagger ve ark., 2001).

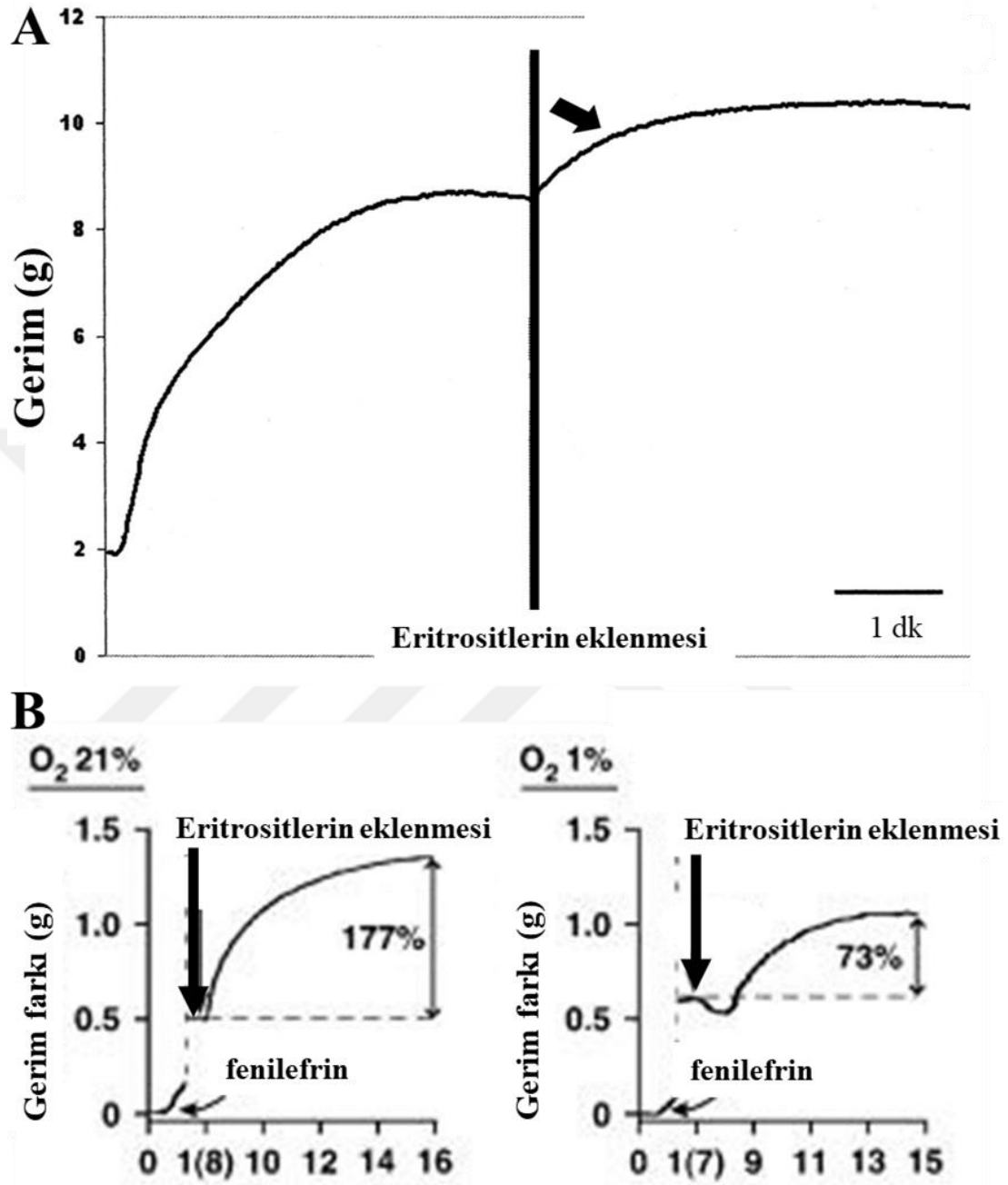
2.3.2. Eritrosit Aracılı Vazokonstriksiyon

Eritrositlerin vasküler tonusun düzenlenmesindeki rollerini araştıran çalışmaların neredeyse hepsi eritrosit aracılı vazodilatasyon mekanizmasına odaklanmıştır; eritrositlerin vazokonstriksiyon mekanizmasına aracılık edip etmediği ise bilinmemektedir. Oysa fenilefrin varlığında damar segmentlerine eritrositlerin eklenmesiyle damar tonusunun arttığını bildiren çalışmalar literatürde mevcuttur (Diesen ve ark., 2008; Liu ve ark., 2013; Ulker ve ark., 2013).

1998 yılında yapılan bir çalışmada hem normotansif Wistar-Kyoto sıçanlardan hem de spontan hipertansif sıçanlardan elde edilen aort segmentleri ve yine bu hayvanlardan elde edilen eritrositler kullanılarak vasküler kasılma yanıtları endotel varlığında ve yokluğunda incelenmiştir. Bu çalışmada eritrositlerin oluşturduğu kasılma yanıtlarına odaklanılmıştır ve damar segmentlerinde endotel sağlamlığı incelendikten sonra dinlenme periyodunun ardından, eritrositler, maksimum yanıt elde edilene kadar artan konsantrasyonlarda organ banyolarına eklenmiştir (Vedernikov ve ark., 1998). Sağlıklı ve spontan hipertansif sıçanlardan elde edilen eritrositler, sağlıklı sıçan aortunun gerimini artırmıştır; bu yanıtlar, endoteli sağlam olan aort halkalarına kıyasla endoteli sıyrılmış damar segmentlerinde önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Benzer sonuçlar spontan hipertansif sıçanlardan alınan damar segmentleriyle tekrarlanan deneylerde de bulunmuştur ve eritrositlerin neden olduğu kasılma yanıtlarının oksihemoglobin tarafından indüklendiği öne sürülmüştür.

Datta ve arkadaşları ise tavşan torasik aort segmentleriyle damar banyosuna eritrositler ekleyerek çalışmalar yapmıştır. Önce damar segmentlerine fenilefrin ile ön kasılma uygulanmış, damar gerimleri platoya ulaştığı anda ortama eritrositler eklenmiştir. Bu çalışmada fenilefrin varlığında eritrositlerin eklenmesiyle açığa çıkan

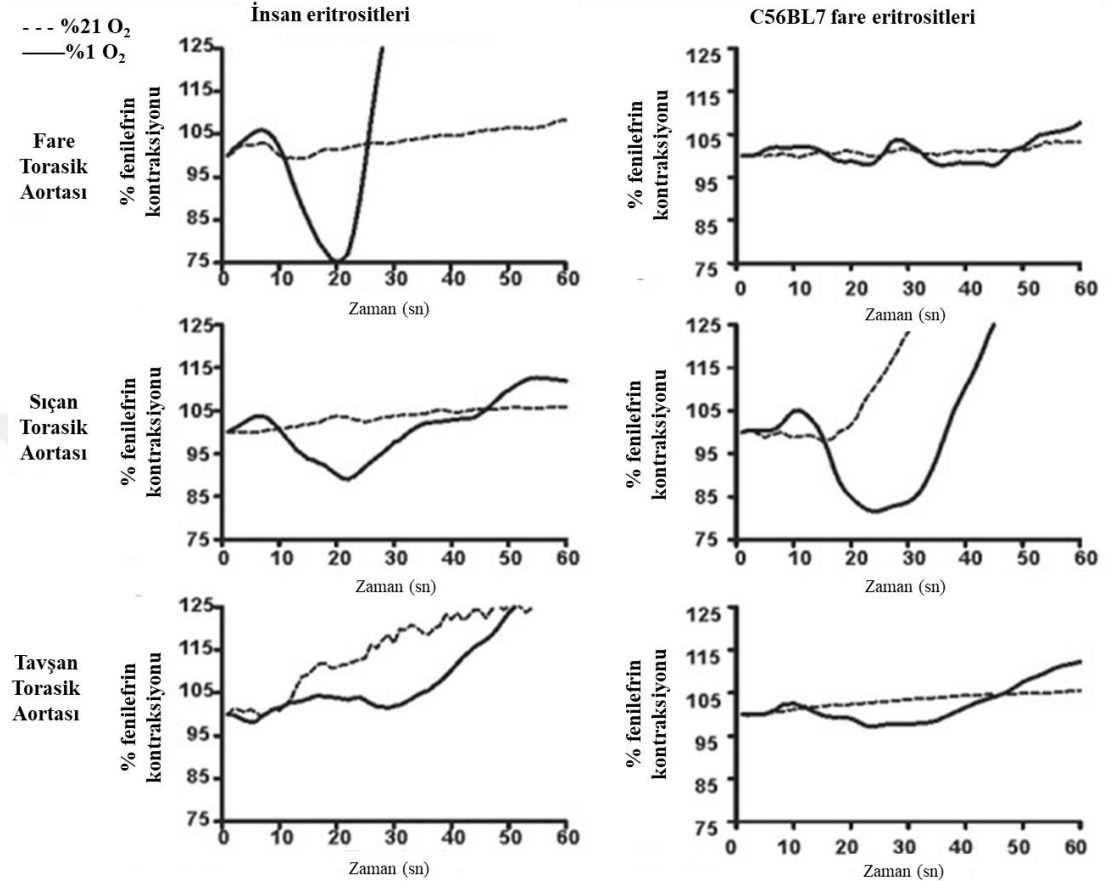
vazokonstriksiyon bulgusu değerlendirilmemiş ve bir açıklama ileriye sürülmemiştir (Datta ve ark., 2004).



Şekil 2. 6. Eritrosit aracılı vazokonstriksiyona dair literatürdeki ilk bulgular. A) (Datta ve ark., 2004). B) (Diesen ve ark., 2008).

2008 yılında yapılan bir çalışmada da hipoksik ve normoksik koşullarda damar banyolarına eritrositler eklenmiştir. Bu çalışmanın amacı hipoksik koşullardaki vazodilatasyon yanıtlarını incelemektir. Aort segmentlerine fenilefrinle ön kasılma yapılmış ve plato sırasında eritrositler eklenince hipoksik koşullarda gevşeme yanıtını takiben kasılma yanıtı alınırken normoksik koşullarda eritrositlerin

eklenmesiyle direkt kasılma yanıtı alınmıştır (Şekil 4.6B). Bu durum Hb'nin NO süpürücü etkisine veya NO/cGMP'nin bir kasılma etkisi oluşturabileceğine dair kanıtlara dayandırılmıştır (Diesen ve ark., 2008).



Şekil 2. 7. Hipoksik vazodilatasyonu araştıran bir çalışmada açığa çıkan eritrosit aracılı vazokonstriksiyon bulguları (Liu ve ark., 2013).

Liu ve arkadaşlarının eritrosit aracılı hipoksik vazodilatasyonu araştırdığı bir çalışmada farklı hayvanlardan alınan torasik aortalarda fenilefrin ile ön kasılmanın ardından ortama insan veya fare eritrositleri eklenmiş ve farklı oksijen basınçlarında incelemeler yapılmıştır. Endoteli sağlam olan bu damar segmentlerinin bulunduğu ortama eritrositlerin eklenmesiyle kasılma yanıtlarının geliştiği görülmüş fakat çalışmada sadece vazodilatasyon bulguları değerlendirilmiştir (Liu ve ark., 2013) (Şekil 2.7).

Belirtilen çalışmalarda organ banyosuna eritrosit eklenmesiyle oluşan kasılma yanıtı, Hb'nin NO süpürücüsü etkisine bağlansa da (Vedernikov ve ark., 1998; Diesen ve ark., 2008; Ulker ve ark., 2013), daha sonra yapılan araştırmalarda Hb'nin kasılmaya neden olabilmesi için plazmada serbest olarak bulunması gerektiği bildirilmiştir (Gladwin ve ark., 2012; Omar ve ark., 2015). Dolayısıyla, fenilefrin varlığında damar

banyosuna eritrosit eklenmesiyle oluşan kasılma yanıtının mekanizması henüz açıklığa kavuşturulamamıştır.

Klinik gözlemler incelendiğinde ise polisiteminin hipertansiyon için çok önemli bir risk faktörü oluşturduğu hatta polisitemisi olan kişilerin %61'inde hipertansiyon geliştiği gösterilmiş ve bu durum Gaisböck sendromu olarak literatürde yerini almıştır (Krishnamoorthy ve ark., 2018). Bu çalışma ilk olarak 1905 yılında yapılmış ardından 2018 yılında revize edilmiştir ve ilk çalışmada %49 olarak belirtilen oran %61'e yükselmiştir. Hipertansiyon patofizyolojisiyle ilişkilendirilirken polisiteminin ürik asit artışına, viskozite artışına, endotel disfonksiyonuna neden olması ve proinflamatuvar durumla ilişkili olduğu için plazma volümünün artmasında, intravasküler volüm artmasında etkili olduğundan sıkça bahsedilmiştir. Fakat hiçbir çalışmada eritrositlerin vazokonstriktör madde salgılayarak burada rol oynayabileceği dile getirilmemiştir.

Bütün bu bulgular eritrositlerin kan basıncı ve kan akımının düzenlenmesindeki aktif ve majör rollerini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Damar direnci endojen vazodilatör ve vazokonstriktör maddeler arasındaki denge ile belirlenmektedir. Eritrositlerin dolaşıma NO ve ATP salarak vazodilatasyona neden olduğu gibi vazokonstriktör madde/maddeler salgılayarak damar kasılma yanıtlarına da aracılık etmesi olası görülmektedir. Eritrositten herhangi bir vazokonstriktör mediyatörün salınımı da şüphesiz kan basıncının regülasyonunda önemli bir rol oynayacaktır. Yapılan çalışmalarda eritrositlerin ortama eklenmesiyle oluşan vazokonstriksiyon yanıtlarının ortamda fenilefrinin bulunduğu koşullarda geliştiği dikkate alındığında, eritrositlerin bu mekanizmadaki rolünde α_1 adrenoseptörlerin aktivasyonu da göz önünde bulundurulmalıdır.

2.4. Amaç ve Hipotez

Eritrositler aktif enzimatik mekanizmalar sayesinde çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde etkin rol alır. Özellikle hipoksi ve kayma gerilimi etkisiyle eritrositlerden plazmaya NO ve ATP salındığı ve bu nedenle eritrositlerin kan akımının ve kan basıncının fizyolojik koşullardaki düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu mekanizmaları açığa çıkaran çalışmalarda, hipoksik koşullarda fenilefrin ile ön kasılma uygulanan damar segmentlerine eritrositler eklenince kısa süreli vazodilatasyon yanıtının ardından vazokonstriksiyon geliştiği

bildirilmiştir. Bu deneyler normoksik koşullarda tekrarlandığında ise, ortama eritrositlerin eklenmesiyle belirgin ve kalıcı vazokonstriksiyon geliştiğine dair kanıtlar elde edilmiştir. Bu araştırmalar temel olarak eritrosit aracılı vazodilatasyona odaklanmış olup, deneylerde gözlenen kasılma yanıtları çoğunlukla değerlendirilmemiş ya da basitçe eritrosit içindeki hemoglobinin NO süpürücü etkisine bağlanmıştır (Gladwin ve ark., 2012; Omar ve ark., 2015). Oysa, hemoglobinin NO süpürücü etkisi göstermesi için plazmada serbest olması gerektiği, eritrosit içindeki hemoglobinin önemli düzeyde NO tüketimi yapamayacağı gösterilmiştir. Çalışmalarda gözlemlenen belirgin ve kalıcı vazokonstriksiyon yanıtının fenilefrin varlığında gelişmesi de oldukça ilgi çekicidir ancak bu konuda mekanizmayı aydınlatacak bir çalışma yapılmamıştır. Oysa, eritrositler de endotel hücreleri gibi plazmaya hem vazodilatör hem de vazokonstriktör etkili mediatörler salınımı yoluyla vasküler tonusun düzenlenmesinde rol oynuyor olabilir. Olgun eritrositlerin ribozomdan yoksun olması peptit yapılı mediyatörlerin burada rol oynayamayacağını göstermektedir. Fakat eritrositlerde AA metabolizmasında yer alan aktif enzimatik yollar bulunmaktadır. Bu nedenle eritrositlerin, vazokonstriktör etkili bir mediatör üretip salgılaması olasıdır. Eritrositlerden PGI_2 ve PGE_2 salındığı gösterilmiş olsa da bildiğimiz kadarıyla bugüne kadar eritrositlerden vazokonstriktör etkili mediatörlerin salınımı ve eğer salınıyorsa, fonksiyonel bir önemi olup olmadığı daha önce çalışılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, fenilefrin varlığında eritrosit aracılı gerçekleşen vazokonstriksiyonda, vazokonstriktör prostanoidler olan TxA_2 ve $PGF_{2\alpha}$ 'nın rolünün araştırılmasıdır. Bu amaçla sağlıklı Wistar sıçanlardan elde edilen aorta segmentlerinde, sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerin fenilefrin aracılı gelişen vazokonstriksiyona etkisi ve bu etkinin mekanizması araştırılmıştır. Bu kapsamda adrenoseptör antagonisti, AA metabolizmasında yer alan COX ve TxAS enzimlerinin inhibitörleri ile TP ve FP reseptör antagonistleri kullanılarak eritrositlerin sağlıklı koşullarda damar kasılma yanıtlarına etki mekanizması incelenmiştir. Bu hipotez, hem sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositler, hem de sadece Krebs solüsyonu varlığında yapılan deneylerle eritrositlerin vasküler kasılma yanıtların etkisindeki değişikliklerin izlenmesiyle sınanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyler, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş olup, çalışma kapsamında 8-10 haftalık toplam 30 adet erkek Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı (Protokol No: 2021.08.019) ile Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Bakım ve barınma süreci de aynı merkezde gerçekleşen sıçanlar, sıcaklığı $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, nem oranı ise %50-55 olan ve 12 saatlik diurnal ışık uygulanan bir odada tutulmuş, kısıtlama olmaksızın (ad libitum) ticari sıçan yemi tüketimine bırakılmıştır. Sıçanlardan elde edilen aorta segmentleriyle izole doku banyosu sisteminde çalışılmıştır. Sadece Krebs solüsyonu varlığında veya eritrosit süspansiyonu içeren koşullarda damarların fenilefrine yanıtları incelenirken bu damar segmentleri kullanılmıştır (Zhou ve ark., 2018; Mahdi ve ark., 2023). *Ex-vivo* deney prosedürleri sıçanlardan doku örnekleri alındıktan sonraki 8 saat içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Araştırma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul onayı (2021/KA EK-643 ve 2023/KA EK-533) ile sağlıklı bireylerden (n=25) gönüllülük esasıyla alınan kan örnekleriyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya 18-45 yaş arası, sigara-tütün kullanmayan, klinik patolojisi olmayan, herhangi bir hastalık için ilaç kullanmayan erkek katılımcılar dahil edilmiştir. Gönüllüler arasından hikâye ile tespit edilebilen herhangi bir sağlık sorunu olanlar veya örnek alımından 24 saat öncesine kadar ilaç kullanmış olanlar dışlanmıştır. Katılımcılardan kan örneği alınacak gün kafein içeren içecekleri tüketmemesi istenmiştir. Araştırmaya katılan gönüllülerden venöz kan örneği alma işlemi, asgari bilgilendirilmiş gönüllü olur formu okutulup imzalatıldıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Kan örnekleri antikoagülan olarak sodyum heparin (17 IU/ml) içeren vakumlu tüplere dirsek önü venlerinden alınmıştır. İşlem sırasında turnike sadece venin yerini tespit için kullanılmış ve kanın tüpe doldurulmasından önce gevşetilmiştir.

3.2. Eritrosit Süspansiyonlarının Hazırlanması

Örnekler kan alımını takiben hemen değerlendirilmiş olup *ex-vivo* prosedürlerde kullanılan her örnek üzerindeki çalışmalar kan alımını izleyen beş saat içinde

tamamlanmıştır. Kan örneklerindeki lökositler ve trombositler sodyum diatrizoat (16.7 g/dl) ve polisakkaroz (6.0 g/dl) içeren dansite gradiyenti (Histopaque 1119; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, ABD) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. 25 ml plastik tüp içine eşit hacimde konulan kan örneği ve dansite gradiyenti tabakalandırılmış, 700 g'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra dipteki eritrosit paketinin üzerinde kalan bölüm aspire edilmiştir. Aspirasyonun ardından tüpün dibinde çökmüş haldeki eritrosit paketi Krebs solüsyonuyla (119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 24 mM NaHCO₃, 1,18 mM KH₂PO₄, 1,17 mM MgSO₄.7H₂O, 2,5 mM CaCl₂ ve 11,2 mM glukoz) 3 defa yıkanmış ve yine aynı solüsyon içinde, kullanılacak deney protokolüne göre farklı hematokritlerde (%10, %25, %40 veya %55) resüspanse edilmiştir. Bu prosedür kullanılarak lökositlerin (>%99) ve trombositlerin (≥%98) başarıyla uzaklaştırıldığı daha önce doğrulanmıştır (Zhou ve ark., 2018). Bu işleme rağmen hazırlanan süspansiyonda kalmış olabilecek eritrosit dışındaki diğer kan hücrelerinin ve hücre dışı plazma bileşenlerinin sonuçlara etki etme olasılığını dışlamak için plazmayla ve son yıkamadan elde edilen süpernatantlarla da deneyler yapılmıştır.

3.3. Hayvanların Feda Edilmesi ve Damar İzolasyonu

Hayvanlar intraperitoneal tiyopental sodyum (80 mg.kg⁻¹) anestezi ile uyutulduktan sonra, abdomenleri hızla açılmış ve abdominal aortaları kesilerek kansızlaştırma yoluyla feda edilmiştir. Ardından hızlı bir şekilde torakotomi uygulanmış ve torasik aorta diğer dokulardan ayrılarak eksize edilmiştir. Hiç bekletilmeden +4°C'de Krebs solüsyonu bulunan behere alınan doku örneği +4°C Krebs solüsyonu ile yıkandıktan sonra mikrodiseksiyon aşaması için yine +4°C'de Krebs solüsyonu içeren cam petri kabına alınarak, petrinin silikon zeminine sabitlenmiştir. Torasik aorta, diseksiyon mikroskobu (SZ61, OLYMPUS; Tokyo, Japan) kullanılarak yağ ve bağ doku uzaklaştırılmak suretiyle izole edilmiştir. İzole edilen ve uygun uzunlukta (2-2,5 mm) halkalara ayrılan aorta segmentleri çalışılmak üzere damar banyosuna alınmıştır.

3.4. İzole Damarların Asılması, Dinlenme Periyodu ve Vitalizasyon Aşaması

Hazırlanan torasik aorta segmentleri; %95 O₂ - %5 CO₂ içeren gaz karışımı ile gazlandırılan, sıcaklığı 37°C ve pH'ı 7,4 olan 10 ml Krebs solüsyonunun bulunduğu damar banyosuna asılmıştır. Damar segmentleri, paslanmaz çelik teller arasına

asılarak gergin bir ipek ip aracılığı ile izometrik transdüser (FDT 1A - 10 MAY, Ankara, Türkiye) bağlanmıştır. Bu transdüserle algılanan fiziksel kuvvetler elektriksel sinyallere çevrilmektedir. Elde edilen sinyaller ise transdüser amplifikatörü (GTA0303, MAY, Ankara, Türkiye) tarafından güçlendirilerek MP150 veri toplama cihazı (BIOPAC Systems Inc., Goleta, CA, ABD) ve yazılım programı (AcqKnowledge versiyon 3.8.2) ile gram gerim cinsinden işlenerek monitörize edilmiştir.

Aorta halkaları 1 gram istirahat gerimi altında her 15 dakikada bir yıkanarak toplamda 1 saat boyunca dinlendirilmiştir. Dinlenme periyodunda yıkamalar gerçekleştirildikten sonra istirahat gerimi değişmişse, tekrar 1 gram gerime ayarlanmıştır. Dinlenme periyodu bittikten sonra aorta halkalarını içeren damar banyosuna vitalizasyon işlemi için 10 ml 20 mM KCl-Krebs konulmuş ve banyoda 10^{-7} M olacak şekilde fenilefrin (Phe) [(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride, Sigma P6126, St. Louis, USA] ilavesi yapılmıştır. Vitalizasyon işleminden sonra damarlar Krebs solüsyonu ile yıkanmış, 15 dakikada bir Krebs solüsyonunun yenilenerek 30 dakikalık ek dinlenme periyoduna geçilmiştir.

3.5. Ex-vivo Damar Banyosu Protokolleri

Damar banyoları her bir protokolden sonra 3 kere Krebs solüsyonu ile yıkanmış ve tüm ardışık protokoller arasında en az 30 dakikalık dinlenme süreleri bırakılmıştır.

3.5.1. Endotel Sağlamlığı Protokolü

Dinlenme periyodunun ardından damar segmentindeki endotel tabakasının sağlıklı olup olmadığını araştırmak için; banyolara, ön çalışmalarda yapılan Phe konsantrasyon-yanıt eğrisinden submaksimal konsantrasyon olarak belirlenen, 10^{-6} M konsantrasyonunda Phe ilave edilmiş kasılma yanıtları platoya ulaştığında ise aynı konsantrasyonda, 10^{-6} M ACh (Acetylcholine chloride, Sigma A6625, St. Louis, USA) ilavesi yapılarak, gevşeme cevabının değeri yüzde olarak hesaplanmıştır (Özen ve ark., 2018). %80 ve üzeri gevşeme cevabı veren damarlar endoteli sağlam olarak kabul edilip, %80'in altındaki damar segmentleri deney protokolünden çıkarılmıştır.

Deney protokolüne alınacak olan damarlar belirlendikten sonra damarların kasılma yanıtları aşağıdaki protokollerle incelenmiştir.

3.5.2. KCl-Krebs Aracılı Kasılma Yanıtı Protokolü

Damar banyolarına 10 ml 80 mM KCl-Krebs solüsyonu eklenip bazal koşullarda reseptörden bağımsız maksimum kasılma yanıtları elde edilmiştir. Bu protokol sonucunda damar segmentlerinin maksimum kasılma gerimleri bir internal standart oluşturmak amacıyla %100 olarak kabul edilmiştir. Phe konsantrasyonlarına yanıt olarak gelişen kasılma yanıtları 80 mM KCl-Krebs'in oluşturduğu maksimum gerimin yüzdesi şeklinde hesaplanmıştır.

3.5.3. Fenilefrin Aracılı Kasılma Yanıtı Protokolleri

Damar banyolarına farklı koşullarda Phe kümülatif olarak (10^{-9} – 3×10^{-5} M) artan konsantrasyonlarda eklenmiş ve oluşan kasılma yanıtları kaydedilmiştir. Bu verilerden yüzde kasılma yanıtları hesaplanarak konsantrasyon-yanıt eğrileri oluşturulmuştur. Daha sonra yarı maksimal etkiyi oluşturan konsantrasyon (EC_{50}) ve maksimal kasılma yanıtı (E_{max}) hesaplanmıştır.

Krebs Solüsyonu Bulunan Ortamda Phe Aracılı Kasılma Yanıtları

Damar segmentinin sadece Krebs solüsyonu varlığında Phe aracılı vazokonstriksiyon yanıtları incelenmiştir. Bu protokol ile sadece vasküler α_1 -AR'ler aracılığıyla gelişen kasılma yanıtları tespit edilmiştir.

Eritrosit Süspansiyonu Bulunan Ortamda Phe Aracılı Kasılma Yanıtları

Sağlıklı gönüllülerden elde edilen eritrositlerden oluşan farklı Hct'lerdeki (%10, %25, %40, %55) süspansiyonlar varlığında Phe aracılı vasküler kasılma yanıtları kaydedilmiştir. Bu protokolün amacı, fenilefrin uyarısına cevaben gelişen vazokonstriksiyona eritrositlerin etkisinin incelenmesidir. Bu protokolde damar banyosuna sağlıklı gönüllülerden elde edilen eritrositlerden oluşan süspansiyon eklenmiştir ve Phe kümülatif olarak (10^{-9} – 3×10^{-5} M) eklenip kasılma yanıtları kaydedilmiştir.

Plazma veya Süpernatant Bulunan Ortamda Phe Aracılı Kasılma Yanıtları

Bu protokolde ise damar banyosuna sağlıklı gönüllülerden alınan plazma veya eritrosit süspansiyonunun hazırlanması sırasında son yıkamadan elde edilen süpernatant eklenmiştir. Phe aracılı vasküler kasılma yanıtlarına eritrositlerin etkisi incelenirken, eritrosit dışındaki diğer kan hücrelerinin veya plazma bileşenlerinin sonuçları etkileme olasılığını dışlamak için planlanmıştır.

- Krebs solüsyonu ve %40 Hct'te eritrosit süspansiyonu bulunan ortamlardaki deneyler aşağıdaki koşullarda tekrarlanmıştır. Kontrol koşullarında damar segmentleri ortamda Krebs solüsyonu varlığında inkübe edilirken, deney koşullarında damarlar banyodaki eritrosit süspansiyonu ile inkübe edilmiştir. Bu protokollerden elde edilen veriler eritrosit süspansiyonu varlığında ve kontrol koşullarında kaydedilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır (Şekil 3.1).

Carvedilol varlığında Phe aracılı kasılma yanıtları

Bu deneylerde Phe aracılı kasılma yanıtları, damarların 30 dk boyunca selektif α_1 ve non-selektif β adrenoseptör antagonisti olan Carvedilol (1 ve 10 μ M) [Carvedilol, Sigma C3993, St. Louis, USA] varlığında 30 dk inkübe edilmesinden sonra kaydedilmiştir (Batenburg ve ark., 2004). Bu protokolün amacı eritrosit bulunan ortamda kontrol koşullarına göre değişen kasılma yanıtlarında eritrositlerde bulunan adrenoseptörlerin etkisini araştırmaktır.

İndometazin varlığında Phe aracılı kasılma yanıtları

Bu protokolde Phe aracılı kasılma yanıtı protokolü damar banyosunda 20 dk boyunca non-selektif COX inhibitörü olan İndometazin (10 μ M) [1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indoleacetic acid, Sigma I8280 St. Louis, USA] varlığında inkübasyonunun ardından uygulanmıştır (Huang ve ark., 2019). Bu protokolün amacı eritrositlerin kasılma yanıtları üzerindeki etkisinde prostanoitlerin rolünü araştırmaktır.

Dazoxiben varlığında Phe aracılı kasılma yanıtları

Bu deneylerde damar banyosuna TxAS enziminin inhibitörü Dazoxiben (100 μ M) [4-(2-(1H-İmidazol-1-yl)ethoxy)benzoic acid hydrochloride, Ambeed A1228336, Arlington Hts, IL, ABD] eklenmiş ve 30 dk inkübasyonun ardından Phe aracılı kasılma yanıtı protokolü uygulanmıştır (Vermylen ve ark., 1981; Pfister ve ark., 2011). Bu protokolün amacı ise eritrositlerin kasılma yanıtlarına katkısında Tx_{A2}'nin rolünün spesifik olarak araştırılmasıdır.

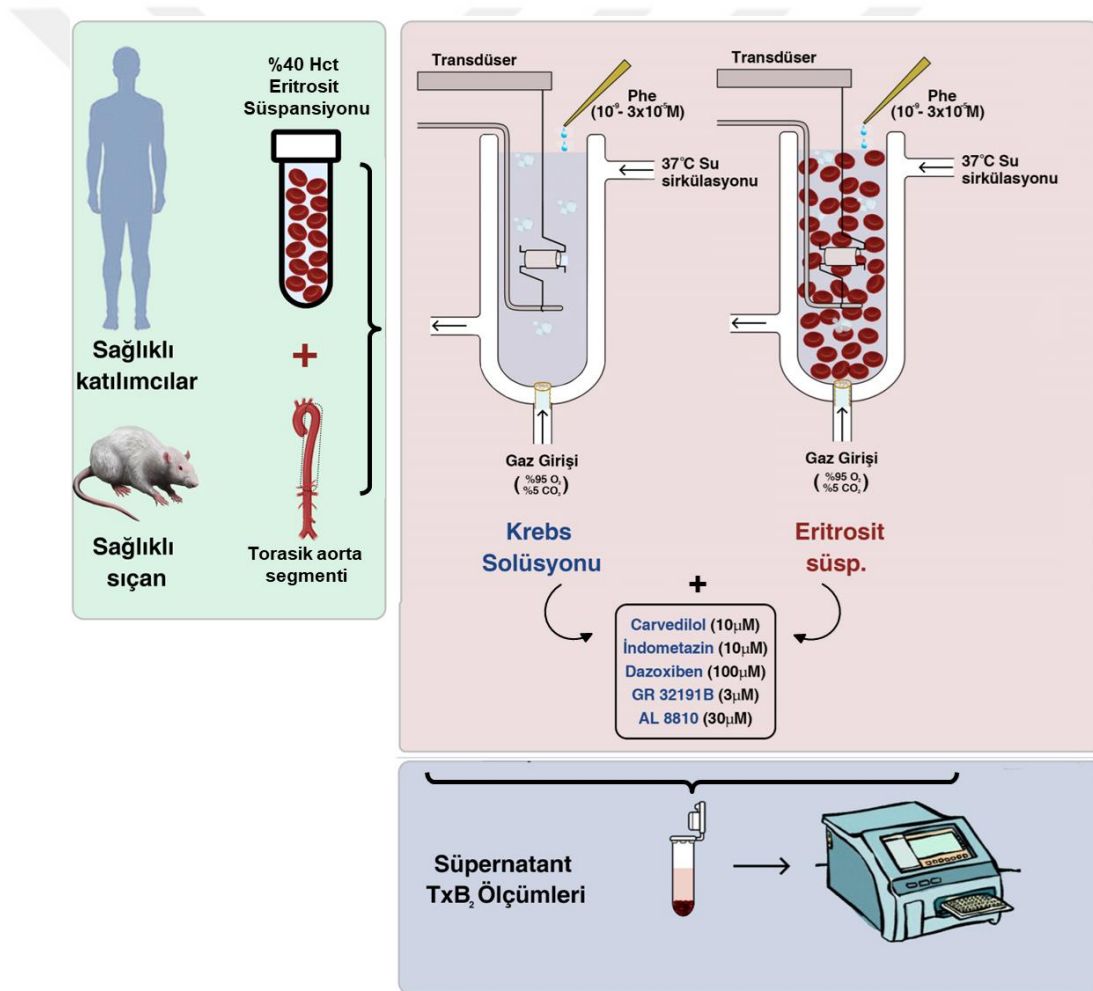
GR 32191B varlığında Phe aracılı kasılma yanıtları

Bu protokolde damar banyosunda 45 dk boyunca TP antagonisti GR 32191B (3 μ M) [(4Z)-7-[(1R,2R,3S,5S)-5-([1,1'-Biphenyl]-4-ylmethoxy)-3-hydroxy-2(1-piperidinyl)cyclopentyl]-4-heptenoic acid hydrochloride, Sigma G5044, St. Louis, USA]

varlığında inkübasyonu ardından fenilefrin aracılı yanıtlar incelenmiştir (Sakanashi ve ark., 1994; He ve Yang, 1995). Bu protokolün amacı eritrositlerin kasılma yanıtlarına katkısında TP reseptör agonistlerinin rolünü değerlendirmektir.

AL 8810 varlığında Phe aracılı kasılma yanıtları

Phe aracılı kasılma yanıtları damarların 30 dk boyunca FP antagonisti olan AL 8810 ($30 \mu\text{M}$) [$9\alpha,15\text{R}$ - dihydroxy- 11β - fluoro- 15 - ($2,3$ - dihydro- 1H - inden- 2 - yl)- $16,17,18,19,20$ - pentanor- prosta $5\text{Z},13\text{E}$ dien- 1 -oic acid, Cayman Chemical 16735, Ann Arbor, Michigan, USA] varlığında inkübe edilmesinden sonra incelenmiştir (Griffin ve ark., 1999). Bu protokolün amacı eritrositlerin kasılma yanıtlarına katkısında FP agonistlerinin rolünün değerlendirilmesidir.



Şekil 3. 1. Çalışma yönteminin özet şekli. Phe:fenilefrin, TxB₂: Tromboksan B₂, Hct: hematokrit.

3.5.4. Endotelden Bağımsız Gevşeme Yanıtı Protokolü

Damar banyolarına submaksimal konsantrasyonda Phe ile ön kasılmayı takiben $10 \mu\text{M}$ Sodyumnitroprussid (SNP) (Sodium nitroprusside dihydrate, Merck 106541,

Darmstadt, Germany) konsantrasyonuna verilen gevşeme yanıtları kaydedilmiştir. Bu protokolün amacı vasküler düz kasın sağlamlığını değerlendirmektir.

3.6. TxB₂ Miktarının Belirlenmesi

TxA₂'nin salındıktan kısa bir süre sonra TxB₂'ye metabolize olduğu bilinmektedir (Catella vd., 1986). TxA₂'nin kararlı bir metaboliti olan TxB₂'nin konsantrasyonları, TxB₂ ELISA kiti (Cayman Chemical 501020, Ann Arbor, MI, ABD) kullanılarak belirlenmiştir.

3.6.1. Kit ile Tedarik Edilen Malzemeler

Kit içeriğinde bulunan malzemelere Tablo 3.1'de yer verilmiştir.

Tablo 3. 1. TxB₂ ELISA kiti içeriği.

Ürün	Miktar
ELISA Tampon Konsantresi (10X)	10 ml (2 flakon)
Yıkama Tamponu Konsantresi (400X)	5 ml (1 flakon)
Polisorbat 20	3 ml (1 flakon)
TxB ₂ Standartı	1 flakon
TxB ₂ Asetilkolinesteraz (AChE) İzleyicisi	1 flakon (100 kuyucuk için)
ELISA İzleyici Boyası	1 flakon
TxB ₂ Antiserum	1 flakon (100 kuyucuk için)
ELISA Antiserum Boyası	1 flakon
Fare anti-Tavşan IgG Kaplı Plaka	1 plaka (96 kuyucuklu)
96'lık Plaka için Film Kapak	1 kapak
Ellman Reaktifi	100 kuyucuk için (3 flakon)

3.6.2. Örneklerin Hazırlanması ve Deney Protokolü

Damar banyosundaki Phe aracılı kasılma yanıtı protokollerinin ardından alınan örnekler 1000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantlar toplanarak -80°C'de muhafaza edilmiştir. Kit protokolünün uygulanacağı gün toplanan örneklerin buz üzerinde çözülmesi sağlanmıştır. Eritrosit süspansiyonu ve TP reseptör antagonistiyle inkübe edilen eritrosit süspansiyonu olan banyolardan alınan süpernatantlar ELISA tamponuyla 5 kat dilüe edilmiştir. Kit içeriğinde önerildiği gibi hesaplamalarda kullanmak üzere kör, total aktivite, non-spesifik bağlanma, maksimum bağlanma, standartlar ve örnekler için kuyucuklar belirlenmiştir.

Deney protokolü şu sırayla gerçekleştirilmiştir:

1. İlk olarak non-spesifik bağlanma kuyucuklarına 100 µl, maksimum bağlanma kuyucuklarına ise 50 µl ELISA tamponu eklenmiştir.
2. Standart solüsyonlarının ve örneklerin her biri uygun kuyucuklara 50 µl olarak eklenmiştir.
3. TxB₂ AChE İzleyicisi toplam aktivite ve kör kuyucukları hariç ölçüm yapılacak tüm kuyucuklara eklenmiştir.
4. TxB₂ Antiserumu toplam aktivite, kör ve non-spesifik bağlanma kuyucukları hariç ölçüm yapılacak tüm kuyucuklara eklenmiştir.
5. Ardından plaka film kapakla kapatılarak, +4°C'de 18 saat boyunca inkübe edilmiştir.
6. Gece boyu inkübasyonda plakada bağlanmayan reaktiflerin uzaklaştırılması için plaka ters çevrilerek boşaltılmış, ardından 5 kez Yıkama Tamponu ile iyice yıkanmıştır.
7. Daha sonra ölçüm yapılacak tüm kuyucuklara 200 µl Ellman Reaktifi eklenmiştir.
8. Son olarak toplam aktivite kuyucuğuna TxB₂ AChE İzleyicisinin 1:10 dilüsyonu 5 µl eklenerek, plaka filmle kapatılmış ve alüminyum folyo ile sarılmıştır. Karanlık ortamda 90 dk boyunca orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir.
9. İnkübasyon sonunda plaka spektrofotometrik plaka okuyucusunda 420 nm dalga boyunda okunmuştur.
10. Standart eğri çizildikten sonra örneklerdeki TxB₂ konsantrasyonları pg/ml olarak hesaplanmıştır.

3.7. Süpernatant Serbest Hemoglobin Ölçümü

Serbest Hb düzeyi siyanmethemoglobin yöntemi ile kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Bunun için Drabkin Ayırıcı (pH:7,0-7,4) kullanılmıştır.

Drabkin ayırıcı: 200 mg K₃[Fe(CN)₆], 140 mg KH₂PO₄, 50 mg KCN, 1 ml Triton-X, 1100 ml distile su.

800 µl Drabkin ayırıcı üzerine 200 µl ölçüm yapılacak örnekten pipetlenmiş ve birkaç kez ayıraç çekilip bırakılarak pipet ucu yıkanmıştır. Hb, ayıraçtaki ferrisiyanür ile methemoglobine oksitlenmektedir; bu madde potasyum siyanür ile daha kararlı bir bileşik olan siyanomethemoglobine dönüştüğü bilinmektedir. 5 dakika sonra

absorbans spektrofotometrede 546 nm'de ayıraç körüne karşı okunmuştur. Hemoglobin standart eğrisi kullanılarak örnekteki hemoglobin miktarı hesaplanmıştır. Plazma hemoglobin için sağlıklı erkeklerde 14-18 g/dl, kadınlarda ise 12-16 g/dl normal değerler olarak kabul edilmektedir. Bu ölçümlerin amacı deneyler sırasında eritrositlerin hemolize uğrayıp uğramadığını ve intakt olduğunu göstermektir. Böylece serbest Hb'nin NO süpürücü etkisiyle kasılma yanıtlarını etkilemesi olasılığı dışlanabilir.

3.8. Örneklem Büyüklüğünün Belirlenmesi

Örneklem büyüklüğü “GPower 3.1” programında yapılan güç analizi ile belirlenmiştir. Yapılan ön çalışmadan (n=15) elde edilen veriler kullanılarak etki büyüklüğü $f=0,75$ olarak hesaplanmıştır. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) için güç analizi yapılırken güç %90 ve $\alpha=0,05$ olarak belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda grup başına en az n=9 olacak şekilde örneklem büyüklüğü hedeflenmiştir.

3.9. Verilerin Değerlendirilmesi

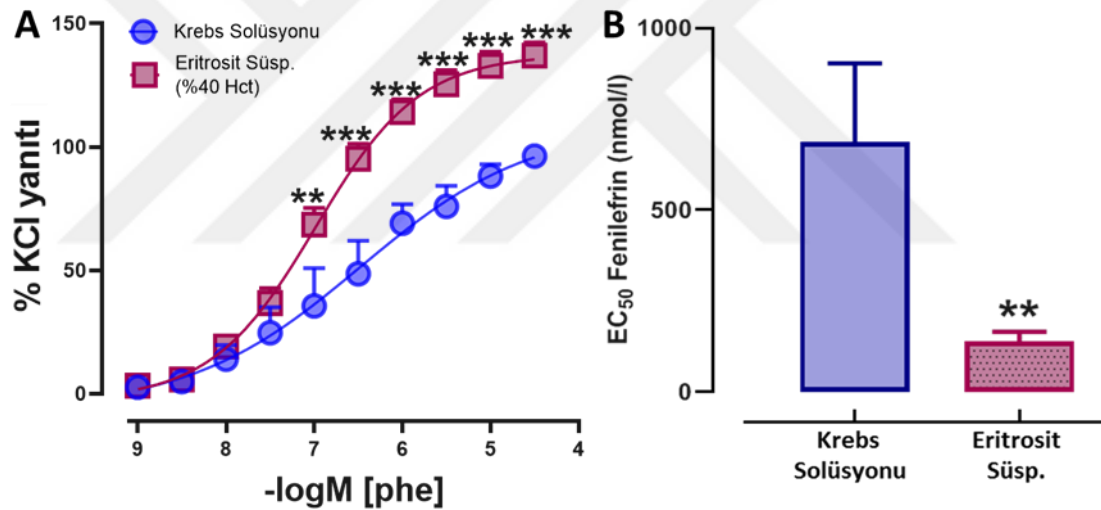
Çalışmanın istatistiksel analizleri “Windows için GraphPad Prism 10.1” programı kullanılarak yapılmıştır. Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Gruplarda verilerin normal dağılımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Vasküler yanıtların değerlendirilmesinde tekrarlayan ölçümlerde İki faktörlü ANOVA testi ardından Tukey veya Sidak'ın post-hoc analizi kullanılmıştır. Konsantrasyon-yanıt eğrilerinden dört parametrelili doğrusal olmayan regresyon analiziyle EC₅₀ değerleri hesaplanıp karşılaştırmalar yapılmıştır. EC₅₀ değerleri kıyaslanırken iki grup karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi, çoklu grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi ardından Dunn'ın post-hoc analizi kullanılmıştır. E_{max} değerleri ise Welch testi ve Tamhane T2 post-hoc analizi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Vasküler yanıtlarda grup içi iki farklı konsantrasyonun yanıtı karşılaştırılırken Bağımlı örneklem T testi kullanılmıştır. Normal dağılıma uyan ve verilerin homojen dağıldığı F testi ile doğrulanan iki grubun karşılaştırılmasında Bağımsız gruplar T testi, çoklu grupların karşılaştırılmasında ise Tek yönlü ANOVA testi ardından Tukey'in post-hoc analizi kullanılmıştır. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Vasküler Yanıtların İncelenmesi

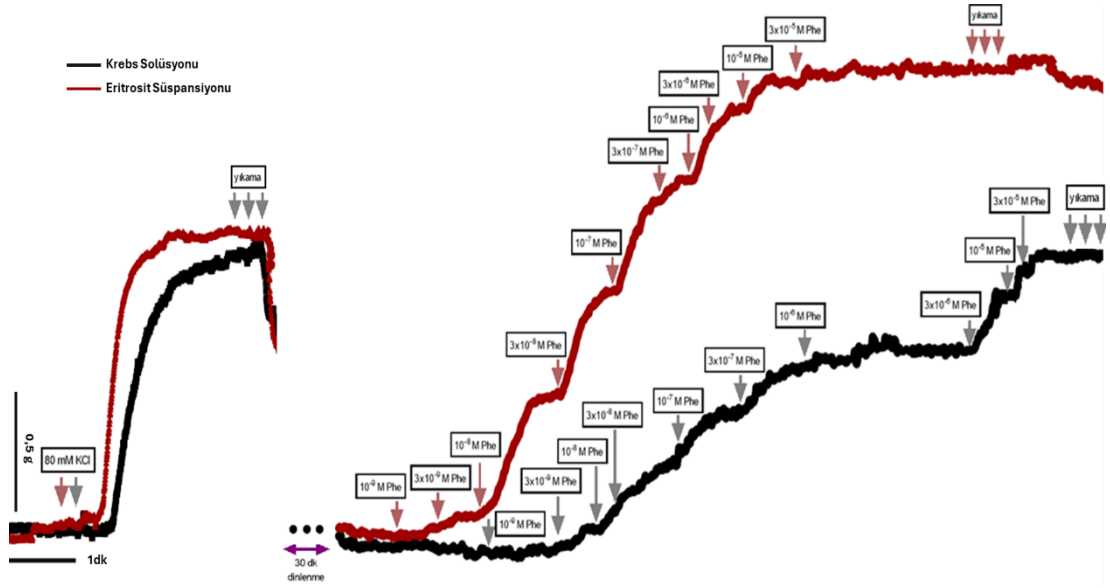
4.1.1. Eritrositlerin Vasküler Kasılma Yanıtlarına Etkisi

Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerin (%40 Hct) varlığında (n=14), kümülatif fenilefrin (10^{-9} - 3×10^{-5} M) konsantrasyonlarına cevaben aorta segmentlerinde gelişen kasılma yanıtlarının, Krebs solüsyonunun bulunduğu ortamda (n=12) kaydedilen yanıtlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu bulunmuştur (farklı konsantrasyonlarda $p < 0,01$; $p < 0,001$) (Şekil 4.1A). Konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC_{50} değerlerinin ise eritrosit süspansiyonu varlığında ($138,30 \pm 26,90$ nmol/l) kontrol koşullarına ($686,30 \pm 216,80$ nmol/l) göre anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görülmüştür ($p < 0,01$) (Şekil 4.1B).



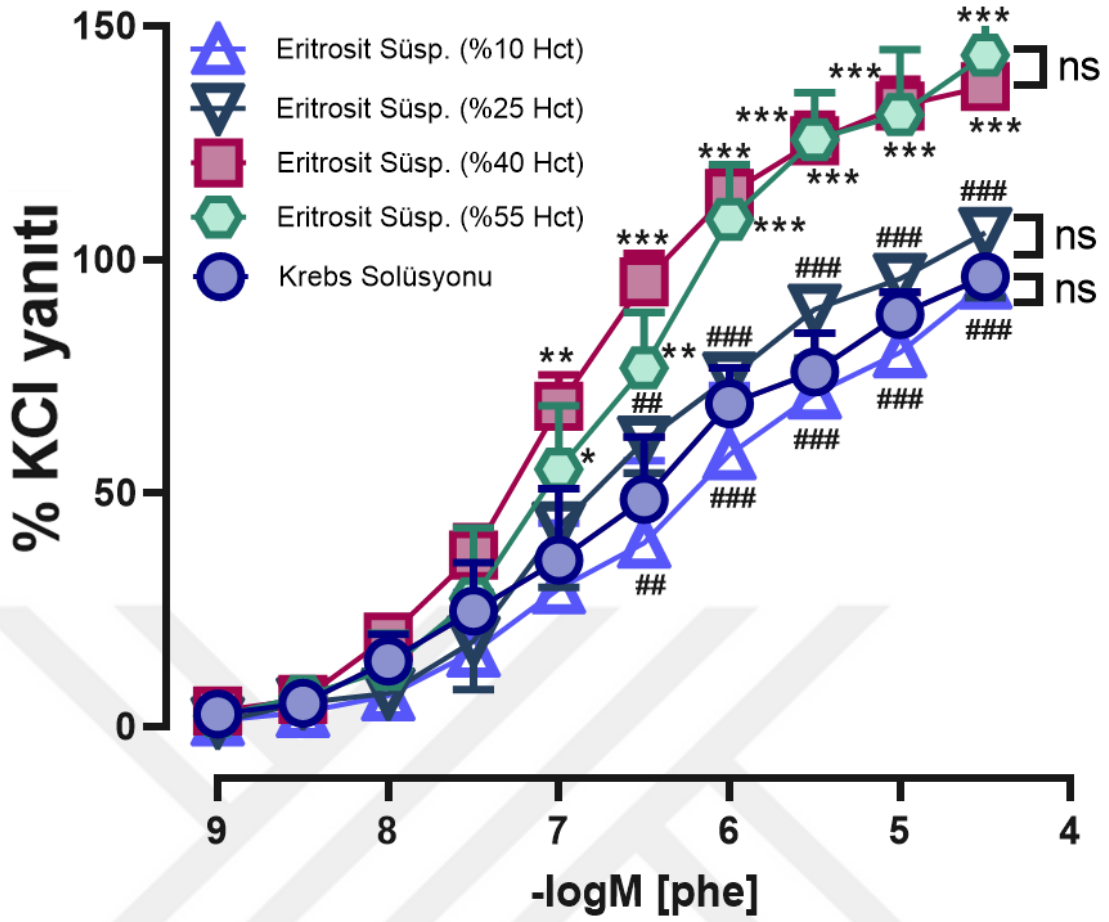
Şekil 4. 1. Eritrositlerin vasküler kasılma yanıtlarına katkısı. A) Sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerin bulunduğu ve sadece Krebs solüsyonu bulunan banyolarda damar segmentlerinin yanıtlarının karşılaştırılması. B) Eritrosit varlığında ve yokluğunda elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC_{50} değerleri. *: Krebs solüsyonu grubundan fark. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. phe:fenilefrin, süsp.:süspansiyon.

%40 hematokrit eritrosit süspansiyonu varlığında ve sadece Krebs solüsyonu bulunan damar banyolarında gram gerim cinsinden kaydedilen fenilefrin aracılı vazokonstriksiyon yanıtlarında sonuçların ortalamasına yansıtan konsantrasyon-yanıt eğrilerinin bir örneğine Şekil 4.2’te yer verilmiştir. Bu şekilde kümülatif fenilefrin (10^{-9} - 3×10^{-5} M) konsantrasyonlarına cevaben aorta segmentlerinde gelişen gerim farklılıklarının eritrosit süspansiyonu bulunan ortamda net bir şekilde daha yüksek olduğu görülmektedir.

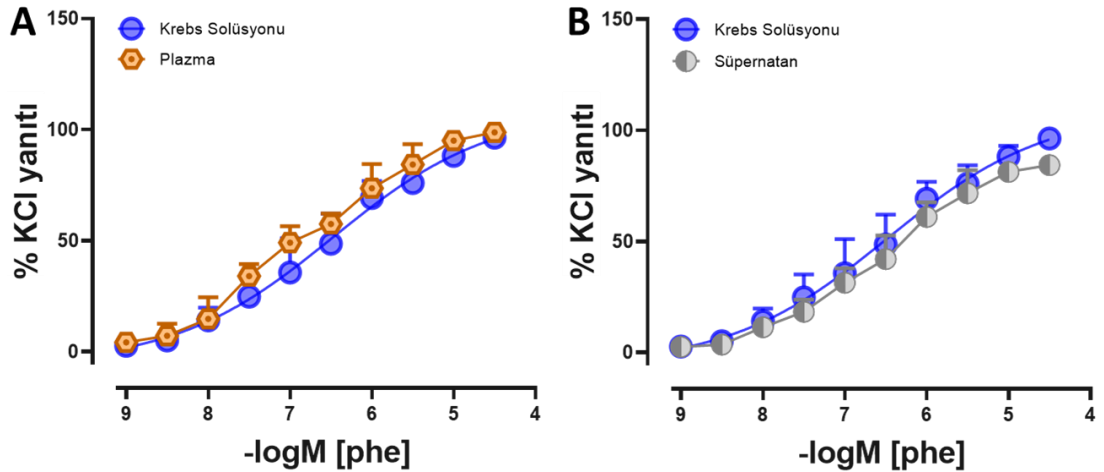


Şekil 4. 2. Farklı koşullarda fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarının incelendiği deneyler sırasında alınan bir kayıt örneği. Phe:fenilefrin.

Farklı hematokrit değerlerinde (%10, %25, %40 ve %55) hazırlanan eritrosit süspansiyonlarıyla deneyler tekrarlandığında hematokrit değerinin artmasıyla vazokonstriksiyon yanıtlarının da arttığı görülmüştür. Ancak %10 (n=6) ve %25 (n=6) hematokritteki eritrosit süspansiyonlarının varlığında elde edilen yanıtlar, sadece Krebs solüsyonu bulunan damar banyolarında kaydedilen vasküler kasılma yanıtlarıyla karşılaştırıldığında sonuçların benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Damar banyosuna hematokriti %40 ve %55 (n=7) olarak ayarlanan eritrosit süspansiyonları eklenerek yapılan deneylerde ise fenilefrin aracılı vazokonstriksiyon yanıtlarının, Krebs solüsyonu varlığında elde edilen sonuçlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,001$; $p<0,001$) (Şekil 4.3). Ayrıca eritrosit miktarı %10 ve %25 hematokritte hazırlanmış süspansiyonların bulunduğu ortamdaki vazokonstriksiyon yanıtları %40 hematokritteki süspansiyonların varlığında kaydedilen sonuçlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,001$; $p<0,001$) (Şekil 4.3). Hematokriti %55 olan eritrosit süspansiyonları varlığında ise vasküler kasılma yanıtlarının, %40 hematokritte elde edilen yanıtlara göre anlamlı düzeyde ek bir katkı sağlamadığı saptanmıştır (Şekil 4.3). Çalışma kapsamında deneylere fizyolojik hematokritin ortalama bir değeri olarak eritrosit miktarı %40 hematokritte hazırlanmış süspansiyonlarla devam edilmiştir.



Şekil 4. 3. Süspansiyon ortamındaki eritrosit miktarının vazokonstriksiyon yanıtlarına etkisinin incelenmesi. Farklı hematokritlerde hazırlanan eritrosit süspansiyonlarının bulunduğu ortamlardaki damar segmentlerinin 10^{-9} - 3.10^{-4} M fenilefrine cevaben oluşturduğu kasılma yanıtları. *: Krebs solüsyonu grubundan fark. #: %40 Hct eritrosit süspansiyonu grubundan fark. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$. phe:fenilefrin, Hct:hematokrit, ns: istatistiksel olarak anlamlı farklılık yok.

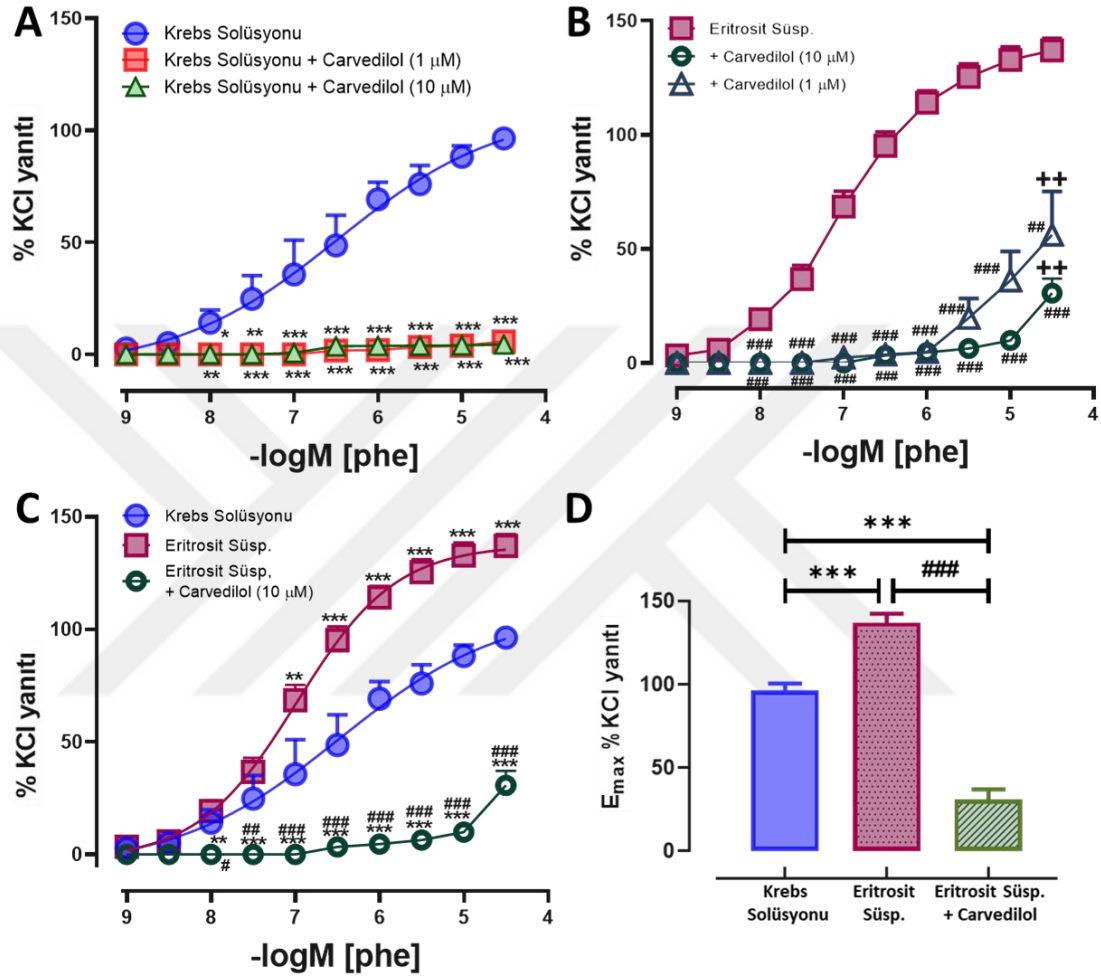


Şekil 4. 4. Eritrosit dışı kan bileşenlerinin fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarına etkisi. A) Plazma varlığında yapılan deneyler. B) Süpernatant varlığında yapılan deneyler. phe:fenilefrin.

Damar banyolarında plazma varlığında (n=3) tekrarlanan fenilefrin aracılı kasılma yanıtları kontrol grubuyla kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür (Şekil 4.3A). Eritrosit süspansiyonların hazırlanması

aşamasında son yıkamadan toplanan süpernatantlarla (n=3) yapılan deneylerde de fenilefrine yanıt olarak gelişen vazokonstriksiyonun kontrol grubuyla benzer olduğu, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.3B).

4.1.2. Carvedilol Varlığında Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtları



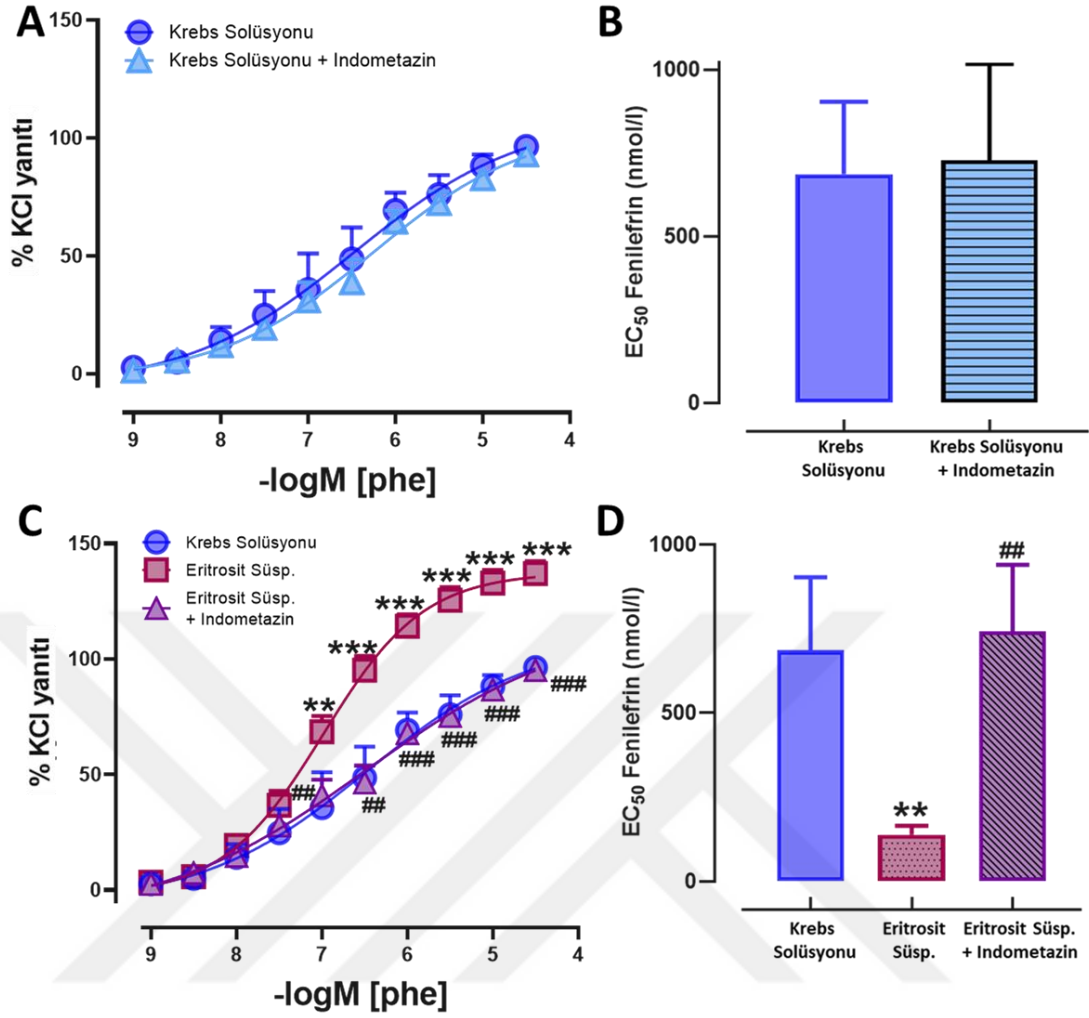
Şekil 4. 5. Eritrositlerin vasküler kasılma yanıtlarına katkısında adrenoseptörlerin rolü. A) Krebs solüsyonu bulunan banyolarda 1 µM ve 10 µM Carvedilol varlığında vasküler kasılma yanıtları. B ve C) Eritrosit süspansiyonu bulunan banyolarda 1 µM ve 10 µM (n=8) Carvedilol varlığında vasküler kasılma yanıtları. D) Damar segmentlerinin maksimal kasılma yanıtları. *: Krebs solüsyonu grubundan fark, #: Eritrosit süspansiyonu grubundan fark. +: Grup içi en düşük Phe konsantrasyonundan fark. *: p<0,05, **: p<0,01, ***:p<0,001. phe:fenilefrin, süsp.:süspansiyon.

Krebs solüsyonu varlığında kümülatif fenilefrin (10^{-9} - 3×10^{-5} M) konsantrasyonları uygulanmasıyla gelişen vasküler kasılma yanıtlarının selektif α_1 ve non-selektif β adrenoseptör antagonisti Carvedilol inkübasyonu (n=5) tamamen inhibe olduğu görülmüştür (Şekil 4.5A). Eritrosit içeren koşullarda 1 µM (n=5) ve 10 µM (n=9) konsantrasyonlarında Carvedilol inkübasyonu tekrarlandığında da benzer şekilde vazokonstriksiyon yanıtlarının inhibe olduğu saptanmıştır (p<0,001) (Şekil 4.5B). Fakat aynı koşullarda fenilefrinin yüksek konsantrasyonlarına cevaben kasılma

yanıtlarının oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5B). Bu yanıtlar en düşük fenilefrin konsantrasyonuna cevaben elde edilen sonuçlardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,01$). Eritrosit süspansiyonu varlığında $10 \mu\text{M}$ Carvedilol inkübasyonu ardından fenilefrin uygulamasıyla elde edilen yanıtların hem Krebs solüsyonu varlığındaki hem de eritrosit süspansiyonu varlığındaki vasküler kasılma yanıtlarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edilmiştir (iki kıyaslama için de $p<0,001$) (Şekil 4.5C). Ayrıca bu gruplarda E_{max} değerleri incelendiğinde eritrosit süspansiyonunun bulunduğu damar banyolarında α_1 ve β AR'lerin antagonize edilmesi ($30,72 \pm 6,36$), Krebs solüsyonu varlığındaki ($96,38 \pm 1,79$) ve eritrosit süspansiyonu varlığındaki ($137,10 \pm 5,35$) E_{max} değerlerini anlamlı ölçüde düşürmüştür (iki kıyaslama için de $p<0,001$) (Şekil 4.5D). Eritrosit süspansiyonu varlığında elde edilen E_{max} sonuçları da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,001$) (Şekil 4.5D).

4.1.3. İndometazin Varlığında Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtları

Sadece Krebs solüsyonu bulunan damar banyolarında non-spesifik COX inhibitörü İndometazin inkübasyonu ile ($n=8$), vasküler COX enziminin inhibe edilmesi, kümülatif fenilefrin konsantrasyonlarının neden olduğu vazokonstriksiyon yanıtlarında anlamlı düzeyde bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.6A). Sadece vasküler COX enziminin inhibe edilmesi EC_{50} değerlerinde ($728,20 \pm 288,70 \text{ nmol/l}$) de anlamlı bir fark oluşturmamıştır (Şekil 4.6B). Eritrosit süspansiyonu bulunan damar banyolarında ise İndometazin inkübasyonu ile ($n=9$) fenilefrine cevaben gelişen kasılma yanıtları eritrosit süspansiyonu varlığında alınan sonuçlarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur ($p<0,001$; (Şekil 4.5C). İndometazin varlığında ve yokluğunda eritrosit süspansiyonu bulunan ortamlarda hesaplanan EC_{50} değerleri ($523,10 \pm 197,70 \text{ nmol/l}$) de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür ($p<0,01$). Eritrosit süspansiyonu varlığında COX enziminin inhibe edilmesinin, vasküler kasılma yanıtlarını Krebs solüsyonu varlığında elde edilen sonuçlar seviyesine düşürdüğü tespit edilmiştir.

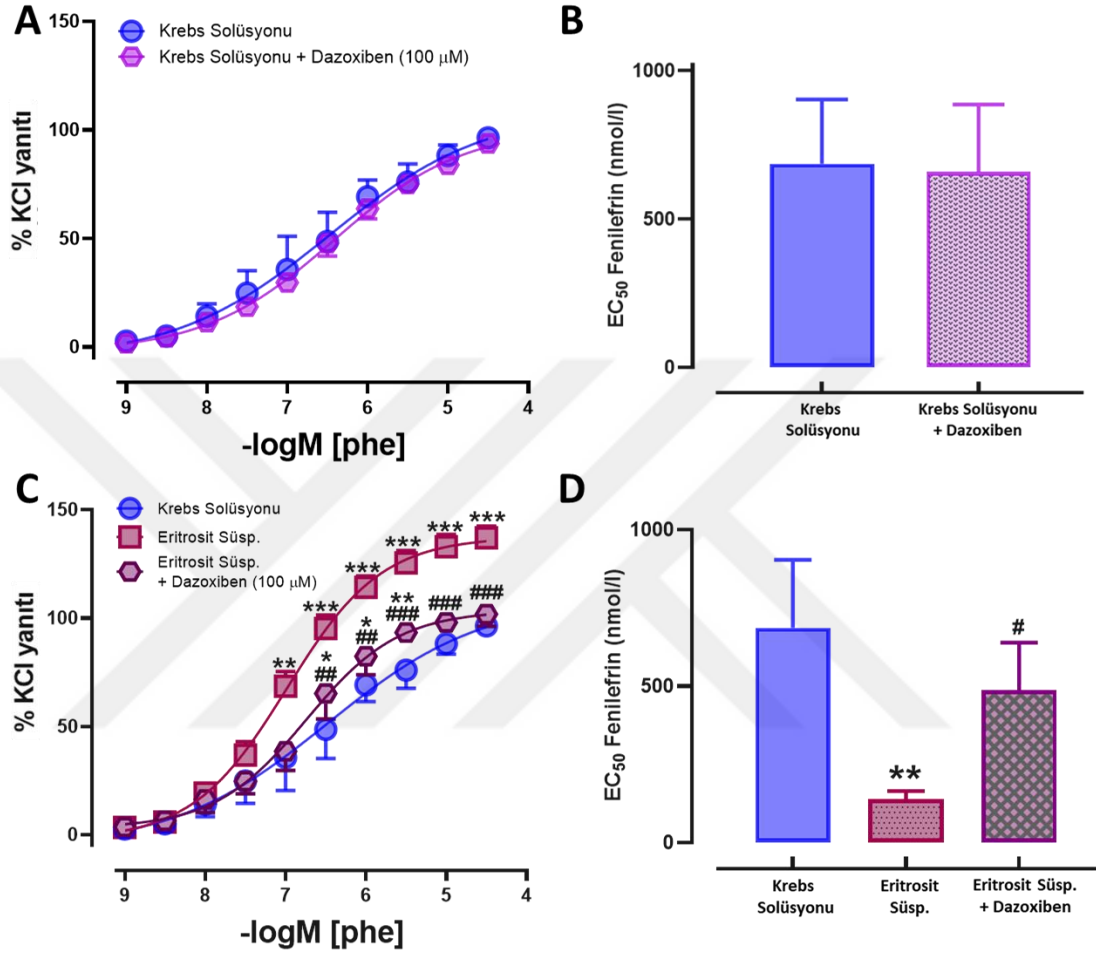


Şekil 4. 6. Eritrositlerin vasküler kasılma yanıtlarına katkısında siklooksijenaz metabolitlerinin rolü. A ve C) Krebs solüsyonu ve eritrosit süspansiyonu bulunan banyolarda 10 μ M İndometazin varlığında vasküler kasılma yanıtları. B ve D) Eritrosit varlığında ve yokluğunda indometazin inkübasyonu sonrası elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri *: Krebs solüsyonu grubundan fark, #: Eritrosit süspansiyonu grubundan fark. **: p<0,01, ***: p<0,001. phe:fenilefrin.

4.1.4. Dazoxiben Varlığında Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtları

Krebs solüsyonu varlığında TxAS inhibitörü Dazoxiben inkübasyonu (n=6) fenilefrin konsantrasyonlarına cevaben gelişen vasküler kasılma yanıtlarının ve EC₅₀ değerlerinin ($658,60 \pm 227,40$ nmol/l) anlamlı düzeyde etkilenmediği görülmüştür (Şekil 4.7A ve B). Damar banyolarında eritrosit süspansiyonu varlığında Dazoxiben inkübasyonu (n=9) ardından fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarının Krebs solüsyonu varlığında elde edilen sonuçlara kıyasla 3×10^{-7} , 10^{-6} ve 3×10^{-6} M fenilefrin konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülürken, daha yüksek fenilefrin konsantrasyonlarda bu farkın ortadan kalktığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7C). Eritrosit süspansiyonu bulunan ortamda Dazoxiben inkübasyonu ile kaydedilen kasılma yanıtlarının ise eritrosit süspansiyonu grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.7C). EC₅₀ değerlerinin

($487,40 \pm 151,40$ nmol/l) Krebs solüsyonu varlığındaki sonuçlara kıyasla farklılığın olmadığı, eritrosit süspansiyonu bulunan ortamda elde edilen sonuçlardan ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,01$) (Şekil 4.7C).

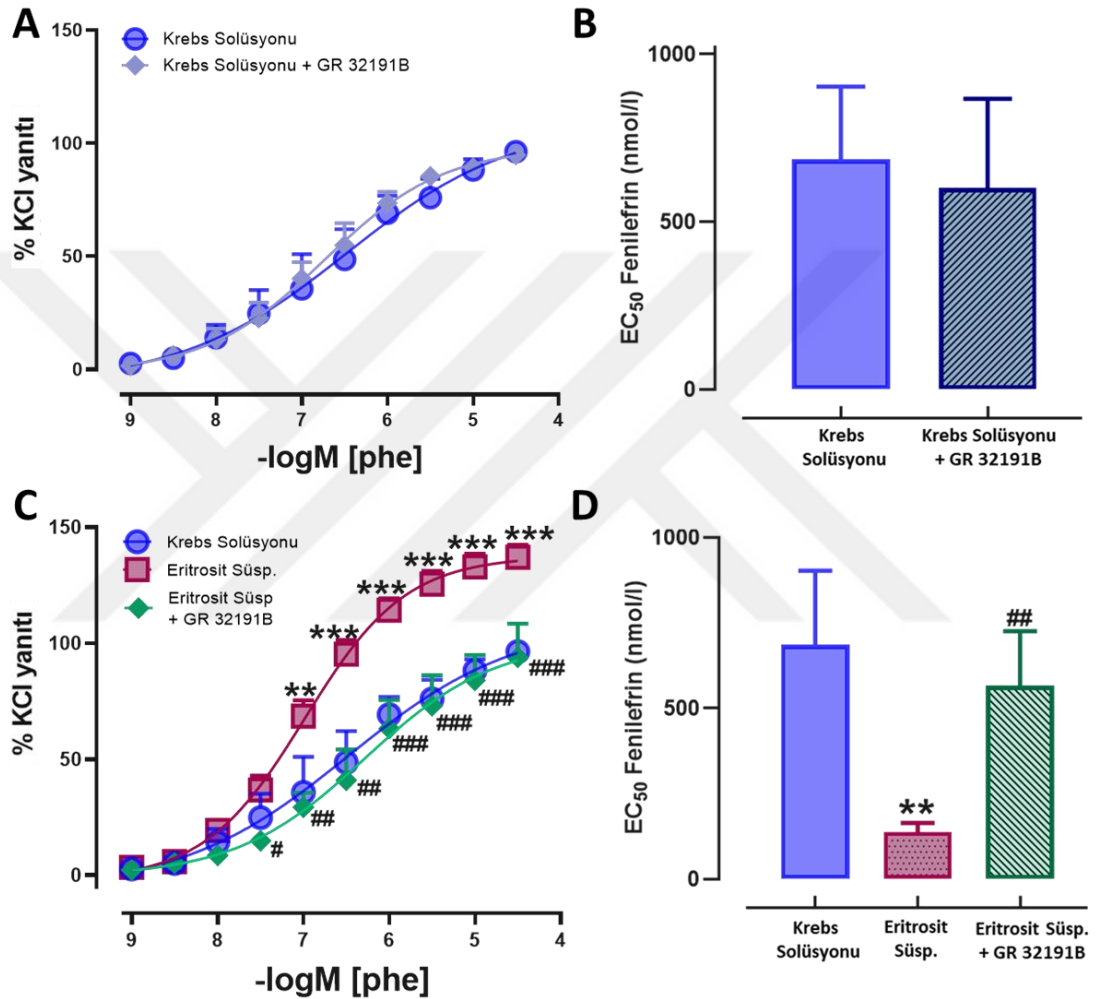


Şekil 4. 7. Eritrositlerin vasküler kasılma yanıtlarına katkısında TxA_2 'nin rolü. A ve C) Krebs solüsyonu ve eritrosit süspansiyonu bulunan banyolarda 100 µM Dazoxiben varlığında vasküler kasılma yanıtları. B ve D) Eritrosit varlığında ve yokluğunda Dazoxiben inkübasyonu sonrası fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarından hesaplanan EC₅₀ değerleri *: Krebs solüsyonu grubundan fark. #: Eritrosit süspansiyonu grubundan fark. **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$. phe:fenilefrin, süsp.:süspansiyon.

4.1.5. GR32191B Varlığında Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtları

Sadece Krebs solüsyonu bulunan damar banyolarında TP antagonisti GR 32191B inkübasyonu (n=7), vasküler TP reseptörlerinin aktivasyonunun engellenmesi, kümülatif fenilefrin konsantrasyonlarının neden olduğu vazokonstriksiyon yanıtlarında ve EC₅₀ değerlerinde ($600,90 \pm 265,90$ nmol/l) anlamlı düzeyde bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.8A ve B). Eritrosit süspansiyonu bulunan damar banyolarında GR 32191B inkübasyonunun (n=10) ardından hem fenilefrine cevaben gelişen kasılma yanıtlarında hem de EC₅₀ değerlerinde ($566,70 \pm 159,50$

nmol/l) eritrosit süspansiyonu varlığında alınan sonuçlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık bulunmuştur (farklı konsantrasyonlarda $p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$). Eritrosit süspansiyonu varlığında TP agonistlerinin etkisi bloke edildiğinde vasküler kasılma yanıtlarının ve EC_{50} değerlerinin Krebs solüsyonu varlığında elde edilen sonuçlar seviyesine yaklaştığı, eritrositlerin katkısının tamamen ortadan kalktığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8C ve D).

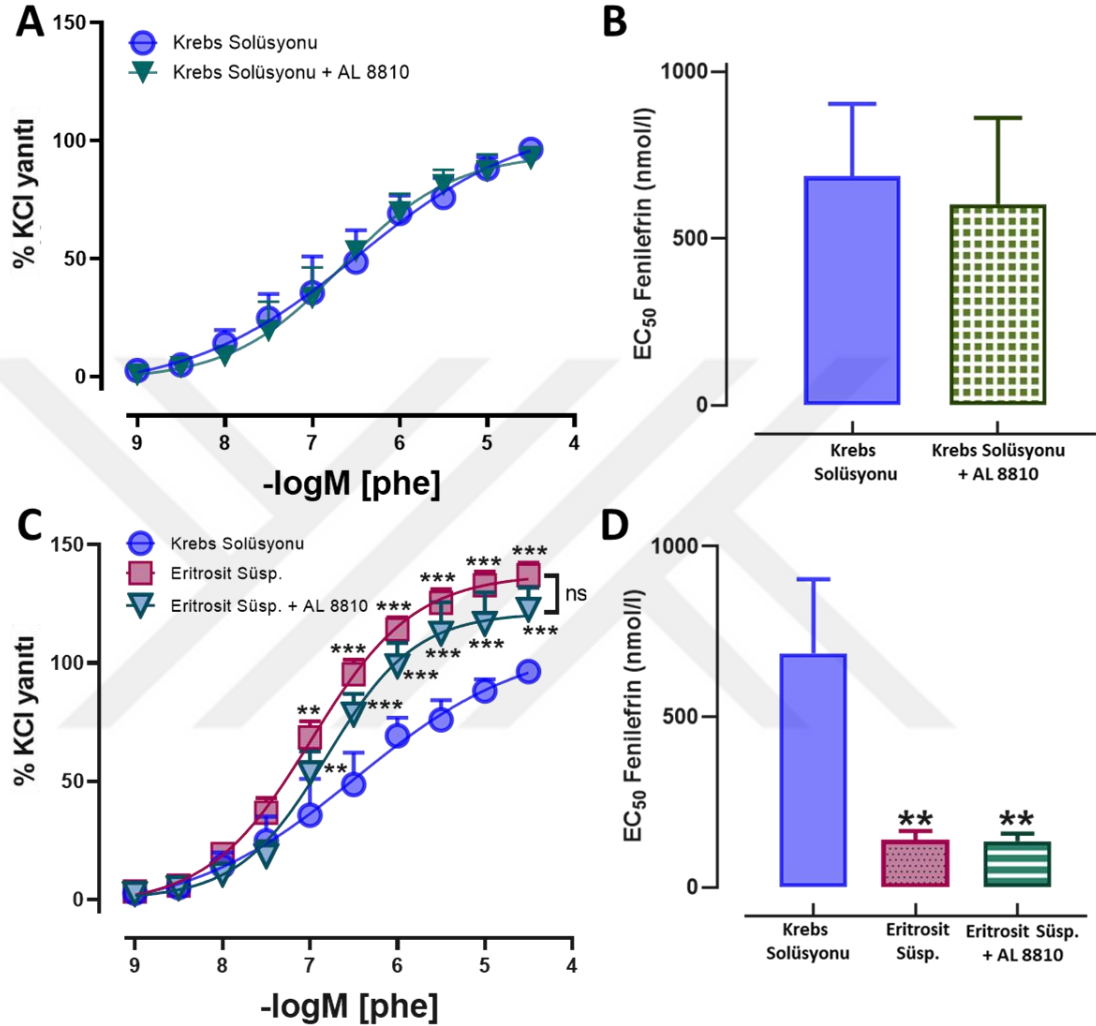


Şekil 4. 8. Eritrositlerin vasküler kasılma yanıtlarına katkısında TP agonistlerinin rolü. A ve C) Krebs solüsyonu ve eritrosit süspansiyonu bulunan banyolarda 3 μ M GR 32191B varlığında vasküler kasılma yanıtları. B ve D) Eritrosit varlığında ve yokluğunda GR 32191B inkübasyonu sonrası fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarından hesaplanan EC_{50} değerleri *: Krebs solüsyonu grubundan fark. #: Eritrosit süspansiyonu grubundan fark. **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$. phe:fenilefrin, süsp.:süspansiyon.

4.1.6. AL8810 Varlığında Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtları

FP antagonisti AL-8810 inkübasyonunun ($n=7$) Krebs solüsyonu varlığında yapılan deneylerde fenilefrinin neden olduğu vazokonstriksiyon yanıtlarında ve EC_{50} değerlerinde ($601,8 \pm 258,60$ nmol/l) anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür (Şekil 4.9A ve B). Eritrosit bulunan damar banyolarında da AL8810

inkübasyonunun (n=10) fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarını ve EC₅₀ değerlerini (135,20 ± 21,97 nmol/l) anlamlı ölçüde etkilemediği, eritrosit süspansiyonu varlığında elde edilen kasılma yanıtlarıyla benzer sonuçlar kaydedildiği bulunmuştur (Şekil 4.9C ve D).



Şekil 4. 9. Eritrositlerin vasküler kasılma yanıtlarına katkısında FP agonistlerinin rolü. A ve C) Krebs solüsyonu ve eritrosit süspansiyonu bulunan banyolarda 30 µM FP antagonisti AL 8810 varlığında vasküler kasılma yanıtları. B ve D) Eritrosit varlığında ve yokluğunda AL 8810 inkübasyonu sonrası elde edilen kasılma yanıtlarından hesaplanan EC₅₀ değerleri *: Krebs solüsyonu grubundan fark. **: p<0,01, ***: p<0,001. phe:fenilefrin, süsp: süspansiyon, ns: istatistiksel olarak anlamlı farklılık yok.

4.1.7. SNP Aracılı Vazodilatasyon Yanıtları

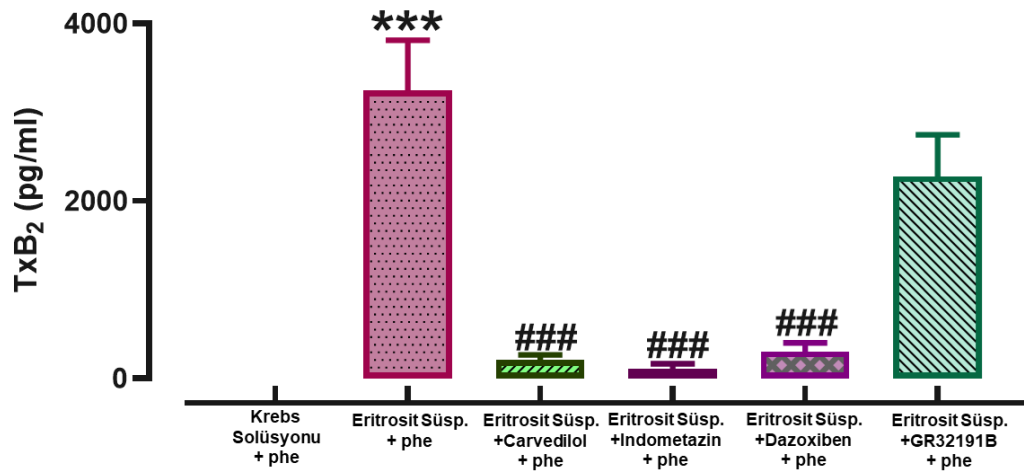
Fenilefrin aracılı vasküler kasılma yanıtları incelendikten sonra tüm gruplarda vasküler düz kas sağlamlığı değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4. 1. SNP aracılı vasküler gevşeme yanıtları. Fenilefrin aracılı kasılma yanıtları incelendikten sonra Krebs solüsyonu varlığında 10^{-6} M fenilefrin ile ön kasılma yapıldıktan sonra 10^{-5} M SNP'ye cevaben gelişen vazodilatasyon yanıtları. SE:standart hata, süsp:süspansiyon.

Grup	% Gevşeme (Ort±SE)	Grup	% Gevşeme (Ort±SE)
Krebs Solüsyonu	99,24±0,37	Krebs Solüsyonu + Dazoxiben	99,93±0,04
Eritrosit Süsp.	98,33±0,67	Eritrosit Süsp. + Dazoxiben	98,88±0,61
Krebs Solüsyonu + Carvedilol	98,97±0,50	Krebs Solüsyonu + GR32191B	99,30±0,49
Eritrosit Süsp. + Carvedilol	98,62±0,70	Eritrosit Süsp. + GR32191B	98,53±0,79
Krebs Solüsyonu + İndometazin	98,08±0,83	Krebs Solüsyonu + AL8810	99,32±0,66
Eritrosit Süsp. + İndometazin	98,35±0,53	Eritrosit Süsp. + AL8810	98,63±0,63

4.2. Süpernatant TxB₂ Ölçümleri

Fenilefrin aracılı yanıtlar incelendikten sonra süpernatantlarda yapılan TxB₂ ölçümleri sonucunda, fenilefrin uyarısına cevaben eritrosit süspansiyonlarında TxB₂ miktarlarının $3245 \pm 568,6$ pg/ml düzeyinde olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.10). Sadece Krebs solüsyonunda ise önemli düzeyde TxB₂ saptanmamıştır. İki grup kıyaslandığında ise eritrosit süspansiyonlarındaki TxB₂ miktarı Krebs solüsyonuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Eritrosit süspansiyonu varlığında Carvedilol, İndometazin ve Dazoxiben inkübasyonu TxB₂ miktarlarını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşürmüş, GR 32191B inkübasyonu ise TxB₂ miktarlarında anlamlı düzeyde bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10. Süpernatant TxB₂ miktarları. Damar banyosu deneylerinin ardından toplanan örneklerde yapılan TxB₂ ölçümleri. *:Krebs solüsyonu+phe grubundan fark, #:Eritrosit süspansiyonu+phe grubundan fark. ***: $p < 0.001$. phe:fenilefrin, süsp:süspansiyon, TxB₂: Tromboksan B₂.

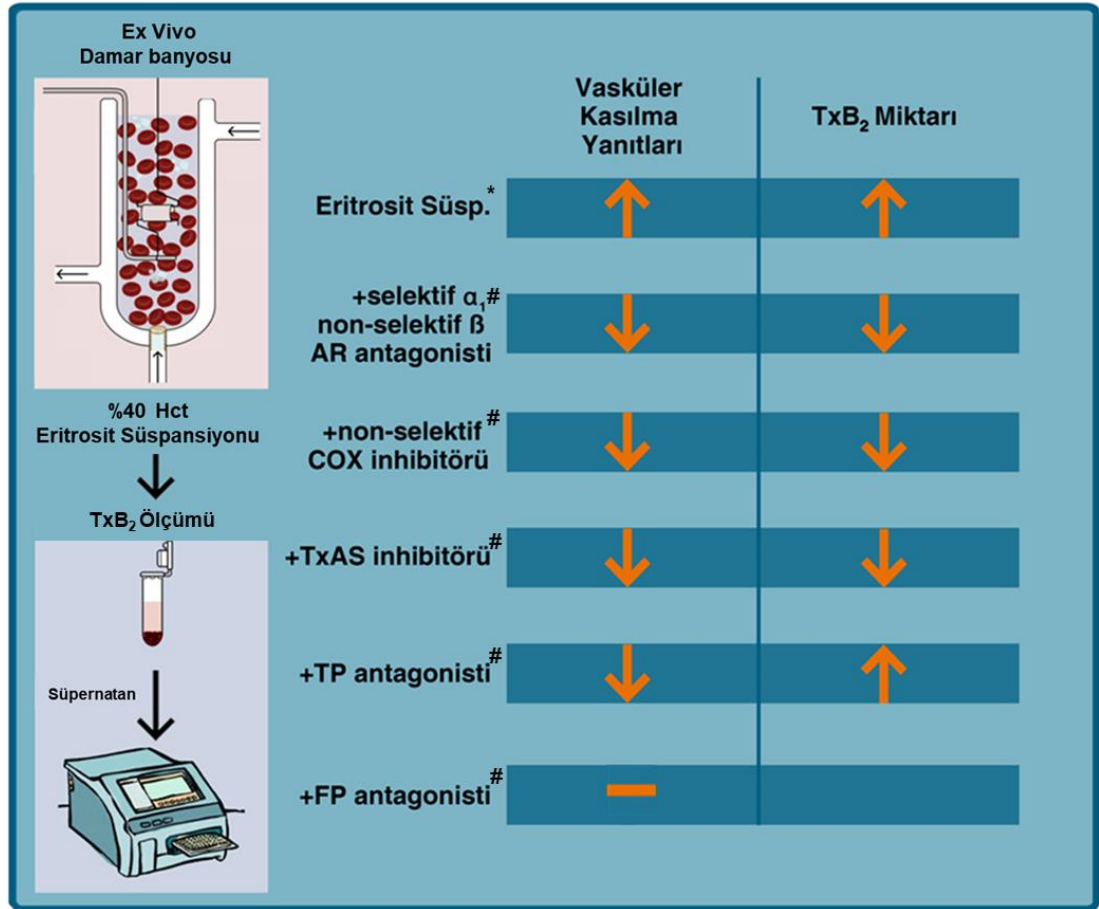
4.3. Süpernatant Serbest Hb Ölçümleri

Fenilefrin aracılı vasküler kasılma protokollerinin ardından toplanan örneklerde yapılan serbest Hb miktarı ölçümleriyle deney düzeneginde eritrositlerden açığa Hb

miktarının çok düşük olduğu görülmüştür. Eritrosit varlığında deneylerin gerçekleştirildiği gruplar karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.11). Serbest Hb miktarı sağlıklı eritrosit süspansiyonunda $2,72 \pm 0,35$ mg/dl olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 11. Süpernatant serbest Hemogloblin miktarları. Phe:fenilefrin, süsp:süspansiyon.



Şekil 4. 12. Çalışma bulgularının özeti. *:Krebs solüsyonundan fark, #: Eritrosit süsp. grubuyla kıyaslandığında. AR: Adrenoseptör, COX: Siklooksijenaz, TxAS: tromboksan sentaz, TP:Tromboksan reseptörü, FP: Prostaglandin-F reseptörü TxB₂: Tromboksan B₂, Hct: hematokrit

5. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında eritrositlerin fenilefrin aracılı vasküler kasılma yanıtlarına net etkisi ve bu etkinin mekanizmasında COX enzimi aracılığı ile üretilen vazokonstriktör mediyatörlerin rolünün olup olmadığı incelenmiştir. Tez projemizin bulguları, literatürde ilk defa, fenilefrine cevaben gelişen vazokonstriksiyon yanıtında eritrositlerin önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Deneylerimizde, eritrositlerde adrenoseptör aktivasyonunun COX enzimini uyarak vazokonstriktör bir mediatör olan TxA_2 'nin üretimine; süspansiyon ortamına salınan TxA_2 'nin ise, damar düz kasında spesifik TP reseptörlerine bağlanarak vazokonstriksiyona neden olduğu kanıtlanmıştır. Eritrosit kaynaklı TxA_2 aracılığı ile gerçekleşen bu kasılma yanıtı, eritrosit konsantrasyonu ile de yakın ilişkili bulunmuş ve %40 hematokrite kadar eritrosit konsantrasyonundaki artışın kasılma yanıtında da artışa neden olduğu kanıtlanmıştır. Mekanizmanın aydınlatılması için, deneylerimiz selektif α_1 ve non-selektif β adrenoseptör antagonisti Carvedilol, non-selektif COX enzim inhibitörü İndometazin, TxAS enzim inhibitörü Dazoxiben, TP reseptör antagonisti GR32191B ve FP reseptör antagonisti AL8810 varlığında tekrarlanmıştır. Sonuçlarımız, adrenoseptör antagonisti, TP antagonisti ve TxAS inhibitörü varlığında, fenilefrin aracılı kasılma yanıtına eritrositlerin katkısının tamamen ortadan kalktığını göstermiştir. Bunun aksine, FP antagonisti AL8810'un ise eritrosit aracılı kasılma yanıtlarına herhangi bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.

TxA_2 'nin vazokonstriktör etkisi ilk defa 1970 yılında tavşan aort segmentlerinde yapılan çalışmayla gösterilmiştir (Palmer ve ark., 1970). Daha sonra, TxA_2 'nin aorta, mezenter arter, koroner arter gibi birçok damar yatağında da vasküler düz kas hücrelerinde güçlü bir kasılma yanıtına neden olduğu bildirilmiştir (Nakahata, 2008; Zhang M. ve ark., 2022). TxA_2 , damar düz kasının yanı sıra bronşiyol, bağırsak, uterus ve mesane düz kaslarının da kasılmasına neden olur (Wilhelmsson ve ark., 1981; Devillier ve Bessard, 1997; Palea ve ark., 1998; Schultheiss ve Diener, 1999). TxA_2 aracılı vazokonstriksiyonun pulmoner dolaşımında fizyolojik koşullar altında vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiş olmakla birlikte bu etkiler sistemik dolaşım için doğrulanmamıştır (Katusic ve Shepherd, 1991; Farhat ve Ramwell, 1992; Buzzard ve ark., 1993; Pfister ve Campbell, 1996; White ve Hiley, 1998; Stanke-Labesque ve ark., 2001; Stanke-Labesque ve ark.,

2004). Önemli olarak, TxAS inhibisyonu veya TP blokajının, normotansif hayvanlarda ve insanlarda kan basıncında önemli bir değişikliğe neden olmadığı, TP reseptörü olmayan farelerin ise normotansif oldukları bildirilmiştir (Chan ve Cervoni, 1986; Moncada S. ve Higgs, 1986; Smith W. L., 1986). Bu bilgiler, TxA₂'nin fizyolojik koşullarda sistemik kan basıncının regülasyonunda önemli bir rolü olmadığını göstermektedir. Fizyolojik koşulların aksine, patolojik koşullarda ise TxA₂ aracılı gerçekleşen vazokonstriksiyon, kan basıncı ve vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Lokal vazokonstriksiyonun görüldüğü migren, reynoud fenomeni ve primer pulmoner hipertansiyon gibi patolojik koşullarda damar direncinin artışından TxA₂'nin sorumlu olduğu, TxAS inhibitörlerinin ise bu artışı engelleyerek aşırı vazokonstriksiyonu önlediği gösterilmiştir (Belch ve ark., 1983; Rich ve ark., 1987; Christman ve ark., 1992; Kitano ve ark., 1994; Sakamoto ve ark., 1999; Cracowski ve Durand, 2006). Sistemik hipertansiyonda ise hem insanlarda hem deney hayvanlarında serum ve idrar TxA₂ konsantrasyonunun kontrol koşullarına kıyasla daha yüksek olduğu ve bunun da endotel hücrelerinde ifade edilen TxAS miktarının artışıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Vanhoutte ve Tang, 2008). Öte yandan, *in vitro* ve *in vivo* analizler, TxA₂'nin deneysel hipertansiyon gelişiminde merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. Spontan hipertansiyon ve fruktozla indüklenen hipertansiyon modellerinde TxAS inhibisyonunun hipertansiyon gelişimini önlediği belirtilmiştir (Chan ve Cervoni, 1986; Galipeau ve ark., 2001). Benzer şekilde, reno-vasküler hipertansiyon modeli olan Goldblatt modeli ve Ang-II aracılı gelişen hipertansiyon modelinde TP reseptörünün inhibisyonu, kan basıncını normal seviyelere düşürmüştür (Mistry ve Nasjletti, 1988; Boussairi ve ark., 1994). Bu hipertansiyon modellerinde, Ang-II'nin TxA₂ üretimini güçlü şekilde uyardığı ve oluşan TxA₂'nin bu modellerde gözlenen kan basıncı artışına katkı sağladığı kanıtlanmıştır (Martinez-Maldonado, 1991; Carvalho ve ark., 1997). Spontan hipertansif sıçanlarda çift etkili TxAS inhibitörü ve TP reseptör antagonisti olan Ridogrel'in kronik olarak uygulanması ise kan basıncını ve serum ve idrar TxB₂ düzeylerini düşürmüştür (Quest ve Wilson, 1998). TP reseptörü bulunmayan farelerde Ang-II ve non-selektif NOS inhibitörü L-NAME ile indüklenen hipertansiyon modelleri oluşturulduğunda ise kan basıncındaki artışın kontrol farelerine göre anlamlı düzeyde düşük olduğu bulunmuştur (Francois ve ark., 2004; Francois ve ark., 2008). İlginç olarak, dirençli hipertansiyon gelişimi olan insanlarda, TxA₂'ye cevaben koroner arterde ve safen

vende meydana gelen kasılma yanıtının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu yanıtın TP reseptör ekspresyon düzeyinden bağımsız geliştiği ve by-pass cerrahisinden sonraki dönemde koroner mikrovasküler fonksiyonla yakından ilgili olduğu bildirilmiştir (Özen ve ark., 2020; Sabe ve ark., 2024).

Sistemik hipertansiyona benzer şekilde gebeliğin hipertansif hastalığı olan preeklampside de serum ve idrar örneklerinde TxA_2 metaboliti olan TxB_2 'nin kontrol bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu bildirilmiştir (Chavarria ve Reyes, 2004). Öte yandan, gebe sıçanlarda yapılan çalışmalarda mezenterik arter tarafından üretilen TxA_2 miktarının gestasyonel hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu ve TxA_2 'nin hem direkt kendi reseptörleri üzerinden kasılmaya neden olduğu, hem de Endotelin-1 aracılı kasılma yanıtlarını potansiyelize ederek vasküler direnci arttırdığı gösterilmiştir (Amraoui ve ark., 2014; Goulopoulou ve ark., 2016; Osikoya ve ark., 2017). Önemli olarak, preeklampsi geliştirme riski yüksek olan gebelere düşük doz aspirin tedavisi tavsiye edilmektedir (Roberts ve ark., 2013; Henderson ve ark., 2014). Aspirinin TxA_2 üretimini baskılayıcı etkisinin olduğu göz önüne alındığında TxA_2 'nin preeklampsi patogenezinde önemli rol oynayabileceği fikri güçlenmektedir.

Eritrositler, temel olarak dokuya oksijen taşıyan hücreler olarak bilinse de son 30 yılda yapılan çalışmalar, eritrositlerin kan akımının düzenlenmesinde ve kan basıncının kontrolünde önemli görevler üstlendiğini göstermiştir (Wood K. C. ve ark., 2013). Eritrositler, bir yandan mekanik davranışları (deformabilite ve agregasyon) ile kan viskozitesini ve kanın akışkanlığını belirlerken; diğer yandan plazmaya salgıladığı vazoaaktif maddeler olan ATP ve NO sayesinde kan basıncının, doku perfüzyonunun ve kalp fonksiyonlarının düzenlenmesine aracılık eder (Ellsworth ve ark., 1995; Sprague ve ark., 1998; Cosby ve ark., 2003; Patel ve Gladwin, 2004; Sprague ve ark., 2009). Eritrositlerden hipoksi ve mekanik stres koşullarında salınan vazoaaktif moleküller, endotelden bağımsız ya da endotel aracılı mekanizmalarla damar düz kasında gevşemeye ve kan akımında artışa neden olmaktadır (Datta ve ark., 2004; Diesen ve ark., 2008; Ulker ve ark., 2013). Eritrositlerde eNOS enzimi aracılı üretilen NO'nun kan basıncının düzenlenmesinde neredeyse endotel kaynaklı NO kadar öneme sahip olduğu, eritrosit eNOS enzimi

bulunmayan fareler de ise hipertansiyon geliştiği kanıtlanmıştır (Sprague ve ark., 2009; Cortese-Krott ve ark., 2012; Liu ve ark., 2013). Eritrositlerden ATP salınımına bağlı olarak gerçekleşen vazodilatasyon ise, ‘hipoksik vazodilatasyon’un temel mekanizmaları arasında yer almaktadır (Ellsworth ve ark., 1995; Sprague ve ark., 1998; Datta ve ark., 2004; Sprague ve ark., 2009).

Eritrositlerin vasküler tonusun düzenlenmesindeki rollerini araştıran çalışmaların neredeyse hepsi eritrosit aracılı vazodilatasyon mekanizmasına odaklanmış olup; eritrositlerin vazokonstriksiyon mekanizmasına aracılık edip etmediği bu çalışmaya kadar ayrıntılı şekilde incelenmemiştir. Oysa, fenilefrin varlığında damar segmentlerine eritrositlerin eklenmesiyle damar tonusunun arttığını bildiren çalışmalar literatürde mevcuttur (Vedernikov ve ark., 1998; Diesen ve ark., 2008; Liu ve ark., 2013). Bu konudaki ilk çalışma, 1998 yılında Vedernikov ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Çalışmada, normotansif Wistar-Kyoto ve spontan hipertansif sıçanlardan alınan aort halkaları damar banyosuna asılmış ve damar banyolarına yine bu sıçanlardan alınan eritrosit süspansiyonları artan konsantrasyonlarda eklenmiştir. Eritrosit süspansiyonlarının damar banyolarına eklenmesiyle aort halkalarının geriminin arttığı, bu artışın ise endotel sıyrılmasıyla daha belirgin hale geldiği bildirilmiştir. Çalışmanın devamında ise serbest hemoglobin üzerinde durulmuş ve deneylerde gözlenen kasılma yanıtının oksihemoglobin tarafından uyarıldığı tartışılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar ise, hipoksik koşullarda eritrosit aracılı vazodilatasyonun araştırılması için planlanan çalışmalardır. Bu çalışmalarda, aort halkaları fenilefrin ile ön kasılmaya tabii tutulmuş, damar gerimleri platoya ulaştığı anda ise ortama eritrositler eklenmiştir. Deneylerde, hipoksik koşullarda önce kısa süreli bir gevşeme yanıtı gelişmiş, ardından kararlı bir kasılma gözlenmiştir. Normoksik koşullarda ise, eritrositlerin eklenmesiyle direkt kasılma yanıtı alınmıştır (Liu ve ark., 2013). Bu çalışmalarda, organ banyosuna eritrosit eklenmesiyle oluşan kasılma yanıtı, Hb’nin NO süpürücüsü etkisine bağlansa da (Vedernikov ve ark., 1998; Diesen ve ark., 2008; Ulker ve ark., 2013), daha sonra yapılan araştırmalarda Hb’nin kasılmaya neden olabilmesi için plazmada serbest olması gerektiği bildirilmiştir (Baek ve ark., 1996; Gladwin ve ark., 2012; Omar ve ark., 2015). Dolayısıyla, fenilefrin varlığında damar banyosuna eritrosit eklenmesiyle oluşan kasılma yanıtının mekanizması bilinmemektedir.

Tez çalışmamızın ise eritrosit kaynaklı vazokonstriksiyon mekanizması hedef alınarak planlanmış olması ve sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerden salgılanan bir mediatörün (TxA₂) sağlıklı sıçan aort halkalarında vazokonstriksiyona neden olduğunu göstermesiyle literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır. Deneylerimiz kapsamında, sağlıklı sıçanlardan elde edilen aort segmentlerinde fenilefrin aracılı vasküler kasılma yanıtları hem sadece Krebs solüsyonu varlığında hem de hematokriti %40'a ayarlanmış (Krebs solüsyonu içinde) eritrosit süspansiyonları varlığında test edilmiştir. Deneylerimizde kullanılan eritrosit süspansiyonları lökosit ve trombosit içermediği için, damar banyolarında kullanılan Krebs solüsyonu ile eritrosit süspansiyonu arasındaki tek fark, süspansiyon ortamında eritrositlerin bulunmasıdır. Dolayısıyla, Krebs solüsyonu varlığında elde edilen veriler fenilefrinin damar düz kasında direkt kendi reseptörleri üzerinden oluşturduğu kasılma yanıtını; eritrosit süspansiyonu varlığında elde edilen veriler ise fenilefrinin hem damarda direkt oluşturduğu yanıtı hem de eritrositler aracılığıyla oluşturduğu yanıtları kapsamaktadır.

Damar banyolarında elde edilen fenilefrin konsantrasyon-yanıt eğrileri değerlendirildiğinde, sadece Krebs solüsyonuna kıyasla eritrosit süspansiyonlarının bulunduğu ortamda alınan kasılma yanıtlarının yaklaşık 1,5 kat yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.1). Deneyler sırasında süspansiyon ortamında serbest Hb bulunmadığı ve hemoliz gerçekleşmediği doğrulanmıştır. Bu nedenle, deneylerimizde eritrosit süspansiyonları varlığında oluşan fazla kasılma yanıtı, serbest hemoglobinin NO tüketici etkisinden bağımsız gelişmiştir. Verilerimiz, ilk defa fenilefrinin aort segmentlerinde oluşturduğu vazokonstriksiyon yanıtında eritrositlerin de fonksiyonel bir öneme sahip olduğunu göstermektedir.

Süspansiyon ortamındaki eritrosit miktarının fenilefrinin damarda oluşturduğu vazokonstriksiyon yanıtına etkisinin incelenmesi için; %10, %25, %40 ve %55 hematokrit değerine sahip eritrosit süspansiyonları varlığında deneyler tekrarlanmıştır. Deney sonuçlarımız, eritrosit süspansiyonlarının hematokrit değeri arttıkça aort halkalarında gelişen vazokonstriksiyon yanıtının da arttığını göstermiştir. Hematokrit değerinin %40'ın üzerine çıkarılması ise vazokonstriksiyona ek bir katkı sağlamamıştır (Şekil 4.3). Bu sonuç, fizyolojik hematokrit değerlerinde en yüksek etkinin geliştiğini göstermiş ve bunun da TxA₂

reseptör doygunluğuna ulaşılmasından kaynaklanabileceğini dūřındırmıřtır. Ayrıca plazma ve süpernatant varlığında deneyler tekrarlandığında, eritrosit yokluğunda, fenilefrin aracılı kasılmadaki artış ortadan kalkmıştır (şekil 4.4).

Deneyssel araştırmalarda adrenerjik uyarıyı sağlamak için kullanılan fenilefrin, normal fizyolojik fonksiyona uygun sempatik etki gōsteren, katekolamin olmayan sentetik bir maddedir. Etkisini başlıca efektör organlardaki postsinaptik α_1 -AR'leri etkileyerek ve hücre içi Ca^{+2} seviyelerini arttırarak gōsterir (Mycek ve ark., 1998). Eritrositlerde adrenerjik reseptörlerin varlığı ise, daha önce yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda, norepinefrin ve fenilefrinin eritrositlerdeki α_1 reseptörlerin uyardığı ve eritrosit agregasyonunun arttığı gōrölmüřtür (Muravyov ve Tikhomirova, 2014; Volodchenko ve ark., 2014). Ancak, eritrositlerin adrenerjik agonist aracılı vasküler kasılma yanıtlarında fonksiyonel bir öneme sahip olup olmadığı bu çalışmaya kadar araştırılmamıştır. Projemiz kapsamında fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarına adrenerjik reseptörlerin etkisini araştırmak amacıyla, deneyler selektif α_1 ve non-selektif β adrenoseptör antagonisti Carvedilol varlığında tekrarlanmıştır. Hem Krebs hem de eritrosit süspansiyonu gruplarında Carvedilol varlığında fenilefrinin uygulanan bütün konsantrasyonlarına cevaben gelişen kasılma yanıtları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ($p < 0.001$) (şekil 4.5). Bu sonuçlar, deneylerimizde fenilefrin aracılı gelişen kasılma yanıtlarının adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu ile gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Bununla birlikte, damar banyosunda Krebs solüsyonu bulunan koşullarda fenilefrine cevaben oluşan kasılma yanıtlarının 1 ve 10 μM Carvedilol varlığında tamamen ortadan kalktığı gōrölmektedir. Ancak, damar banyosunda eritrosit süspansiyonun bulunduğu koşullarda ise, 1 ve 10 μM Carvedilol, yüksek fenilefrin konsantrasyonlarında meydana gelen kasılma yanıtlarını tamamen ortadan kaldıramamıştır. Özellikle, fenilefrinin 10^{-5} M konsantrasyondan itibaren aort halkalarında kasılma yanıtına neden olduğu gōrölmektedir. Deneylerimizde kullanılan en yüksek fenilefrin konsantrasyonu olan 3×10^{-4} M varlığında ölçölen damar gerimi ise, fenilefrinin en dūřuk dozu olan 10^{-9} M konsantrasyona kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.01$) (şekil 4.5). Krebs solüsyonu ve eritrosit süspansiyonu gruplarında gözlenen bu farklılık, eritrositlerin kasılma yanıtlarına katkısı ile ilişkili olabilir ve deneylerimizde kullanılan en yüksek Carvedilol konsantrasyonu olan 10

μM , fenilefrin aracılı kasılma yanıtını yüksek konsantrasyonlarında önlemeye yetmiyor olabilir.

Çalışmanın devamında, eritrositlerin hangi mekanizmaları kullanarak fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarına katkı sağladığı araştırılmıştır. Adrenerjik reseptörlerin uyarımı ile çeşitli hücrelerde AA yolağının aktifleştiği gösterilmiştir (Ben Cheikh ve ark., 2002; Schlachetzki ve ark., 2010). Eritrositlerin, trombositlere benzer şekilde, protein sentezinde rol alan organelleri içermediği ancak, vazokonstriktör lipid mediatör üretebilecek aktif PLA_2 -COX yolağı bileşenlerine sahip olduğu daha önce gösterilmiştir. Öte yandan, eksojen olarak AA uygulamasının eritrositlerde prostanoid sentezini arttırdığı bulunmuştur (Rocca ve ark., 2004; Wischmann ve ark., 2020). Bununla birlikte, eritrositlerin trombositler ile inkübasyonunun trombosit aktivasyonunu arttırdığı, ortama COX inhibitörü aspirin eklenmesinin ise trombosit aktivasyonunu tamamen inhibe ettiği bildirilmiştir (Gladwin, 2006; Badimon ve ark., 2021). Ancak, bugüne kadar eritrositlerde TxAS enziminin varlığı ve olgun eritrositler tarafından TxA_2 üretimine dair direkt kanıt gösterilmediği gibi, eritrosit aracılı vazokonstriksiyonda TxA_2 'nin nasıl bir rolü olabileceği de araştırılmamıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak, tez projemiz kapsamında fenilefrinin eritrositlerde AA yıkımına neden olan yolakları aktifleştirmesi olasılığı üzerinde durulmuş ve PLA_2 -COX yolağı ve bu yolaklarla oluşan vazokonstriktör mediatörler olan TxA_2 ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ hedef alınmıştır. Bu amaçla, sırasıyla COX enzim inhibitörü İndometazin, TxAS enzim inhibitörü Dazoxiben TxA_2 reseptör antagonisti GR32191B, ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ reseptör antagonisti AL8810 varlığında deneylerimiz tekrarlanmıştır.

COX inhibisyonun fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarına etkisini incelemek amacıyla, damar banyosunda Krebs solüsyonu ya da eritrosit süspansiyonlarının bulunduğu koşullarda ortama non-spesifik COX inhibitörü indometazin eklenmiş ve 20 dk inkübasyonun ardından fenilefrin aracılı oluşan kasılma yanıtları incelenmiştir. COX inhibisyonu, eritrosit süspansiyonlarının varlığında damarda oluşan fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürmüştür. Önemli olarak, bu koşullarda alınan kasılma yanıtları, sadece Krebs solüsyonu varlığında alınan yanıtlara tamamen benzerdir. Bu sonuç, eritrositlerin fenilefrin aracılı kasılma yanıtına katkısının COX inhibisyonu ile tamamen ortadan kaldırıldığını göstermekte ve literatürde ilk defa COX enziminin eritrosit aracılı vazokonstriksiyon

mekanizmasında önemli bir rol oynadığını kanıtlamaktadır (Şekil 4.6C). Öte yandan, sadece krebs solüsyonu varlığında fenilefrin konsantrasyon-yanıt eğrileri değerlendirildiğinde, COX inhibisyonunun damar geriminde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür (Şekil 4.6A). Bu sonuç, bizim çalışmamızda Krebs solüsyonu varlığında yapılan deneylerde, fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarında COX enziminin bir rolü olmadığını göstermektedir. Literatürde, Krebs solüsyonu varlığında yapılan çalışmalarda fenilefrin aracılı kasılma mekanizmasında COX enziminin rolüne dair farklı bulgular yer almaktadır. Örneğin, COX inhibisyonu sıçan torasik aort segmentlerinde fenilefrin aracılı vazokonstriksiyonda herhangi bir değişikliğe neden olmazken; mezenterik arter ve femoral arterde bu yanıtı anlamlı düzeyde düşürmüştür (Lamb ve ark., 1994; Castillo-Hernandez ve ark., 2010a; Castillo-Hernandez ve ark., 2010b). α_1 -AR aktivasyonu ile gerçekleşen vazokonstriksiyon yanıtı, deneylerde kullanılan deneklerin türü, cinsiyeti, yaşı ve vasküler yatağın yapısal özellikleri gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Bunun en önemli nedenleri arasında ise, damar yataklarında α_1 -AR alt tipleri, bu reseptörlerin sayısı ve agonist afinitesi ile etkinleştirdiği hücre içi sinyal yollarının farklılık göstermesidir (Bobadilla ve ark., 1997; Richardson ve ark., 2003).

Çalışmamızın devamında, TxA_2 üretimindeki son enzimatik basamak olan TxAS enzimi hedef alınmış ve TxAS enzim inhibitörü Dazoxiben varlığında deneyler tekrarlanmıştır. Deneylerimizin sonuçları, TxA_2 üretiminin engellendiği koşullarda eritrosit aracılı kasılma yanıtlarında anlamlı düzeyde azalma olduğu ancak eritrositlerin damar kasılma yanıtlarına katkısının tamamen ortadan kalkmadığı görülmüştür (Şekil 4.7C). TP reseptörünün en potent agonisti TxA_2 olsa da TxA_2 öncülü olan PGH_2 'nin TP reseptörüne düşük afiniteyle bağlanarak reseptörü aktive ettiği bildirilmiştir (Mayeux ve ark., 1988; Kent ve ark., 1993; Halushka, 2000; Sellers ve Stallone, 2008). Özellikle, TxAS enziminin inhibe edildiği koşullarda PGH_2 'nin dokuda birikerek TP reseptörleri üzerinden vazokonstriksiyona neden olduğu gösterilmiştir. Öte yandan, yüksek oksidatif stres koşullarında AA'nın peroksidasyonu ile oluşan izoprostanların ve yüksek konsantrasyonlarda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve PGI_2 'nin de TP reseptörleri üzerinden vazokonstriksiyona neden olabileceği de bildirilmiştir (Mayeux ve ark., 1988; Sellers ve Stallone, 2008). Bizim deney koşullarımızda yüksek oksidatif strese bağlı AA peroksidasyonu ve izoprostan oluşumu beklenmemektedir. Bununla birlikte, TxAS inhibitörlerinin PGI_2 üretimini

tetikleyebileceği bildirilmiştir. Proje kapsamında süspansiyon ortamında PGI_2 ve PGH_2 ölçümü yapılmamıştır. Bu nedenlerle, çalışmamızda TxA_2 inhibisyonu ile eritrosit aracılı vazokonstriksiyonun tamamen önlememesinin nedeninin, PGH_2 veya PGH_2 aracılı gerçekleşen vazokonstriksiyon olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında bir sonraki basamak, TxA_2 'nin etkilerine aracılık eden TP reseptörünün, deneylerimizdeki kasılma yanıtlarına etkisinin incelenmesidir. Bu amaçla, Krebs ya da eritrosit süspansiyonlarının bulunduğu koşullarda damar banyolarına TP reseptör inhibitörü GR32191B eklenmiş ve inkübasyon periyodunun ardından fenilefrin kasılma yanıtları incelenmiştir. GR32191B, eritrosit süspansiyonları varlığında oluşan fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarını Krebs solüsyonu varlığında oluşan seviyelere kadar düşürmüştür. Bu sonuç, fenilefrin ile uyarılan ve eritrosit aracılı gerçekleşen damar kasılma yanıtlarının TxA_2 reseptör inhibisyonu ile tamamen ortadan kalktığını göstermektedir ($p<0,001$) (Şekil 4.8).

TxA_2 reseptörü olan TP, trombositler, vasküler düz kas ve endotel hücreleri, kardiyak miyositler ve epitel hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli doku ve hücrelerde eksprese edilen bir GPCR'dir (Nakahata, 2008). TP reseptörünün aktivitesiyle G_q ve $G_{12/13}$ proteinlerinin aktive olduğu gösterilmiştir. G_q reseptörünün aktivasyonu, PLC stimülasyonu ile IP_3 ve DAG üretimine ve hücre içinde Ca^{+2} artışına neden olur. Diğer taraftan, $G_{12/13}$ ise Rho/Rho-kinaz aktivasyonuna ve miyozin ince zincirinin fosforilasyonuna neden olur. Bu şekilde, TP reseptörünün aktivasyonu hem kasılmaya hem de relaksasyonun inhibisyonuna neden olur. Bunlarla birlikte, TP reseptörünün aktivasyonu ile fosfodiesteraz enziminin aktive olarak hücrede cAMP ve cGMP miktarlarında azalma olduğu, bunun yanında NOS inhibisyonu ile NO üretimini azalttığı gösterilmiştir (Shenker ve ark., 1991; Yamada ve ark., 2003; Chen, 2018; Özen ve ark., 2020). Ayrıca, TxA_2 'nin NOX enzimlerini (NOX1, NOX2 ve NOX4) aktive ettiği ve oluşan O_2^{2-} 'nin ise NO'yu peroksinitrite indirgeyerek total NO konsantrasyonunun azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (Muzaffar ve ark., 2004; Muzaffar ve ark., 2006; Muzaffar ve ark., 2011). Bu nedenlerle, TxA_2 sadece güçlü bir vazokonstriktör değil bunun yanında NO biyoyararlanımını azaltan ve böylece endotel disfonksiyonu gelişimine zemin hazırlayan önemli bir faktördür (Sellers ve Stallone, 2008; Ellinsworth ve ark., 2014; Matsumoto ve ark., 2015). Bu projenin amaçları kapsamında TP reseptörü ile ilişkili

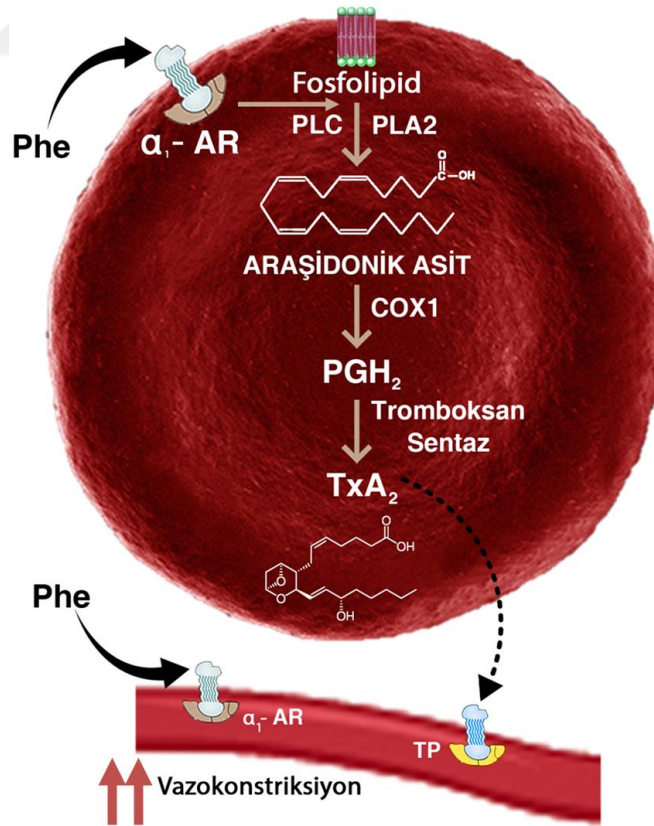
hücre içi sinyal yolları bulunmadığından bu konuda ayrıntılı çalışma yapılamamıştır. Ancak, sonraki çalışmalarımızda fizyolojik ve patolojik koşullarda TP reseptör aktivasyonunun çalışılması planlanmaktadır.

Proje kapsamında, COX aracılığı ile oluşan diğer bir vazokonstriktör mediatör olan $\text{PGF}_{2\alpha}$ 'nın kasılma yanıtlarımıza etkisi de araştırılmıştır. $\text{PGF}_{2\alpha}$ reseptör inhibisyonu, eritrosit süspansiyonları varlığında fenilefrine cevaben oluşan kasılma yanıtlarında bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.9). Bu sonuç, eritrosit aracılı gerçekleşen vazokonstriksiyonda $\text{PGF}_{2\alpha}$ 'nın rol almadığını kanıtlamaktadır. Sadece Krebs solüsyonunun varlığında yapılan deneylerde ise, TxA_2 reseptör inhibitörü, $\text{PGF}_{2\alpha}$ reseptör inhibitörü ya da TxAS inhibitörü fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu sonuçlar, Krebs solüsyonu varlığında oluşan kasılma yanıtlarının sadece adrenerjik reseptörün düz kas hücrelerine etkisiyle gerçekleştiğini göstermektedir. Oysa eritrositler varlığında damarda gerçekleşen kasılma yanıtında ise düz kastaki adrenerjik reseptör aktivitesine ek olarak, eritrosit kaynaklı TxA_2 'de fonksiyonel bir öneme sahiptir.

TxA_2 'nin damar düz kasında vazokonstriksiyona neden olabilmesi için süspansiyon ortamına salınması gereklidir. TxA_2 ise, hızlı bir şekilde enzimatik olmayan bir yolla inaktif bir form olan TxB_2 'ye indirgenmektedir (Hamborg ve diğerleri, 1975). Çalışmamızda, fenilefrin uyarısına cevaben eritrositler tarafından TxA_2 salınıp salınmadığının net olarak tespiti için süspansiyon ortamında ELISA yöntemiyle TxA_2 'nin kararlı bir metaboliti olan TxB_2 ölçümü yapılmıştır (Şekil 4.10). Ölçümlerimiz sonucunda, fenilefrin uyarısına cevaben eritrosit süspansiyonlarında TxB_2 miktarlarının $3245 \pm 568,6$ pg/ml düzeyinde olduğu gösterilmiştir. Sadece Krebs solüsyonunda ise önemli düzeyde TxB_2 saptanmamıştır. İki grup kıyaslandığında ise eritrosit süspansiyonlarında TxB_2 miktarı Krebs solüsyonuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p < 0.001$). Krebs solüsyonu içeren deneylerde ortamın hücresel kısmı sadece aort halkalarında bulunan hücrelerden oluşurken; eritrosit süspansiyonlarında ise bu hücrelere ek olarak ortamda sadece eritrositler bulunmaktadır. Önemli olarak eritrositlerden TxA_2 salınımı, İndometazin, Dazoxiben ve Carvedilol varlığında inhibe olurken TP reseptör antagonisti GR32191B varlığında etkilenmemektedir. Bu sonuçlar, literatürde ilk defa eritrositlerin fenilefrin uyarısıyla COX aracılığı ile TxA_2 üretilmesine neden olduğunu göstermiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu tez çalışmasının bulguları literatürde ilk defa, sağlıklı bireylerden elde edilen eritrositlerin fenilefrine cevaben gelişen vazokonstriksiyon yanıtında önemli bir rol üstlendiğini göstermiştir. Adrenerjik reseptörlerin fenilefrinle uyarımı eritrositlerde COX enzimini aktifleştirerek vazokonstriktör bir mediatör olan TxA_2 üretimine neden olmaktadır. Süspansiyon ortamına salınan eritrosit kaynaklı TxA_2 ise, damar düz kasında spesifik TP reseptörlerine bağlanarak vazokonstriksiyona aracılık etmektedir. Çalışmamızda, fenilefrin aracılı vazokonstriksiyon yanıtlarına odaklanıldığı için kanda epinefrin ve norepinefrinin yükseldiği fizyolojik ve patolojik koşullarda adrenerjik reseptörler aracılığıyla meydana gelen vazokonstriksiyonda eritrositlerin rolü olabileceği ilk defa gündeme gelmiştir. Bulgularımızın son yıllarda oldukça dikkat çeken “eritrosit aracılı vasküler tonusun düzenlenmesi” konusundaki temel bilgilerimize katkı sunacağını ve fizyolojik ve patolojik koşullarda kan basıncının düzenlenmesini konu alan yeni çalışmalara temel oluşturacağını umuyoruz.



Şekil 6. 1. Çalışma sonuçlarını gösteren özet şekil. AR: Adrenoseptör, COX: Siklooksijenaz, TP: Tromboksan reseptörü, FP: Prostaglandin-F reseptörü, Phe: fenilefrin, PLC: Fosfolipaz C, TxA_2 : Tromboksan A_2 .

KAYNAKLAR

Adelman B, Stemerman MB, Mennell D, Handin RI. The interaction of platelets with aortic subendothelium: Inhibition of adhesion and secretion by prostaglandin I₂. Blood. 1981; 58: 198-205.

Akinaga J, Garcia-Sainz JA, A SP. Updates in the function and regulation of $\alpha(1)$ -adrenoceptors. Br J Pharmacol. 2019; 176: 2343-2357.

Akrawinthawong K, Park JW, Piknova B, Sibmooh N, Fucharoen S, Schechter AN. A flow cytometric analysis of the inhibition of platelet reactivity due to nitrite reduction by deoxygenated erythrocytes. Plos One. 2014; 9.

Allan CJ, Higashiura K, Martin M, Morinelli TA, Kurtz DT, Geoffroy O , ve ark. Characterization of the cloned hel cell thromboxane A₂ receptor: Evidence that the affinity state can be altered by G α 13 and G α q. J Pharmacol Exp Ther. 1996; 277: 1132-1139.

Ally AI, Horrobin DF. Thromboxane-A₂ in blood-vessel walls and its physiological significance - relevance to thrombosis and hypertension. Prostaglandins and Medicine. 1980; 4: 431-438.

Alvarez MD, Lorenzetti F. Role of eicosanoids in liver repair, regeneration and cancer. Biochem Pharmacol. 2021; 192.

Amraoui F, Spijkers L, Lahsinoui HH, Vogt L, van der Post J, Peters S , ve ark. Sflt-1 elevates blood pressure by augmenting endothelin-1-mediated vasoconstriction in mice. Plos One. 2014; 9.

Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ , ve ark. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a tpa-modulated trans-acting factor. Cell. 1987; 49: 729-739.

Aoki T, Narumiya S. Prostaglandins and chronic inflammation. Trends Pharmacol Sci. 2012; 33: 304-311.

Ashton AW, Cheng Y, Helisch A, Ware JA. Thromboxane A2 receptor agonists antagonize the proangiogenic effects of fibroblast growth factor-2: Role of receptor internalization, thrombospondin-1, and $\alpha(v)\beta_3$. *Circ Res*. 2004; 94: 735-742.

Ashton AW, Ware JA. Thromboxane A2 receptor signaling inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation and migration. *Circ Res*. 2004; 95: 372-379.

Astarita G, Kendall AC, Dennis EA, Nicolaou A. Targeted lipidomic strategies for oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids. *Bba-Mol Cell Biol L*. 2015; 1851: 456-468.

Babaev VR, Ding L, Reese J, Morrow JD, Breyer MD, Dey SK , ve ark. Cyclooxygenase-1 deficiency in bone marrow cells increases early atherosclerosis in apolipoprotein e- and low-density lipoprotein receptor-null mice. *Circulation*. 2006; 113: 108-117.

Badimon L, Vilahur G, Rocca B, Patrono C. The key contribution of platelet and vascular arachidonic acid metabolism to the pathophysiology of atherothrombosis. *Cardiovasc Res*. 2021; 117: 2001-2015.

Baek SJ, Lee KD, Shen RF. Genomic structure and polymorphism of the human thromboxane synthase-encoding gene. *Gene*. 1996; 173: 251-256.

Basu S, Sjoquist B, Resul B, Stjernschantz J. Presence of a 15-ketoprostaglandin delta-13-reductase in porcine cornea. *Acta Chem Scand*. 1992; 46: 108-110.

Batenburg WW, van Esch JH, Garrelds IM, Jorde U, Lamers JM, Dekkers DH , ve ark. Carvedilol-induced antagonism of angiotensin ii: A matter of α_1 -adrenoceptor blockade. *J Hypertens*. 2006; 24: 1355-1363.

Baturova MA, Sheldon SH, Carlson J, Brady PA, Lin G, Rabinstein AA , ve ark. Electrocardiographic and echocardiographic predictors of paroxysmal atrial fibrillation detected after ischemic stroke. *Bmc Cardiovasc Disor*. 2016; 16.

Belch JJ, Cormie J, Newman P, McLaren M, Barbenel J, Capell H, ve ark. Dazoxiben, a thromboxane synthetase inhibitor, in the treatment of Raynaud's syndrome: A double-blind trial. *Br J Clin Pharmacol*. 1983; 15 Suppl 1: 113S-116S.

Ben Cheikh R, Feray JC, Alaoui A, Crozatier B. Thromboxane α_2 in vasomotor effects of phenylephrine, acetylcholine, and bradykinin in rat mesenteric bed. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002; 40: 255-264.

Bergfeld GR, Forrester T. Release of atp from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovascular Research*. 1992; 26: 40-47.

Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*. 1984; 312: 315-321.

Blackman SC, Dawson G, Antonakis K, Le Breton GC. The identification and characterization of oligodendrocyte thromboxane A₂ receptors. *J Biol Chem*. 1998; 273: 475-483.

Bobadilla RA, Henkel CC, Henkel EC, Escalante B, Hong E. Possible involvement of endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular responses of abdominal aorta from pregnant rats. *Hypertension*. 1997; 30: 596-602.

Bomfim GF, Dos Santos RA, Oliveira MA, Giachini FR, Akamine EH, Tostes RC, ve ark. Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci*. 2012; 122: 535-543.

Boron WF, Boulpaep EL. *Medical physiology e-book*. Elsevier Health Sciences; 2016.

Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 1187-1205.

Boussairi EH, Sacquet J, Sassard J, Benzoni D. Thromboxane α_2 -prostaglandin h_2 and renovascular hypertension in rats. *Am J Physiol*. 1994; 267: R1190-1197.

Bozza PT, Bakker-Abreu I, Navarro-Xavier RA, Bandeira-Melo C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. *Prostag Leukotr Ess*. 2011; 85: 205-213.

Brash AR. Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem.* 1999; 274: 23679-23682.

Braune S, Kupper JH, Jung F. Effect of prostanoids on human platelet function: An overview. *Int J Mol Sci.* 2020; 21.

Buzzard CJ, Pfister SL, Campbell WB. Endothelium-dependent contractions in rabbit pulmonary artery are mediated by thromboxane a₂. *Circ Res.* 1993; 72: 1023-1034.

Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, et al. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 1994; 46: 121-136.

Carvalho MH, Fortes ZB, Nigro D, Oliveira MA, Scivoletto R. The role of thromboxane a₂ in the altered microvascular reactivity in two-kidney, one-clip hypertension. *Endothelium.* 1997; 5: 167-178.

Castillo-Hernandez MC, Guevara-Balcazar G, Lopez-Sanchez P, Asbun-Bojalil J, Lopez RM, Castillo EF, Castillo-Henkel C. The influence of constitutive cox-2 in smooth muscle tissue on the contractile effect of phenylephrine in the rat abdominal aorta. *Front Biosci (Elite Ed).* 2010a; 2: 441-448.

Castillo-Hernandez MC, Martinez-Godinez MA, Guevara-Balcazar G, Miliar-Garcia A, Mancilla J, Lopez-Mayorga RM, et al. Extraendothelial and constitutive cox-2 expression is involved in the contractile effect of angiotensin ii in the rat aorta. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2010b; 30: 205-211.

Cavalli A, Lattion AL, Hummler E, Nenniger M, Pedrazzini T, Aubert JF, et al. Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha(1b)-adrenergic receptor. *P Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 11589-11594.

Cawello W, Schweer H, Muller R, Bonn R, Seyberth HW. Metabolism and pharmacokinetics of prostaglandin e₁ administered by intravenous infusion in human subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 1994; 46: 275-277.

Chan PS, Cervoni P. Prostaglandins, prostacyclin, and thromboxane in cardiovascular-diseases. *Drug Develop Res.* 1986; 7: 341-359.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. Cox-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 13926-13931.

Chavarria ME, Reyes A. Prostacyclin/thromboxane early changes in pregnancies that are complicated by preeclampsia - reply. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190: 1168-1169.

Chen H. Role of thromboxane A₂ signaling in endothelium-dependent contractions of arteries. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2018; 134: 32-37.

Christman BW, Mcpherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary-hypertension. *New Engl J Med.* 1992; 327: 70-75.

Chu LY, Liou JY, Wu KK. Prostacyclin protects vascular integrity via ppar/14-3-3 pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015; 118-119: 19-27.

Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazia M, De Cesare D, et al. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E-dependent plaque instability. *Circulation.* 2001; 104: 921-927.

Coker SJ. Further evidence that thromboxane exacerbates arrhythmias - effects of uk38485 during coronary-artery occlusion and reperfusion in anesthetized greyhounds. *J Mol Cell Cardiol.* 1984; 16: 633-641.

Coleman J. Prostanoids and their receptors. *Comprehensive medicinal chemistry.* 1989; 3: 643-714.

Colling KP, Banton KL, Beilman GJ. Vasopressors in sepsis. *Surg Infect (Larchmt).* 2018; 19: 202-207.

Cook DJ, Finnigan JD, Cook K, Black GW, Charnock SJ. Cytochromes p450: History, classes, catalytic mechanism, and industrial application. *Adv Protein Chem Str.* 2016; 105: 105-126.

Cortese-Krott MM, Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocrine function? *Redox Biol.* 2014; 2: 251-258.

Cortese-Krott MM, Rodriguez-Mateos A, Sansone R, Kuhnle GG, Thasian-Sivarajah S, Krenz T, ve ark. Human red blood cells at work: Identification and visualization of erythrocytic enos activity in health and disease. *Blood.* 2012; 120: 4229-4237.

Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, ve ark. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med.* 2003; 9: 1498-1505.

Cracowski JL, Durand T. Cardiovascular pharmacology and physiology of the isoprostanes. *Fund Clin Pharmacol.* 2006; 20: 417-427.

Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res.* 1999; 59: 4574-4577.

Dannhardt G, Kiefer W. Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. *Eur J Med Chem.* 2001; 36: 109-126.

Datta B, Tufnell-Barrett T, Bleasdale RA, Jones CJH, Beeton I, Paul V, ve ark. Red blood cell nitric oxide as an endocrine vasoregulator - a potential role in congestive heart failure. *Circulation.* 2004; 109: 1339-1342.

de Sotomayor MA, Perez-Guerrero C, Herrera MD, Jimenez L, Marin R, Marhuenda E, Andriantsitohaina R. Improvement of age-related endothelial dysfunction by simvastatin: Effect on no and cox pathways. *Br J Pharmacol.* 2005; 146: 1130-1138.

de Wit C, Griffith TM. Connexins and gap junctions in the edhf phenomenon and conducted vasomotor responses. *Pflugers Arch.* 2010; 459: 897-914.

Deer RR, Stallone JN. Effects of estrogen on cerebrovascular function: Age-dependent shifts from beneficial to detrimental in small cerebral arteries of the rat. *Am J Physiol-Heart C*. 2016; 310: H1285-H1294.

del Campo L, Sagredo A, Aras-Lopez R, Balfagon G, Ferrer M. Orchidectomy increases the formation of non-endothelial thromboxane A2 and modulates its role in the electrical field stimulation-induced response in rat mesenteric artery. *J Endocrinol*. 2008; 197: 371-379.

Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase a2 enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev*. 2011; 111: 6130-6185.

Devillier P, Bessard G. Thromboxane A2 and related prostaglandins in airways. *Fundam Clin Pharmacol*. 1997; 11: 2-18.

Diesen DL, Hess DT, Stamler JS. Hypoxic vasodilation by red blood cells: Evidence for an s-nitrosothiol-based signal. *Circ Res*. 2008; 103: 545-553.

Dogne JM, de Leval X, Benoit P, Delarge J, Masereel B. Thromboxane A2 inhibition: Therapeutic potential in bronchial asthma. *Am J Respir Med*. 2002; 1: 11-17.

Doroudi R, Gan LM, Selin Sjogren L, Jern S. Effects of shear stress on eicosanoid gene expression and metabolite production in vascular endothelium as studied in a novel biomechanical perfusion model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 269: 257-264.

Ellinsworth DC, Shukla N, Fleming I, Jeremy JY. Interactions between thromboxane a2, thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization. *Cardiovascular Research*. 2014; 102: 9-16.

Ellsworth ML, Forrester T, Ellis CG, Dietrich HH. The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am J Physiol-Heart C*. 1995; 269: H2155-H2161.

Esser-von Bieren J. Eicosanoids in tissue repair. *Immunol Cell Biol*. 2019; 97: 279-288.

Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CRH, Shimizu T, ve ark. Update of the lipid maps comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 2009; 50: S9-S14.

Farhat MY, Ramwell PW. Estradiol potentiates the vasopressor response of the isolated perfused rat lung to the thromboxane mimic U-46619. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; 261: 686-691.

Farrukh IS, Michael JR, Summer WR, Adkinson NF, Jr., Gurtner GH. Thromboxane-induced pulmonary vasoconstriction: Involvement of calcium. *J Appl Physiol* (1985). 1985; 58: 34-44.

Fava C, Bonafini S. Eicosanoids via CYP450 and cardiovascular disease: Hints from genetic and nutrition studies. *Prostag Oth Lipid M.* 2018; 139: 41-47.

Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: Cox-1 and cox-2 products. *Brit J Pharmacol.* 2011; 164: 894-912.

Feng JF, Rhee SG, Im MJ. Evidence that phospholipase delta1 is the effector in the gh (transglutaminase ii)-mediated signaling. *J Biol Chem.* 1996; 271: 16451-16454.

Ferraris V, Smith JB, Silver MJ. Radioimmunoassay of thromboxane-B2. *Thromb Haemostasis.* 1977; 38: 20-20.

Feuerstein N, Ramwell PW. OKY-1581, a potential selective thromboxane synthetase inhibitor. *Eur J Pharmacol.* 1981; 69: 533-534.

Fitzgerald DJ, Rocki W, Murray R, Mayo G, FitzGerald GA. Thromboxane A2 synthesis in pregnancy-induced hypertension. *Lancet.* 1990; 335: 751-754.

Folger WH, Lawson D, Wilcox CS, Mehta JL. Response of rat thoracic aortic rings to thromboxane mimetic u-46619 - roles of endothelium-derived relaxing factor and thromboxane-A2 release. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1991; 258: 669-675.

Fraenkel G, Blewett M. Linoleic acid and arachidonic acid in the metabolism of two insects, *ephestia kuehniella* (lep.) and *tenebrio molitor* (col.). *Biochemical Journal.* 1947; 41: 475.

Francois H, Athirakul K, Mao L, Rockman H, Coffman TM. Role for thromboxane receptors in angiotensin-ii-induced hypertension. *Hypertension*. 2004; 43: 364-369.

Francois H, Makhanova N, Ruiz P, Ellison J, Mao L, Rockman HA, Coffman TM. A role for the thromboxane receptor in L-name hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 295: F1096-1102.

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The g-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 2003; 63: 1256-1272.

Fukushima M. Prostaglandin J2--anti-tumour and anti-viral activities and the mechanisms involved. *Eicosanoids*. 1990; 3: 189-199.

Galipeau D, Arikawa E, Sekirov I, McNeill JH. Chronic thromboxane synthase inhibition prevents fructose-induced hypertension. *Hypertension*. 2001; 38: 872-876.

Garcia-Redondo AB, Briones AM, Martinez-Revelles S, Palao T, Vila L, Alonso MJ, Salaices M. C-src, ERK1/2 and Rho kinase mediate hydrogen peroxide-induced vascular contraction in hypertension: Role of TxA2, NAD(P)H oxidase and mitochondria. *J Hypertens*. 2015; 33: 77-87.

Gisbert R, Ziani K, Miquel R, Noguera MA, Ivorra MD, Anselmi E, D'Ocon P. Pathological role of a constitutively active population of α -adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Brit J Pharmacol*. 2002; 135: 206-216.

Griffin BW, Klimko P, Crider JY, Sharif NA. Al-8810: A novel prostaglandin F2 alpha analog with selective antagonist effects at the prostaglandin F2 alpha (FP) receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1999; 290: 1278-1284.

Gladwin MT. Role of the red blood cell in nitric oxide homeostasis and hypoxic vasodilation. *Adv Exp Med Biol*. 2006; 588: 189-205.

Gladwin MT, Kanas T, Kim-Shapiro DB. Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease. *J Clin Invest*. 2012; 122: 1205-1208.

Gomez I, Foudi N, Longrois D, Norel X. The role of prostaglandin E in human vascular inflammation. *Prostag Leukotr Ess*. 2013; 89: 55-63.

Goulopoulou S, Wenceslau CF, McCarthy CG, Matsumoto T, Webb RC. Exposure to stimulatory cpg oligonucleotides during gestation induces maternal hypertension and excess vasoconstriction in pregnant rats. *Am J Physiol-Heart C*. 2016; 310: H1015-H1025.

Gresele P, Deckmyn H, Nenci GG, Vermynen J. Thromboxane synthase inhibitors, thromboxane receptor antagonists and dual blockers in thrombotic disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 1991; 12: 158-163.

Griswold DE, Adams JL. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): Rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev*. 1996; 16: 181-206.

Gross S, Tilly P, Hentsch D, Vonesch JL, Fabre JE. Vascular wall-produced prostaglandin E₂ exacerbates arterial thrombosis and atherothrombosis through platelet EP₃ receptors. *Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204: 311-320.

Guyton AC, Granger HJ, Coleman TG. Circulation - overall regulation. *Annu Rev Physiol*. 1972; 34: 13-+.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998; 279: 509-514.

Halushka PV. Thromboxane receptors: Where have you gone? *Prostag Oth Lipid M*. 2000; 60: 175-189.

Hamberg M, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides - novel transformations of arachidonic-acid in human platelets. *P Natl Acad Sci USA*. 1974; 71: 3400-3404.

Hamberg M, Samuelsson B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70: 899-903.

Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975; 72: 2994-2998.

Hamberg M, Svensson J, Wakabayashi T, Samuelsson B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1974; 71: 345-349.

Hanasaki K, Nakano K, Kasai H, Kurihara H, Arita H. Identification of thromboxane A2 receptor in cultured vascular endothelial-cells of rat aorta. *Biochem Bioph Res Co*. 1988; 151: 1352-1357.

Harenberg A, Girkontaite I, Giehl K, Fischer KD. The lsc rhogef mediates signaling from thromboxane A2 to actin polymerization and apoptosis in thymocytes. *Eur J Immunol*. 2005; 35: 1977-1986.

Haurand M, Ullrich V. Isolation and characterization of thromboxane synthase from human-platelets as a cytochrome-p-450 enzyme. *J Biol Chem*. 1985; 260: 5059-5067.

He GW, Yang CQ. Effect of thromboxane A2 antagonist GR32191b on prostanoid and nonprostanoid receptors in the human internal mammary artery. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995; 26: 13-19.

Henderson JT, O'Connor E, Whitlock EP. Low-dose aspirin for prevention of morbidity and mortality from preeclampsia response. *Ann Intern Med*. 2014; 161: 613-614.

Hennenberg M, Stief CG, Gratzke C. Prostatic alpha1-adrenoceptors: New concepts of function, regulation, and intracellular signaling. *Neurourol Urodyn*. 2014; 33: 1074-1085.

Hernanz R, Martínez-Revelles S, Palacios R, Martín A, Cachofeiro V, Aguado A , ve ark. Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin ii-induced hypertension. *Brit J Pharmacol*. 2015; 172: 3159-3176.

Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ , ve ark. International union of pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: Consensus update. *Pharmacol Rev*. 1995; 47: 267-270.

Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y , ve ark. Prostaglandin d2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. J Exp Med. 2001; 193: 255-261.

Hiraku S, Taniguchi K, Wakitani K, Omawari N, Kira H, Miyamoto T , ve ark. Pharmacological studies on the TxA2 synthetase inhibitor (e)-3-[p-(1h-imidazol-1-ylmethyl)phenyl]-2-propenoic acid (OKY-046). Japanese Journal of Pharmacology. 1986; 41: 393-401.

Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S. Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane-A2 receptor. Nature. 1991; 349: 617-620.

Hirata T, Kakizuka A, Ushikubi F, Fuse I, Okuma M, Narumiya S. Arg60 to leu mutation of the human thromboxane A2 receptor in a dominantly inherited bleeding disorder. J Clin Invest. 1994; 94: 1662-1667.

Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, Okuma M, Narumiya S. Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to arg60 to leu mutation. J Clin Invest. 1996; 97: 949-956.

Hosoda C, Koshimizu T, Tanoue A, Nasa Y, Oikawa R, Tomabechi T , ve ark. Two α -adrenergic receptor subtypes regulating the vasopressor response have differential roles in blood pressure regulation. Mol Pharmacol. 2005; 67: 912-922.

Houslay MD, Bojanic D, Wilson A. Platelet activating factor and u44069 stimulate a gtpase activity in human platelets which is distinct from the guanine nucleotide regulatory proteins, α and β . Biochem J. 1986; 234: 737-740.

Houston DS, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Aggregating human-platelets cause direct contraction and endothelium-dependent relaxation of isolated canine coronary-arteries - role of serotonin, thromboxane-A2 and adenine-nucleotides. J Clin Invest. 1986; 78: 539-544.

Hrometz SL, Edelmann SE, McCune DF, Olges JR, Hadley RW, Perez DM, Piascik MT. Expression of multiple α 1-adrenoceptors on vascular smooth muscle:

Correlation with the regulation of contraction. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 290: 452-463.

Huang Y, Kong LT, Wang YP, Sun MJ, Cui HF, Zhai HQ , ve ark. Vasorelaxant effect of osthole on isolated thoracic aortic rings in rats. *J Tradit Chin Med.* 2019; 39: 492-501.

Hunt JA, Merritt JE, MacDermot J, Keen M. Characterization of the thromboxane receptor mediating prostacyclin release from cultured endothelial cells. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43: 1747-1752.

Ishizuka T, Kawakami M, Hidaka T, Matsuki Y, Takamizawa M, Suzuki K , ve ark. Stimulation with thromboxane a (TxA₂) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 1998; 112: 464-470.

Jagger JE, Bateman RM, Ellsworth ML, Ellis CG. Role of erythrocyte in regulating local O₂ delivery mediated by hemoglobin oxygenation. *Am J Physiol-Heart C.* 2001; 280: H2833-H2839.

Jentzer JC, Vallabhajosyula S, Khanna AK, Chawla LS, Busse LW, Kashani KB. Management of refractory vasodilatory shock. *Chest.* 2018; 154: 416-426.

Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: A dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature.* 1996; 380: 221-226.

Jiao T, Collado A, Mahdi A, Tengbom J, Tratsiakovich Y, Milne GT , ve ark. Stimulation of erythrocyte soluble guanylyl cyclase induces cgmp export and cardioprotection in type 2 diabetes. *Jacc-Basic Transl Sc.* 2023; 8: 907-918.

Johnson AL, Kauer JC, Sharma DC, Dorfman R. Synthesis of 1-arylimidazoles, a new class of steroid hydroxylation inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1969; 12: 1024-1028.

Jones DA, Fitzpatrick FA. Thromboxane-A₂ synthase - modification during suicide inactivation. *J Biol Chem.* 1991; 266: 23510-23514.

Kamikihara SY, Mueller A, Lima V, Silva AR, da Costa IB, Buratini J, Jr., Pupo AS. Differential distribution of functional α_1 -adrenergic receptor subtypes along the rat tail artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 314: 753-761.

Karla W, Shams H, Orr JA, Scheid P. Effects of the thromboxane- A_2 mimetic, u46619, on pulmonary vagal afferents in the cat. *Resp Physiol*. 1992; 87: 383-396.

Kashiwagi H, Yuhki KI, Imamichi Y, Kojima F, Kumei S, Tasaki Y, et al. Prostaglandin $f_2\alpha$ facilitates platelet activation by acting on prostaglandin e_2 receptor subtype ep_3 and thromboxane A_2 receptor tp in mice. *Thromb Haemost*. 2019; 119: 1311-1320.

Katugampola SD, Davenport AP. Thromboxane receptor density is increased in human cardiovascular disease with evidence for inhibition at therapeutic concentrations by the AT_1 receptor antagonist losartan. *Brit J Pharmacol*. 2001; 134: 1385-1392.

Katusic ZS, Shepherd JT. Endothelium-derived vasoactive factors .2. Endothelium-dependent contraction. *Hypertension*. 1991; 18: S86-S92.

Kennedy I, Coleman RA, Humphrey PP, Levy GP, Lumley P. Studies on the characterisation of prostanoid receptors: A proposed classification. *Prostaglandins*. 1982; 24: 667-689.

Kent KC, Collins LJ, Schwerin FT, Raychowdhury MK, Ware JA. Identification of functional pgH_2 txa_2 receptors on human endothelial-cells. *Circulation Research*. 1993; 72: 958-965.

Keung W, Vanhoutte PM, Man RY. Acute impairment of contractile responses by 17 β -estradiol is $cAMP$ and protein kinase G dependent in vascular smooth muscle cells of the porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol*. 2005; 144: 71-79.

Kinsella BT, O'Mahony DJ, Fitzgerald GA. The human thromboxane a_2 receptor α isoform (TP α) functionally couples to the G proteins G_q and G_{11} in vivo and is activated by the isoprostane 8- epi prostaglandin $F_2\alpha$. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 281: 957-964.

Kitano A, Shimomura T, Takeshima T, Takahashi K. Increased 11-dehydrothromboxane B2 in migraine: Platelet hyperfunction in patients with migraine during headache-free period. *Headache*. 1994; 34: 515-518.

Kitiyakara C, Welch WJ, Verbalis JG, Wilcox CS. Role of thromboxane receptors in the dipsogenic response to central angiotensin ii. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002; 282: R865-869.

Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T , ve ark. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*. 2006; 107: 2943-2951.

Kobayashi T, Suzuki J, Watanabe M, Suzuki S, Yoshida K, Kume K, Suzuki H. Changes in platelet calcium concentration by thromboxane A2 stimulation in patients with nephrotic syndrome of childhood. *Nephron*. 1997; 77: 309-314.

Kozasa T, Jiang XJ, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG , ve ark. P115 rhogef, a GTPase activating protein for $G\alpha$ and $g\alpha$. *Science*. 1998; 280: 2109-2111.

Krishnamoorthy P, Gopalakrishnan A, Mittal V, Kalla A, Slipczuk L, Rangaswami J , ve ark. Gaisbock syndrome (polycythemia and hypertension) revisited: Results from the national inpatient sample database. *Journal of Hypertension*. 2018; 36: 2420-2424.

Lamb VL, Schwartz AJ, Rohn WR, Kaiser L. Cyclooxygenase inhibitors depress norepinephrine constriction of rat abdominal, but not thoracic, aorta. *Eur J Pharmacol*. 1994; 256: 221-226.

Laroche G, Lépine MC, Thériault C, Giguère P, Giguère V, Gallant MA , ve ark. Oligomerization of the α and isoforms of the thromboxane a receptor:: Relevance to receptor signaling and endocytosis. *Cell Signal*. 2005; 17: 1373-1383.

Leo F, Suvorava T, Heuser SK, Li JJ, LoBue A, Barbarino F , ve ark. Red blood cell and endothelial enos independently regulate circulating nitric oxide metabolites and blood pressure. *Circulation*. 2021; 144: 870-889.

Lewis PJ, Dollery CT. Clinical pharmacology and potential of prostacyclin. *Br Med Bull.* 1983; 39: 281-284.

Liel N, Nathan I, Yermiyahu T, Zolotov Z, Lieberman JR, Dvilansky A, Halushka PV. Increased platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors in patients with pregnancy induced hypertension. *Thromb Res.* 1993; 70: 205-210.

Liu Y, Sun CW, Honavar J, Townes T, Patel RP. Role of the b93cys, atp and adenosine in red cell dependent hypoxic vasorelaxation. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2013; 5: 21-31.

Luscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1986; 8: 344-348.

Mahdi A, Cortese-Krott MM, Kelm M, Li N, Pernow J. Novel perspectives on redox signaling in red blood cells and platelets in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2021; 168: 95-109.

Mahdi A, Wodaje T, Kövamees O, Tengbom J, Zhao A, Jiao T , ve ark. The red blood cell as a mediator of endothelial dysfunction in patients with familial hypercholesterolemia and dyslipidemia. *J Intern Med.* 2023; 293: 228-245.

Maier U, Babich A, Macrez N, Leopoldt D, Gierschik P, Illenberger D, Nurnberg B. Gβ5γ2 is a highly selective activator of phospholipid-dependent enzymes. *J Biol Chem.* 2000; 275: 13746-13754.

Malmsten C. Some biological effects of prostaglandin endoperoxide analogs. *Life Sci.* 1976; 18: 169-176.

Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM , ve ark. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric-oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993; 268: 17478-17488.

Martin C, Uhlig S, Ullrich V. Cytokine-induced bronchoconstriction in precision-cut lung slices is dependent upon cyclooxygenase-2 and thromboxane receptor activation. *Am J Resp Cell Mol.* 2001; 24: 139-145.

Martin W. The combined role of atheroma, cholesterol, platelets, the endothelium and fibrin in heart-attacks and strokes. *Med Hypotheses*. 1984; 15: 305-322.

Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension*. 1991; 17: 707-719.

Martorell A, Blanco-Rivero J, Aras-López R, Sagredo A, Balfagón G, Ferrer M. Orchidectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in the acetylcholine-induced relaxation in the rat aorta. *Cardiovascular Research*. 2008; 77: 590-599.

Matsumoto T, Gouloupoulou S, Taguchi K, Tostes RC, Kobayashi T. Constrictor prostanoids and uridine adenosine tetraphosphate: Vascular mediators and therapeutic targets in hypertension and diabetes. *Brit J Pharmacol*. 2015; 172: 3980-4001.

Mayeux PR, Morton HE, Gillard J, Lord A, Morinelli TA, Boehm A, et al. The affinities of prostaglandin-H₂ and thromboxane-A₂ for their receptor are similar in washed human-platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 157: 733-739.

Merx MW, Gorressen S, van de Sandt AM, Cortese-Krott MM, Ohlig J, Stern M, et al. Depletion of circulating blood nos3 increases severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 2014; 109: 398.

Mestel F, Oetliker O, Beck E, Felix R, Imbach P, Wagner HP. Severe bleeding associated with defective thromboxane synthetase. *Lancet*. 1980; 1: 157-157.

Methven L, McBride M, Wallace GA, McGrath JC. The alpha 1b/d-adrenoceptor knockout mouse permits isolation of the vascular alpha 1a-adrenoceptor and elucidates its relationship to the other subtypes. *Br J Pharmacol*. 2009; 158: 209-224.

Miggin SM, Kinsella BT. Expression and tissue distribution of the mRNAs encoding the human thromboxane A₂ receptor (TP) alpha and beta isoforms. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1425: 543-559.

Minneman KP, Esbenshade TA. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1994; 34: 117-133.

Mistry M, Nasjletti A. Prostanoids as mediators of prohypertensive and antihypertensive mechanisms. *Am J Med Sci.* 1988; 295: 263-267.

Miyata A, Yokoyama C, Ihara H, Bandoh S, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T. Characterization of the human gene (TBXAS1) encoding thromboxane synthase. *Eur J Biochem.* 1994; 224: 273-279.

Moers A, Wettschureck N, Grüner S, Nieswandt B, Offermanns S. Unresponsiveness of platelets lacking both Gα_q and Gα₁₃ -: Implications for collagen-induced platelet activation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 45354-45359.

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane J. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature.* 1976; 263: 663-665.

Moncada S, Higgs EA. Arachidonate metabolism in blood-cells and the vessel wall. *Clin Haematol.* 1986; 15: 273-292.

Montuschi P, Barnes P, Roberts LJ. Insights into oxidative stress: The isoprostanes. *Curr Med Chem.* 2007; 14: 703-717.

Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: Markers and mediators of oxidative stress. *Faseb J.* 2004; 18: 1791-1800.

Morinelli TA, Mais DE, Oatis JE, Mayeux PR, Okwu AK, Masuda A, et al. I-bop, the most potent radiolabeled agonist for the TxA₂/PGH₂ receptor. *Adv Prostag Thromb L.* 1990; 20: 102-109.

Morinelli TA, Zhang LM, Newman WH, Meier KE. Thromboxane A₂/prostaglandin H₂-stimulated mitogenesis of coronary artery smooth muscle cells involves activation of mitogen-activated protein kinase and s6 kinase. *J Biol Chem.* 1994; 269: 5693-5698.

Mousa AA, Archer KJ, Cappello R, Estrada-Gutierrez G, Isaacs CR, Strauss JF, Walsh SW. DNA methylation is altered in maternal blood vessels of women with preeclampsia. *Reprod Sci.* 2012a; 19: 1332-1342.

Mousa AA, Strauss JF, Walsh SW. Reduced methylation of the thromboxane synthase gene is correlated with its increased vascular expression in preeclampsia. *Hypertension*. 2012b; 59: 1249-U1445.

Murakami Y, Yokotani K, Okuma Y, Osumi Y. Thromboxane A2 is involved in the nitric oxide-induced central activation of adrenomedullary outflow in rats. *Neuroscience*. 1998; 87: 197-205.

Muravyov A, Tikhomirova I. Signaling pathways regulating red blood cell aggregation. *Biorheology*. 2014; 51: 135-145.

Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell W. Harper's biochemistry. Çeviren: Dikmen n, özgünen t. Harper'ın Biyokimyası. 2004; 1: 162-258.

Musiek ES, Yin HY, Milne GL, Morrow JD. Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. *Lipids*. 2005; 40: 987-994.

Muzaffar S, Shukla N, Angelini GD, Jeremy JY. Superoxide auto-augments superoxide formation and upregulates gp91 expression in porcine pulmonary artery endothelial cells:: Inhibition by iloprost. *Eur J Pharmacol*. 2006; 538: 108-114.

Muzaffar S, Shukla N, Lobo C, Angelini GD, Jeremy JY. Iloprost inhibits superoxide formation and gp91 expression induced by the thromboxane A analogue U46619, 8-isoprostane F, prostaglandin F, cytokines and endotoxin in the pig pulmonary artery. *Brit J Pharmacol*. 2004; 141: 488-496.

Muzaffar S, Shukla N, Massey Y, Angelini GD, Jeremy JY. NADPH oxidase 1 mediates upregulation of thromboxane A synthase in human vascular smooth muscle cells: Inhibition with iloprost. *Eur J Pharmacol*. 2011; 658: 187-192.

Mycek J, Harvey A, Champe C. Lippincott's illustrated reviews seriesinden: Farmakoloji, çeviri-ed; oktay ş, nobel tıp kitabevi, 2. Baskı, İstanbul. 1998: 255-262.

Nakahata N. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Therapeut*. 2008; 118: 18-35.

Nakahata N, Matsuoka I, Ono T, Nakanishi H. Thromboxane A₂ activates phospholipase c in astrocytoma cells via pertussis toxin-insensitive G-protein. *Eur J Pharmacol.* 1989; 162: 407-417.

Namba T, Sugimoto Y, Hirata M, Hayashi Y, Honda A, Watabe A, et al. Mouse thromboxane-a₂ receptor - cDNA cloning, expression and northern blot analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 184: 1197-1203.

Needleman P, Moncada S, Bunting S, Vane JR, Hamberg M, Samuelsson B. Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane-A₂ from prostaglandin endoperoxides. *Nature.* 1976; 261: 558-560.

Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem.* 1986; 55: 69-102.

Nishizuka Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science.* 1984; 225: 1365-1370.

Nusing R, Lesch R, Ullrich V. Immunohistochemical localization of thromboxane synthase in human tissues. *Eicosanoids.* 1990a; 3: 53-58.

Nusing R, Schneidervoss S, Ullrich V. Immunoaffinity purification of human thromboxane synthase. *Arch Biochem Biophys.* 1990b; 280: 325-330.

Nusing RM, Hirata M, Kakizuka A, Eki T, Ozawa K, Narumiya S. Characterization and chromosomal mapping of the human thromboxane A₂ receptor gene. *J Biol Chem.* 1993; 268: 25253-25259.

Obara Y, Kurose H, Nakahata N. Thromboxane A₂ promotes interleukin-6 biosynthesis mediated by an activation of cyclic amp-response element-binding protein in 1321n1 human astrocytoma cells. *Mol Pharmacol.* 2005; 68: 670-679.

Offermanns S, Simon MI. Gα₁₅ and Gα₁₆ couple a wide variety of receptors to phospholipase c. *J Biol Chem.* 1995; 270: 15175-15180.

Ohashi K, Ruan KH, Kulmacz RJ, Wu KK, Wang LH. Primary structure of human thromboxane synthase determined from the cDNA sequence. *J Biol Chem.* 1992; 267: 789-793.

Omar HR, Mirsaeidi M, Socias S, Sprenger C, Caldeira C, Camporesi EM, Mangar D. Plasma free hemoglobin is an independent predictor of mortality among patients on extracorporeal membrane oxygenation support. *Plos One*. 2015; 10.

Osikoya O, Jaini PA, Nguyen A, Valdes M, Goulopoulou S. Effects of low-dose aspirin on maternal blood pressure and vascular function in an experimental model of gestational hypertension. *Pharmacol Res*. 2017; 120: 267-278.

Özen G, Aljesri K, Kizar Ö, Topal G, Türkyilmaz G, Türkyilmaz S. Clinical characteristics of patients undergoing coronary artery bypass surgery: Focus on gender differences. *Istanb J Pharm*. 2020; 50: 153-159.

Özen N, Ülker SN, Ülker P, Özcan F, Aslan M, Sentürk ÜK, Basrali F. Effect of 20-hete inhibition on L-NAME-induced hypertension in rats. *Clin Exp Hypertens*. 2018; 40: 292-302.

Palea S, Toson G, Pietra C, Trist DG, Artibani W, Romano O, Corsi M. Pharmacological characterization of thromboxane and prostanoid receptors in human isolated urinary bladder. *Brit J Pharmacol*. 1998; 124: 865-872.

Palmer MA, Piper PJ, Vane JR. The release of rabbit aorta contracting substance (rcs) from chopped lung and its antagonism by anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol*. 1970; 40: 581P-582P.

Patel RP, Gladwin MT. Physiologic, pathologic and therapeutic implications for hemoglobin interactions with nitric oxide. *Free Radical Bio Med*. 2004; 36: 399-401.

Pfister SL, Campbell WB. Role of endothelium-derived metabolites of arachidonic acid in enhanced pulmonary artery contractions in female rabbits. *Hypertension*. 1996; 27: 43-48.

Pfister SL, Nithipatikom K, Campbell WB. Role of superoxide and thromboxane receptors in acute angiotensin ii-induced vasoconstriction of rabbit vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300: H2064-2071.

Piascik MT, Butler BT, Pruitt TA. The role of alpha 1-adrenoceptor subtypes in the regulation of arterial blood pressure. *Eur J Pharmacol*. 1990a; 180: 381-386.

Piascik MT, Kusiak JW, Barron KW. Alpha 1-adrenoceptor subtypes and the regulation of peripheral hemodynamics in the conscious rat. *Eur J Pharmacol.* 1990b; 186: 273-278.

Piper PJ, Vane JR. Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs. *Nature.* 1969; 223: 29-35.

Pugliese G, Spokas EG, Marcinkiewicz E, Wong PYK. Hepatic transformation of prostaglandin-D2 to a new prostanoid, 9-alpha,11-beta-prostaglandin-F2, that inhibits platelet-aggregation and constricts blood-vessels. *J Biol Chem.* 1985; 260: 4621-4625.

Quest DW, Wilson TW. Effects of ridogrel, a thromboxane synthase inhibitor and receptor antagonist, on blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Jpn J Pharmacol.* 1998; 78: 479-486.

Raychowdhury MK, Yukawa M, Collins LJ, Mcgrail SH, Kent KC, Ware JA. Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A(2) receptor. *J Biol Chem.* 1994; 269: 19256-19261.

Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscl Throm Vas.* 2011; 31: 986-1000.

Rice KM, Uddemarri S, Desai DH, Morrison RG, Harris R, Wright G, Blough E. PGF2 α -associated vascular smooth muscle hypertrophy is ros dependent and involves the activation of MTOR, p70s6k, and pten. *Prostag Oth Lipid M.* 2008; 85: 49-57.

Rich S, Hart K, Kieras K, Brundage BH. Thromboxane synthetase inhibition in primary pulmonary hypertension. *Chest.* 1987; 91: 356-360.

Richardson J, Chatwin H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Evans PD. Agonist-specific coupling of a cloned human alpha1a-adrenoceptor to different second messenger pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003; 367: 333-341.

Roberts JM, August PA, Bakris G, Barton JR, Bernstein IM, Druzin M, et al. Hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013; 122: 1122-1131.

Rocca B, Secchiero P, Celeghini C, Ranelletti FO, Ciabattoni G, Maggiano N , ve ark. Modulation of the expression and activity of cyclooxygenases in normal and accelerated erythropoiesis. *Exp Hematol*. 2004; 32: 925-934.

Rokosh DG, Simpson PC. Knockout of the alpha 1a/c-adrenergic receptor subtype: The alpha 1a/c is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 9474-9479.

Ruan Y, Kan H, Parmentier JH, Fatima S, Allen LF, Malik KU. Alpha-1a adrenergic receptor stimulation with phenylephrine promotes arachidonic acid release by activation of phospholipase D in rat-1 fibroblasts: Inhibition by protein kinase a. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 284: 576-585.

Sabe SA, Zhao A, Kononov MA, Sabra M, Li J, Ehsan A , ve ark. Increased coronary contraction to thromboxane A2 in cardiac surgery patients with poorly controlled hypertension. *Journal of Surgical Research*. 2024; 294: 249-256.

Sakamoto K, Houya I, Inoue K, Tanaka M, Suzuki T, Sakamoto Y, Matsuo H. An imbalance in plasma prostanoids in patients with Raynaud's phenomenon and pulmonary vasospasm. *Eur Respir J*. 1999; 13: 137-144.

Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J, Itomine T, Uza M , ve ark. Inhibitory effect of vapirost on contractile responses of isolated dog renal-arteries to thromboxane A(2) analog, u46619. *General Pharmacology*. 1994; 25: 617-622.

Schlachetzki JC, Fiebich BL, Haake E, de Oliveira AC, Candelario-Jalil E, Heneka MT, Hull M. Norepinephrine enhances the lps-induced expression of COX-2 and secretion of PGE2 in primary rat microglia. *J Neuroinflammation*. 2010; 7: 2.

Schultheiss G, Diener M. Inhibition of spontaneous smooth muscle contractions in rat and rabbit intestine by blockers of the thromboxane A2 pathway. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1999; 46: 123-131.

Sellers MM, Stallone JN. Sympathy for the devil: The role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. *Am J Physiol-Heart C*. 2008; 294: H1978-H1986.

Shen R-F. Thromboxane synthase: Purification, characterization and immunological studies. University of Kentucky, 1985,

Shen RF, Tai HH. Immunoaffinity purification and characterization of thromboxane synthase from porcine lung. *J Biol Chem*. 1986a; 261: 1592-1599.

Shen RF, Tai HH. Monoclonal-antibodies to thromboxane synthase from porcine lung - production and application to development of a tandem immunoradiometric assay. *J Biol Chem*. 1986b; 261: 1585-1591.

Shen RF, Tai HH. Thromboxanes: Synthase and receptors. *J Biomed Sci*. 1998; 5: 153-172.

Shenker A, Goldsmith P, Unson CG, Spiegel AM. The g protein coupled to the thromboxane a₂ receptor in human platelets is a member of the novel gq family. *J Biol Chem*. 1991; 266: 9309-9313.

Smith CM. Marks' basic medical biochemistry: A clinical approach. Lippincott Williams and Wilkins; 2005.

Smith DD, Tan X, Tawfik O, Milne G, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Increased aortic atherosclerotic plaque development in female apolipoprotein e-null mice is associated with elevated thromboxane A₂ and decreased prostacyclin production. *J Physiol Pharmacol*. 2010; 61: 309-316.

Smith WL. Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth-muscle and endothelial-cells. *Annu Rev Physiol*. 1986; 48: 251-262.

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*. 1996; 271: 33157-33160.

Sonnweber T, Pizzini A, Nairz M, Weiss G, Tancevski I. Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *Int J Mol Sci*. 2018; 19.

Spradley FT. Sympathetic nervous system control of vascular function and blood pressure during pregnancy and preeclampsia. *J Hypertens*. 2019; 37: 476-487.

Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Kleinhenz ME, Lonigro AJ. Deformation-induced atp release from red blood cells requires cftr activity. *Am J Physiol*. 1998; 275: H1726-1732.

Sprague RS, Hanson MS, Achilleus D, Bowles EA, Stephenson AH, Sridharan M , ve ark. Rabbit erythrocytes release atp and dilate skeletal muscle arterioles in the presence of reduced oxygen tension. *Pharmacol Rep*. 2009; 61: 183-190.

Spurney RF, Bernstein RJ, Ruiz P, Pisetsky DS, Coffman TM. Physiologic role for enhanced renal thromboxane production in murine lupus nephritis. *Prostaglandins*. 1991; 42: 15-28.

Sridharan M, Adderley SP, Bowles EA, Egan TM, Stephenson AH, Ellsworth ML, Sprague RS. Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced atp release from human erythrocytes. *Am J Physiol-Heart C*. 2010; 299: H1146-H1152.

Sridharan M, Bowles EA, Richards JP, Krantic M, Davis KL, Dietrich KA , ve ark. Prostacyclin receptor-mediated atp release from erythrocytes requires the voltage-dependent anion channel. *Am J Physiol-Heart C*. 2012; 302: H553-H559.

Stanke-Labesque F, Devillier P, Veitl S, Caron F, Cracowski JL, Bessard G. Cysteinyl leukotrienes are involved in angiotensin ii-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research*. 2001; 49: 152-160.

Stanke-Labesque F, Mallaret M, Lefebvre B, Hardy G, Caron F, Bessard GN. 2-arachidonoyl glycerol induces contraction of isolated rat aorta: Role of cyclooxygenase-derived products. *Cardiovascular Research*. 2004; 63: 155-160.

Stassen FR, Maas RG, Schiffers PM, Janssen GM, De Mey JG. A positive and reversible relationship between adrenergic nerves and alpha-1a adrenoceptors in rat arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 284: 399-405.

Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Aze Y, Nishimura T , ve ark. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin f receptor. *Science*. 1997; 277: 681-683.

Sun FF, Chapman JP, Mcguire JC. Metabolism of prostaglandin endoperoxide in animal-tissues. *Prostaglandins*. 1977; 14: 1055-1074.

Sung CP, Arleth AJ, Berkowitz BA. Endothelial thromboxane receptors - biochemical-characterization and functional implications. *Biochem Bioph Res Co.* 1989; 158: 326-333.

Tai HH, Yuan B. Development of radioimmunoassay for thromboxane-B₂. *Anal Biochem.* 1978; 87: 343-349.

Takayama K, Yuhki K, Ono K, Fujino T, Hara A, Yamada T , ve ark. Thromboxane a₂ and prostaglandin f₂ mediate inflammatory tachycardia. *Nat Med.* 2005; 11: 562-566.

Tanaka T, Ito S, Higashino R, Fukuta Y, Fukuda Y, Takei M , ve ark. A new thromboxane receptor antagonist, Z-335, ameliorates experimental thrombosis without prolonging the rat tail bleeding time. *Thromb Res.* 1998; 91: 229-235.

Tazawa R, Green ED, Ohashi K, Wu KK, Wang LH. Characterization of the complete genomic structure of human thromboxane synthase gene and functional analysis of its promoter. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 334: 349-356.

Tourdot BE, Holinstat M. Targeting 12-lipoxygenase as a potential novel antiplatelet therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2017; 38: 1006-1015.

Tsai MH, Jiang MJ. Rho-kinase-mediated regulation of receptor-agonist-stimulated smooth muscle contraction. *Pflugers Arch.* 2006; 453: 223-232.

Uchida Y, Murao S. Effects of thromboxane synthetase inhibitors on cyclical reduction of coronary blood flow in dogs. *Jpn Heart J.* 1981; 22: 971-975.

Ulker P, Basrali F. Kan akımının yerel olarak düzenlenmesinde eritrositlerin rolü. *Akdeniz Tıp Dergisi.* 2018; 4: 208-214.

Ulker P, Gunduz F, Meiselman HJ, Baskurt OK. Nitric oxide generated by red blood cells following exposure to shear stress dilates isolated small mesenteric arteries under hypoxic conditions. *Clin Hemorheol Micro.* 2013; 54: 357-369.

Ushikubi F, Aiba YI, Nakamura KI, Namba T, Hirata M, Mazda O , ve ark. Thromboxane-a₂ receptor is highly expressed in mouse immature thymocytes and

mediates DNA fragmentation and apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1993; 178: 1825-1830.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol*. 1998; 38: 97-120.

Vanhoutte PM, Tang EHC. Endothelium-dependent contractions: When a good guy turns bad! *J Physiol-London*. 2008; 586: 5295-5304.

Vedernikov YP, Kravtsov GM, Postnov YV, Saade G, Garfield RE. Effect of red blood cells and hemoglobin on spontaneously hypertensive and normotensive rat aortas. *Am J Hypertens*. 1998; 11: 105-112.

Vermeylen J, Carreras L, Van Schaeren J, Defreyn G, Machin S, Verstraete M. Thromboxane synthetase inhibition as antithrombotic strategy. *The Lancet*. 1981; 317: 1073-1075.

Veza R, Habib A, FitzGerald GA. Differential signaling by the thromboxane receptor isoforms via the novel gtp-binding protein, gh. *J Biol Chem*. 1999; 274: 12774-12779.

Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003; 123: 417s-422s.

Vilalobos-Molina R, Ibarra M. Increased expression and function of vascular α -adrenoreceptors may mediate the prohypertensive effects of angiotensin II. *Mol Interv*. 2005; 5: 340-342.

Volodchenko AI, Tsirkin VI, Kostiaev AA. [the mechanism of change in speed of agglutination of human erythrocytes under the influence of adrenaline]. *Fiziol Cheloveka*. 2014; 40: 67-74.

Voyno-Yasenetskaya T, Conklin BR, Gilbert RL, Hooley R, Bourne HR, Barber DL. $G\alpha_{13}$ stimulates na-h exchange. *J Biol Chem*. 1994; 269: 4721-4724.

Wang B, Wu L, Chen J, Dong L, Chen C, Wen Z, et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: Mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6: 94.

Watanabe K, Yoshida R, Shimizu T, Hayaishi O. Enzymatic formation of prostaglandin-F₂-alpha from prostaglandin-H₂ and prostaglandin-D₂ - purification and properties of prostaglandin-F synthetase from bovine lung. *J Biol Chem.* 1985; 260: 7035-7041.

Watanabe T, Nakao A, Emerling D, Hashimoto Y, Tsukamoto K, Horie Y, et al. Prostaglandin-F₂-alpha enhances tyrosine phosphorylation and DNA-synthesis through phospholipase-c coupled receptor via Ca²⁺-dependent intracellular pathway in NIH-3T3 cells. *J Biol Chem.* 1994; 269: 17619-17625.

Weiss HJ, Turitto VT. Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood.* 1979; 53: 244-250.

White R, Hiley CR. The actions of the cannabinoid receptor antagonist, SR 141716a, in the rat isolated mesenteric artery. *Brit J Pharmacol.* 1998; 125: 689-696.

Whittle BJ, Oren-Wolman N, Guth PH. Gastric vasoconstrictor actions of leukotriene C₄, PGF₂ alpha, and thromboxane mimetic U-46619 on rat submucosal microcirculation in vivo. *Am J Physiol.* 1985; 248: G580-586.

Wilhelmsson L, Wiklund M, Wikqvist N. PGH₂, TxA₂ and PGI₂ have potent and differentiated actions on human uterine contractility. *Prostaglandins.* 1981; 21: 277-286.

Wilson DP, Susnjak M, Kiss E, Sutherland C, Walsh MP. Thromboxane A₂-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of myosin at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem J.* 2005; 389: 763-774.

Wilson SJ, Dowling JK, Zhao L, Carnish E, Smyth EM. Regulation of thromboxane receptor trafficking through the prostacyclin receptor in vascular smooth muscle cells - role of receptor heterodimerization. *Arterioscl Thromb Vas.* 2007; 27: 290-296.

Wilson SJ, Roche AM, Kostetskaya E, Smyth EM. Dimerization of the human receptors for prostacyclin and thromboxane facilitates thromboxane receptor-mediated cAMP generation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 53036-53047.

Wischmann P, Kuhn V, Suvorava T, Muessig JM, Fischer JW, Isakson BE , ve ark. Anaemia is associated with severe rbc dysfunction and a reduced circulating no pool: Vascular and cardiac enos are crucial for the adaptation to anaemia. *Basic Res Cardiol.* 2020; 115: 43.

Wood CE, Cudd TA, Kane C, Engelke K. Fetal acth and blood pressure responses to thromboxane mimetic u-46619. *Am J Physiol.* 1993; 265: R858-862.

Wood KC, Cortese-Krott MM, Kovacic JC, Noguchi A, Liu VB, Wang X , ve ark. Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 1861-1871.

Yalcin M, Cavun S, Yilmaz MS, Savci V. Activation of the central cholinergic system mediates the reversal of hypotension by centrally administrated U-46619, a thromboxane a2 analog, in hemorrhaged rats. *Brain Res.* 2006; 1118: 43-51.

Yamada T, Fujino T, Yuhki K, Hara A, Karibe H, Takahata O , ve ark. Thromboxane A regulates vascular tone via its inhibitory effect on the expression of inducible nitric oxide synthase. *Circulation.* 2003; 108: 2381-2386.

Yamamoto K, Ebina S, Nakanishi H, Nakahata N. Thromboxane A2 receptor-mediated signal transduction in rabbit aortic smooth muscle cells. *Gen Pharmacol.* 1995; 26: 1489-1498.

Yang J, Gonon AT, Sjoquist PO, Lundberg JO, Pernow J. Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: 15049-15054.

Yang JN, Sundqvist ML, Zheng XW, Jiao T, Collado A, Tratsiakovich Y , ve ark. Hypoxic erythrocytes mediate cardioprotection through activation of soluble guanylate cyclase and release of cyclic gmp. *J Clin Invest.* 2023; 133.

Yang JN, Zheng XW, Mahdi A, Zhou ZC, Tratsiakovich Y, Jiao T , ve ark. Red blood cells in type 2 diabetes impair cardiac post-ischemic recovery through an arginase-dependent modulation of nitric oxide synthase and reactive oxygen species. *Jacc-Basic Transl Sc.* 2018; 3: 450-463.

Yokoyama C, Miyata A, Ihara H, Ullrich V, Tanabe T. Molecular-cloning of human platelet thromboxane-A synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 178: 1479-1484.

Yu Y, Lucitt MB, Stubbe J, Cheng Y, Friis UG, Hansen PB , ve ark. Prostaglandin f2alpha elevates blood pressure and promotes atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 7985-7990.

Yuui K, Kudo R, Kasuda S. Arterial thromboxane A2-induced transient contraction after il-1 β exposure. *Eur J Inflamm*. 2022; 20.

Zhang LQ, Xiao H, Schultz RA, Shen RF. Genomic organization, chromosomal localization, and expression of the murine thromboxane synthase gene (TBXAS1). *Genomics*. 1997; 45: 519-528.

Zhang M, Li CS, He CX, Cui YQ, Li Y, Ma Y , ve ark. Thromboxane-induced contractile response of mesenteric arterioles is diminished in the older rats and the older hypertensive rats. *Front Pharmacol*. 2022; 13.

Zhang S, Coso OA, Lee C, Gutkind JS, Simonds WF. Selective activation of effector pathways by brain-specific G protein beta5. *J Biol Chem*. 1996; 271: 33575-33579.

Zhao MZ, Ma JS, Li M, Zhang YT, Jiang BX, Zhao XL , ve ark. Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans. *Int J Mol Sci*. 2021; 22.

Zhou ZC, Mahdi A, Tratsiakovich Y, Zahorán S, Kövamees O, Nordin F , ve ark. Erythrocytes from patients with type 2 diabetes induce endothelial dysfunction via arginase i. *J Am Coll Cardiol*. 2018; 72: 769-780.

Zhuge ZB, Haworth SM, Nihlén C, Carvalho LRRA, Heuser SK, Kleschyov AL , ve ark. Red blood cells from endothelial nitric oxide synthase-deficient mice induce vascular dysfunction involving oxidative stress and endothelial arginase I. *Redox Biology*. 2023; 60.

Zuspan FP. Pregnancy induced hypertension. 1. Role of sympathetic nervous system and adrenal gland. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1977; 56: 283-286.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ahmet	Uyruğu	T. C.
Soyadı	YILDIRIM	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Zeki Konukoğlu Anadolu Öğretmen Lisesi	2014
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi	2019
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Stajyer Fzt.	Akdeniz Üniversitesi Hastanesi	2017-2017
Stajyer Fzt.	SBÜ Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi	2018-2018
Stajyer Fzt.	Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi	2018-2019
Araştırmacı-Bursiyer	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2020-...

Yabancı Dilleri

İngilizce

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Eritrositlerin Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtlarına Katkısı	Akdeniz Üniversitesi - Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi	2022-...
Vitamin K2'nin Diyabetik Sıçanlarda Kan Reolojisi ve Damar Yanıtları Üzerine Etkisi.	Akdeniz Üniversitesi - Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi	2022-2023
Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonda Eritrositlerin Vasküler Gevşeme Yanıtlarına Etkisi.	TÜBİTAK	2022-2023
Eritrositlerin Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtlarına Katkısı: Eritrositlerden Tromboksan A2 Salınımı	TÜBİTAK	2023-2024

Burslar-Ödüller:

Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonda Eritrositlerin Vasküler Gevşeme Yanıtlarına Etkisi, TÜBİTAK, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Proje No: 122S799.

Eritrositlerin Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtlarına Katkısı: Eritrositlerden Tromboksan A2 Salınımı, TÜBİTAK, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Proje No: 123S997.

Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, TÜBİTAK, BİDEB. 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılım Desteği Programı, 2022 – 4.

Yayınlar ve Bildiriler:

Makaleler

SCI- Expanded veya SSCI kapsamındaki dergilerde yayımlanmış

Tazegul H, Ozen N, Yildirim A, Ulker P, Hadimioglu N, Cakin O, Yoldas SB, Yilmaz M, Cengiz M. Albumin effect on hemorheological parameters in patients with liver transplant. Clin Hemorheol Microcirc. 2023;83(2):93-104. doi: 10.3233/CH-221473. PMID: 36336924.

TÜBİTAK ULAKBİLİM TR Dizin kapsamındaki dergilerde yayımlanmış

Yaşar P., Yıldırım A., Başkurt F., Başkurt Z., İnce Parpucu T. Sağlıklı Genç Yetişkinlerde Basınç Ağrı Eşiği ile Uyku Kalitesi, Yaşam Doyumu ve Genel Psikolojik Sağlık Durumu Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 2022; 29(3): 346-355.

Bildiriler

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceeding) Basılan Bildiriler

Ülker P., Başarıcı İ., Özen N., Kılavuz E., Kısak F., Basralı F., Yaraş N., Köksoy S., Çelik M. L., Abueid L., Yıldırım A. Contribution of red blood cells to pulmonary arterial hypertension pathogenesis: NOS activity and vessel responses. 2nd Joint Meeting of the The European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation The International Society for Clinical Hemorheology The International Society of Biorheology, Fukuoka, Japonya. 2021.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Yıldırım A., Abueid L., Özen N., Kılavuz E., Başarıcı İ., Basralı F., Ülker P. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon Hastalarından Elde Edilen Eritrositlerin ATP Aracılı Vasküler Gevşeme Yanıtlarındaki Rolü. 47. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye. 2022.

Kılavuz E., Abueid L., Yıldırım A., Özen N., Karadağ B., Basralı F. Ülker P. Preeklampside Eritrositlerin ATP Aracılı Vasküler Gevşeme Yanıtları Üzerine Etkisi. 47. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye. 2022.

Yıldırım A., Arslan Yıldız U., Basralı F., Ülker P. Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtlarında Eritrositlerin Rolü. 48. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Sakarya, Türkiye. 2023.

CPCI’da Yayımlanmış Bildiriler

Ulker, P., Basarici, I., Ozen, N., Kilavuz, E., Kısak, F., Basrali, F., Yaras, N., Koksoy, S., Celik, M. L., Abueid, L., & Yildirim, A. (2021). Contribution of red blood cells to pulmonary arterial hypertension pathogenesis: NOS activity and vessel responses. Biorheology, 58(3-4 MA-S8-3), 122–123.

Kilavuz, E., Abueid, L., Yildirim, A., Ozen, N., Karadag, B., Basrali, F., & Ulker, P. (2023). Effect of Erythrocytes on ATP Mediated Vascular Relaxation Responses in Preeclampsia. Acta Physiologica, 237 MA-OC-20, 25.

Yildirim, A., Abueid, L., Ozen, N., Kilavuz, E., Basarici, I., Basrali, F., & Ulker, P. (2023). Role of Erythrocytes from Pulmonary Arterial Hypertension Patients in ATP-mediated Vascular Relaxation Responses. Acta Physiologica, 237 MA-PC-25, 57–58.

Yildirim, A., Arslan Yildiz U., Basrali, F., & Ulker, P. (2023). Role of Erythrocytes in Phenylephrine-mediated Vascular Contraction Responses. Acta Physiologica, 240 MA-OC-27, 36.

Sertifika, Kurs ve Eğitimler:

Uygulamalı Girişimcilik Eğitimi / KOSGEB Isparta Müdürlüğü / 2017

İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi / Süleyman Demirel Üniversitesi / 2017

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası / Akdeniz Üniversitesi / 2021

Sağlık Bilimlerinde Araştırma Projesi Yazımı Eğitimi / Akdeniz Üniversitesi / 2022

Klinik Araştırmalar Temel Eğitimi / Akdeniz Üniversitesi / 2023

İlk Yardım Eğitimi / Konyaaltı Halk Eğitimi Merkezi / 2023

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

Türk Fizyolojik Bilimler Derneği (TFBD) / 2022 - Devam Ediyor