

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**MEKANİK OLARAK UYARILAN ERİTROSİT
KAYNAKLI NİTRİK OKSİT SENTEZİNİN
DİRENÇ DAMARLARINA ETKİSİ**

Pınar ÜLKER KARADAMAR

Doktora Tezi

Antalya, 2013

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

MEKANİK OLARAK UYARILAN ERİTROSİT KAYNAKLI NİTRİK OKSİT SENTEZİNİN DİRENÇ DAMARLARINA ETKİSİ

Pınar ÜLKER KARADAMAR

Doktora Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Filiz BASRALI

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2010.03.0122.002) ‘‘Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir’’

Antalya, 2013

Sağlık Bilimleri Enstitü Kurulu Kararı ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22.06.2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurulu kararı ve 23.05.2003 tarih ve 04/44 sayılı Akdenzi Üniversitesi Senato kararı gereğince 'Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği' ilkesi gereğince yapılan yayınlar aşağıda belirtilmiştir. (Orjinali ekte sunulmuştur).

Ulker P, Yaras N, Yalcin O, Celik-Ozenci C, Johnson PC, Meiselman HJ, Baskurt OK Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells NITRIC OXIDE-Biology And Chemistry Volume: 24 Issue: 4 Pages: 184-191 Published: 2011

Ulker P, Sati L, Celik-Ozenci C, Meiselman HJ, Baskurt OK Mechanical stimulation of nitric oxide synthesizing mechanisms in erythrocytes BIORHEOLOGY Volume: 46 Issue: 2 Pages: 121-132 Published: 2009

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürümüz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. 19.6.2013

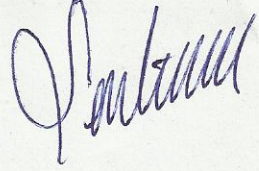
Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Filiz BASRALI
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



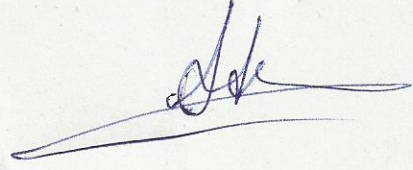
Üye:

Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



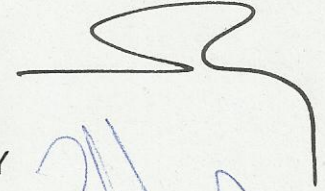
Üye:

Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



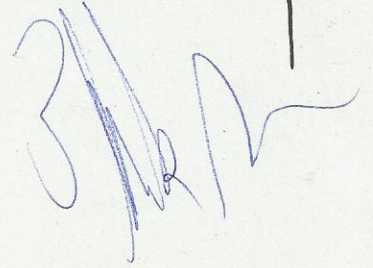
Üye:

Prof. Dr. Sadi ÖZDEM
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı



Üye:

Prof. Dr. Melek BOR KÜÇÜKATAY
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



ONAY: Bu tez Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../2013 tarih ve .../... sayılı kararınca kabul edilmiştir.

ÖZET

Eritrositler hücre membranlarında ve sitoplazmalarında yerleşmiş olan aktif NO sentez mekanizmalarına sahiptir. Eritrositlere etki eden mekanik kuvvetlerinin eritrositlerde bulunan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini aktive ettiği ve hücreden nitrik oksit (NO) çıkışını arttırdığı daha önce gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, mekanik kuvvetlere cevaben oluşan eritrosit kaynaklı NO'nun lokal kan akımı regülasyonundaki fizyolojik önemini araştırmaktır.

Çalışmada 12-14 aylık 10 adet Wistar sıçandan elde edilen kan ve damar örnekleri kullanılmıştır. Kan örneklerinden eritrosit izolasyonu yapıldıktan sonra Krebs solüsyonu ile hematokriti 0.1 l/l olan eritrosit süspansiyonları hazırlanmıştır. Mekanik stres (MS) uygulaması eritrosit süspansiyonlarının çapı 0.12 cm olan cam kapiller bir borudan 2 Pa düzeyinde duvar kayma gerilimi oluşturacak bir hızda 20 dakika boyunca geçirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra eritrosit süspansiyonları çapı ~300 µm olan ve endotel tabakası sıyrılmış mezenterik arteriyol segmentlerinden oksijene ve hipoksik koşullarda perfüze edilmiştir. Mekanik strese maruz bırakılmış eritrosit süspansiyonlarının hipoksik koşullarda perfüzyonu damar çapında önemli bir artışa neden olurken normoksik koşullarda bu etki gözlenmemiştir. Eritrosit süspansiyonlarının mekanik stresden önce non-spesifik NOS inhibitörü L-NAME(10^{-3} M) ile inkübe edilmesi bu dilatasyon yanıtını ortadan kaldırmıştır.

Bu çalışmanın sonuçları mekanik strese maruz bırakılan eritrositler tarafından NOS enzim aktivasyonu yoluyla üretilen NO'nun hipoksik koşullarda vasodilatasyona neden olduğunu göstererek eritrosit kaynaklı NO'nun kan akımının lokal regülasyonunda fonksiyonel bir öneme sahip olduğunu kanıtlamıştır.

Anahtar kelimeler: Eritrosit NOS, mekanik uyarım, NOS aktivasyonu, kan akımının lokal regülasyonu

ABSTRACT

Red blood cells (RBC) possess a functional nitric oxide synthase (NOS) enzyme located in the cell membrane and cytoplasm. It has previously been observed that shear stress acting on RBC activates NOS and causes enhanced nitric oxide (NO) export. The aim of the present study was to investigate the physiological importance (e.g., local blood flow regulation) of RBC-derived NO stimulated by application of shear.

Blood samples and vessel segments were obtained from Wistar rats; RBC suspensions were adjusted to a hematocrit of 0.1 l/l using Krebs solution. In order to apply shear stress to the RBC suspensions they were continuously flowed through a small-bore glass tube for 20 minutes at a wall shear stress of 2 Pa. The RBC suspensions were then perfused through endothelium denuded small mesenteric arteries having a diameter of ~300 μm under both high oxygen and hypoxic conditions. Perfusion of vessel segments with sheared RBC suspensions caused a significant dilation response under hypoxic conditions but not at high oxygen levels. Incubation of RBC suspensions with the non-specific NOS inhibitor L-NAME (10^{-3}M) prior to shear stress application abolished this dilation response.

Our results indicate that NO, released from RBC due to shear stress activation of NOS, results in vasodilation of vessel segments under hypoxic conditions, strongly suggesting that NO originating from RBC has a functional role in local blood flow regulation.

Keywords: Erythrocyte NOS, mechanical stimulation, NOS activation, local blood flow regulation

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleşmesinde değerli katkı ve eleştirileriyle bana yol gösteren sayın Hocam Prof. Dr.Oğuz Kerim Başkurt ve sayın danışman Hocam Prof. Dr Filiz Basralı'ya, öneri ve eleştirileri için değerli hocam Prof. Dr. Ümit Kemal Şentürk'e, tezin bütün aşamalarında bana destek olan çalışma arkadaşım ve dostum Doç.Dr. Melike Cengiz'e, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda görevli araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve değerli sabır ve destekleri için eşim Ulaş Karadamar, oğlum Kıvanç Karadamar ve aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
GİRİŞ	1
HİPOTEZ	4
2.1. Kan Akımı	4
2.1.1. Kitle Halinde Kan Akımı	4
2.1.2. Kapiller Kan Akımı	6
2.2. Kan Akımına Etkili Fiziksel Faktörler	6
2.3. Kan Akımının Düzenlenmesi	7
2.3.1. Kan Akımının Lokal Olarak Düzenlenmesi	7
2.3.1.1. Metabolik ve Miyojenik Kontrol	8
2.3.1.2. Endotel Aracılı Kontrol	9
2.3.1.3. Eritrosit Aracılı Kontrol	16
2.4. Kan Damarlarına Etki Eden Hemodinamik Kuvvetler	26
2.4.1. Duvar Kayma Gerilimi	26
2.4.2. Duvar Kayma Gerilimini Belirleyen Faktörler	27
2.5. Duvar Kayma Geriliminin Eritrositlere Etkileri	28
2.5.1. Duvar Kayma Gerilimi ve NO Salınımı	29
2.6. Hipotez	32

GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1.	Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması	33
3.2.	Kan Örneklerinin Hazırlanması ve Gruplandırma	33
3.3.	Mekanik Stres Uygulaması	34
3.4.	Damar Segmentlerinin İzolasyonu ve Basınç Miyografına Asılması	35
3.5.	Deney Protokolü	37
3.6.	İstatistik	42

BULGULAR

4.1.	Perfüzyon Çalışmalarında Kullanılan Eritrosit Süspansiyonlarının Özellikler	43
4.1.1.	e NOS Fosforilasyonu	43
4.1.2.	Nitrit Nitrat Düzeyleri	44
4.2.	Eritrosit Süspansiyonlarıyla Perfüzyonun Damar Çapına Etkisi	45

TARTIŞMA	47
-----------------	-----------

SONUÇLAR	53
-----------------	-----------

KAYNAKLAR	54
------------------	-----------

ÖZGEÇMİŞ	74
-----------------	-----------

EKLER	75
--------------	-----------

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ca⁺⁺	:	Kalsiyum
cGMP	:	Siklik guanozin 3',5' monofosfat
cAMP	:	Siklik adenozin monofosfat
IP3	:	İnozitol trifosfat
cp	:	Centi poise
EDRF	:	Endotel kaynaklı gevşetici faktör
eNOS	:	Endotelyal nitrik oksit sentaz
S1177	:	Serin 1177
T495	:	Threonin 495
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
Htc	:	Hematokrit
iNOS	:	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
K⁺	:	Potasyum
Mg⁺⁺	:	Magnezyum
n	:	Viskozite
fl	:	Fentolitre
Na⁺	:	Sodyum
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
Pa	:	Pascal
PBS	:	İzotonik fosfat tamponu
PI3K	:	Fosfoinozid 3 kinaz
PKA	:	Proten Kinaz A

PKC	:	Protain kinaz C
PLC	:	Fosfolipaz C
PKG	:	Protein kinaz G
AMPK	:	AMP-tarafından aktive edilen
PP1	:	Protein fosfataz 1
PP2A	:	Protein fosfataz 2A
VEGF	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
Q	:	Akım
R	:	Yarıçap
SS	:	Kayma gerilimi
W	:	Duvar kayma gerilimi
V	:	Akım hızı
GTP	:	Guanozin trifosfat
Cl⁻	:	Klor
ICAM-1	:	İntraselüler adezyon molekülü 1
TNF-α	:	Tümör nekrozis faktör- α
ET-1	:	Endotelin-1
LDL	:	Düşük densiteli lipoprotein
TRE	:	Phorbol ester tissue 13-acetate
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
FAD	:	Flavin adenin dinükleotid
FMN	:	Flavin adenin mononükleotid
BH4	:	Tetrahidrobiopterin

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1.: Plazmada içindeki eritrositlerin laminar akım çizgilerine etkileri	5
Şekil 2.2.: Eritrositlerin damar düz kas tonüsüne etkileri	16
Şekil 2.3.: Eritrositlerden ATP salınımı	18
Şekil 2.4.: Eritrositlerden NO salınımı	20
Şekil 2.5.: Eritrositlerde NOS aktivitesinin düzenlenmesi	29
Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan mekanik stres düzeneği	31
Şekil 3.2: Basınç miyografı	33
Şekil 4.1: Serin 1177 bölgesinden fosforlanan eNOS enziminin immun-florasan işaretleme yöntemi ile tayini	41
Şekil 4.2: Eritrositlerin süspansiyon ortamında bulunan toplam nitrit ve nitrat konsantrasyonu	42
Şekil 4.3. Eritrosit perfüzyonunun damar çapında neden olduğu değişimler	43

GİRİŞ

Eritrositler, vertebralılarda oksijen taşımak üzere özelleşmiş hücrelerdir. Bu amaçla, olgunlaşma süreçlerinde çekirdek ve organellerini kaybederler. Bu sürecin sonunda ise kuru ağırlıklarının % 90'ına varacak miktarda hemoglobin içeren ve bu nedenle birer hemoglobin torbası olarak da tanımlanan oldukça basit yapılı hücrelere dönüşürler [1-2]. Eritrositler bu basit yapılarından dolayı son yıllara kadar, fonksiyonları solunum gazlarının taşınmasıyla çerçevelenmiş hücreler olarak değerlendirilmiştir [3-4]. Oysa günümüzde, eritrositlerin birçok hücre içi sinyal yolağına sahip olduğu ve dolaşım sisteminde hücrelerin karşılaştıkları mekanik kuvvetlerin etkisinde bu yolların bir kısmının aktive olduğu bilinmektedir [3, 5-6].

Damar düz kas tonüsü, merkezi ve yerel kontrol mekanizmaları tarafından belirlenir. Bu mekanizmalar, otonom sinir sistemi aracılığı kontrol, metabolik ve miyojenik otoregülasyon, endotel aracılığı kontrol ve eritrosit aracılığı kontrol şeklinde özetlenebilir [7-11]. Bunlar arasında eritrosit aracılığı kontrol en yeni tanımlanan mekanizma olup eritrositler tarafından belirli koşullar altında salgılanan vazodilatör maddelerin damar düz kasında gevşemeye neden olmasına dayanmaktadır.

Eritrositlerin kan akımının lokal kontrolünde damar düz kasında gevşemeye neden olan etkilerini açıklamak üzere çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar iki grupta toplanabilir:

1) Eritrositler tarafından başlatılan ve endotel aracılığı NO yapımının tetiklenmesiyle gerçekleşen endotel bağımlı mekanizmalar [12-13] .

2) Eritrositlerden NO ya da NO biyoaktivitesine sahip moleküllerin salınımıyla gerçekleşen ve doğrudan eritrositler tarafından yürütülen mekanizmalardan [14-17].

Eritrositler tarafından başlatılıp endotel aracılığıyla yürütülen mekanizmalar, hipoksik koşullarda ve mekanik stres etkisi altında eritrositlerden adenosin trifosfat (ATP) salınımını ve salınan ATP'nin endotel hücrelerinde bulunan purinerjik reseptörlerine bağlanarak burada NO yapımını arttırmasına dayanmaktadır [12-13]. Endotel hücrelerinden salınan NO, damar düz kasına difüze olmakta ve burada gevşeme yanıtı oluşturmaktadır [13, 17-18]. Eritrositlerden ATP salınmasına neden olan hücre içi sinyal ileti yolağı da iyi bilinmektedir. Bu yolda yer alan moleküller

arasında heterotrimerik G proteinleri olan Gs ve Gi, adenilat siklaz ve protein kinaz A bulunmaktadır [19-23].

Eritrositlerden NO ve NO biyoaktivitesine sahip moleküllerin salınımına dayalı mekanizmalar ise temel olarak enzimatik ve non-enzimatik mekanizmalar olarak iki kısımda incelenebilir. Non enzimatik mekanizmalar: NO'nun, eritrosit içindeki hemoglobinle reaksiyona girerek S-nitrosohemoglobin oluşturması ve uygun koşullarda eritrositlerden salınmasını [24-26] ve eritrositlerin nitrit redüktaz aktivitesi göstererek plazmada bulunan nitriti NO'ya çevirmesini kapsar [27]. Her iki yolla da eritrositler tarafından salınan NO'nun damar düz kasında gevşemeye neden olmaktadır [15-16, 24, 27-31].

Eritrositler tarafından enzimatik mekanizmalar aracılığı ile NO oluşumu ise 2006 yılında Kleinbongard ve arkadaşları tarafından yapılan ve eritrositlerde aktif bir NOS enzimi bulunduğunu gösteren çalışmayla ilk kez gündeme gelmiştir. Bu çalışmada eritrositlerde bulunan NOS enziminin L-arjinin tarafından uyarıldığı, genel NOS inhibitörlerine duyarlı olduğu ve aktivitesinin hücre içi kalsiyum miktarı ve serin 1177 bölgesinden fosforilasyonuna bağlı olarak düzenlendiği ortaya konmuştur [32]. Ayrıca, gerek dış kaynaklı gerekse eritrositler tarafından sentezlenen NO'nun eritrosit mekanik özelliklerini etkilediği gözlenmiştir [32-33] ve normal mekanik özelliklerin korunması için NO'nun ortamda belirli bir konsantrasyon aralığında bulunmasının gerekli olduğu yolunda deliller elde edilmiştir [33]. Bu çalışmalarla eritrositlerin, etkinliği denetlenebilen bir NO sentez mekanizmasına sahip oldukları gösterilmişse de [32], bu denetim mekanizmalarının fizyolojik koşullarda ne ifade ettiği konusunda geçerli sayılabilecek bir görüş bu güne dek literatürde yer almamıştır.

Eritrositlerde aktif bir NOS enzimin gösterilmesinin ardından bu enzimin hangi koşullarda aktifleşeceği merak uyandırmıştır. Bu konudaki ilk çalışmalarda eritrositlerde NO oluşumunun insülin ve asetilkolin uygulamasıyla arttığı bildirilmiştir [32, 34]. Barvitenko ve arkadaşları, eritrositlerde bulunan NOS'un, mikrodolaşımdan geçerken hücrelerin maruz kaldığı mekanik kuvvetlerin etkisiyle aktive olabileceğini öne sürmüştür [3]. Kleinbongard ise, mekanik kuvvetlerin yanında hidrojen konsantrasyonunun (pH), oksijen parsiyel basıncının (pO_2), ve karbondioksit parsiyel basıncının (pCO_2)'nin de bu olayda rol alabileceğini öne sürmüştür [3, 32] ancak bu görüşler deneysel olarak kanıtlanmamıştır. Eritrosit NOS enzimini aktive eden faktörlere ilişkin ilk veri ise Fischer ve arkadaşlarına aittir. Araştırmacılar ekstra-korporeal dolaşımın eritrositlerdeki NOS enzim aktivitesini arttığını göstermişler ve buradan yola çıkarak kardiyopulmoner bypass cerrahisi sırasında görülen hipotansiyon nedeninin bu sistemden geçerken aktifleşen eritrosit NOS enzimi olduğunu savunmuşlardır [35]. Ancak, bu çalışmada eritrositlerin maruz kaldıkları sıvı kayma kuvvetlerinin büyüklüğü konusunda bir tahminde bulunmak pek mümkün değildir.

Başkurt ve arkadaşları tarafından yapılan bir dizi deneysel çalışmada ise eritrositlerde bulunan NOS enziminin, hücrelerin maruz kaldığı mekanik

kuvvetlerin etkisiyle aktive olacağı hipotezi test edilmiştir. Bunun için üç farklı deney düzeneği kullanılmıştır. Bu düzeneklerde eritrositler birbirinden farklı özellik ve büyüklükteki mekanik stres uygulamalarına tabi tutulmuştur [36-38]. Bu çalışmalarda, eritrositlerde bulunan NOS enziminin mekanik kuvvetlerin etkisi altında aktive olduğu ve bu sırada hücrelerde NO olduğu florasın problemleri kullanılarak gösterilmiştir. Bunun yanında hücrelerden NO çıkışının gerçekleştiği ise süspansiyon ortamında hem NO hem de NO'nun yıkım ürünleri olan nitrit ve nitrat düzeylerinin belirlenmesiyle kanıtlanmıştır.

Chen ve arkadaşları, aktif olduğu gösterilen eritrosit NOS enziminin, vasküler tonüse etkisinin olabileceği hipotezinden yola çıkarak, hemorajik şok gelişen bireylerde vasküler tonüste meydana gelen bozulmadan doğrudan eritrosit popülasyonundaki azalmanın sorumlu olabileceğini öngörmüşlerdir [39]. Çalışmada, eritrositlerden NO yapımını ve damarın eine kesiti boyunca difüzyonunu taklit eden matematiksel bir model kullanılmış ve özellikle şiddetli kanamada hematokritin % 30'un altına düşmesiyle düz kas hücrelerine ulaşacak NO miktarının önemli düzeyde düşeceğini ve vasküler tonusunun bozulacağını savunmuşlardır [39].

Her ne kadar eritrositlerde NOS enzimi bulunduğu ve bu enzimin hücrelere etki eden mekanik kuvvetler ile aktif hale geçip hücreden NO çıkışının gerçekleştiği gösterilmiş olsa da, bu NO'nun damar düz kasına ulaşip ulaşmadığı ve damar düz kas tonusunun belirlenmesinde fizyolojik bir öneme sahip olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmada endotel tabakası sıyrılmış damar segmentlerinden mekanik strese uğratılmış eritrosit süspansiyonları perfüze edilmiş ve damar çapında meydana gelen değişimler incelenmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kan akımı

Dolaşım sisteminin temel görevi dokulara besin maddeleri ile oksijenin taşınması ve dokularda oluşan metabolizma yan ürünlerinin ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Bunun yanında farklı fizyolojik koşullarda vücut sıcaklığının ve sıvı dengesinin ayarlanması gibi homeostatik mekanizmalarda da rol oynar. Bu fonksiyonları yerine getirmek üzere dolaşım sistemi bir pompa (kalp) ve içinde oksijen, besin maddeleri ve diğer birçok maddeyi içeren bir sıvıyı (kanı) taşıyan yoğun şekilde dallanmış borular (kan damarları) sisteminden oluşur [40-41].

Kan damarları, kanı kalpten dokulara taşıyan arteriyel sistem, kan ve dokular arasında madde alışverişine izin veren kapiller damarlar ve kanın tekrar kalbe dönüşünü sağlayan venöz sistemden meydana gelir. Arteriyel sistem kanın dokulara yüksek basınç altında taşınmasını sağlayan arterler ve kan akımına en büyük direnci oluşturarak kan basıncı düzeyinin belirlenmesinde rol oynayan aynı zamanda kasılıp gevşeme özellikleri kapiller damarlara gidecek kan miktarını belirleyen arteriyollerden oluşur. Kapiller damarlar kan ile interstisyel alan arasında sıvı, besin maddeleri, elektrolitler ve diğer maddelerin değişimini sağlayan ve tek sıra endotel hücrelerinden oluşmuş oldukça ince çeperli damarlardır. Venöz sistem ise kapillerlerden gelen kanı toplayan venüller ve venüllerden kalbe dönen kan için taşıma boruları olarak görev yapan venlerden oluşmaktadır. Venlerin bir diğer önemli fonksiyonu ise dolaşım sisteminin ihtiyacına göre kontrol edilebilir bir kan deposu olmasıdır[40-41].

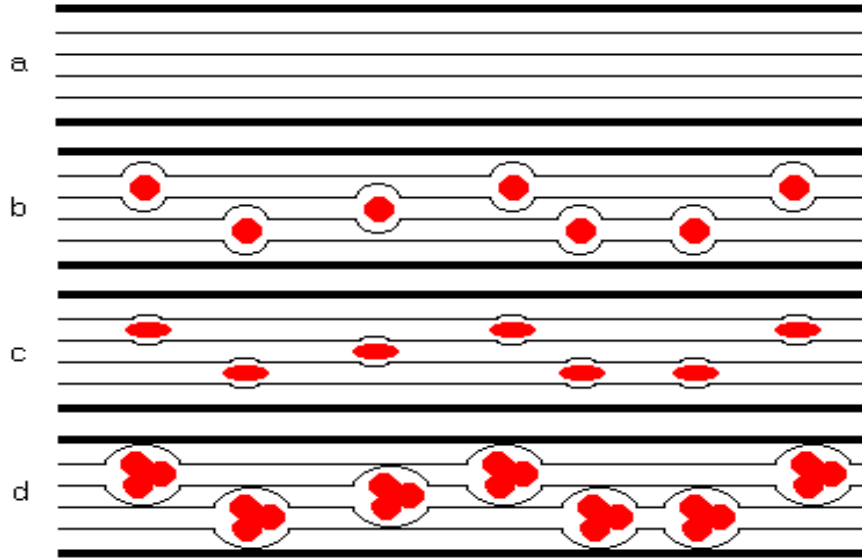
Kan akımı basit olarak dolaşımın belirli bir noktasından belirli bir zaman içinde geçen kan miktarı anlamına gelir. Kan akımı dolaşımın farklı bölgelerinde farklı şekilde düzenlenir.

2.1.1. Kitle Halinde Kan Akımı

Kan, büyük boyuttaki damarlarda iki fazlı bir süspansiyon özelliğindedir [42-43]. Bu koşullarda, damar sisteminin geometrik özelliklerine, kanın fiziksel özelliklerine ve akım hızına bağımlı olarak laminar veya türbülant karakterde akım görülebilir. Laminar akım, sıvı tabakalarının birbiri üzerinde kayması şeklinde gerçekleşir ve buradaki hidrolik direnç oldukça düşüktür [43]. Fizyolojik koşullarda kan akımının karakteri laminardır. Damar geometrisinde yerel değişikliklerle beraber kan akım hızında ani artışlar

görülürse kan akımının karakteri türbülant hale dönüşebilir. Bu koşullarda akım direnci de artar.

Laminer akım koşullarında sıvının akışkanlığı, sıvı tabakaları (laminar) arasındaki sürtünme kuvvetiyle belirlenir. Kan dokusu gibi iki fazlı sıvılarda, birinci faza (plazma) ait laminarlar arasındaki sürtünme ikinci fazı oluşturan parçacıkların, bu laminarları ne ölçüde distorsiyona uğrattığı ile yakından ilişkilidir [44]. Kanın hücresel elemanlarından oluşan ikinci fazdaki parçacıkların kolay şekil değiştirebilen bir özellikte olmaları, onların laminer akım çizgilerine oriyantasyonunu kolaylaştırarak, tabakalar arasındaki sürtünmeyi, dolayısıyla sıvının viskozitesini azaltır [42-43, 45-46]. Tersine, eğer laminarlar arasında yer alan parçacıkların büyüklüğü artarsa, tabakalar arasındaki sürtünme ve viskozite artar [47-48] (Şekil 2). Eritrositlerin tersinir kümelenme (agregasyon) eğilimi, özellikle düşük kayma kuvvetlerinin etkisinde parçacık büyüklüğünü artırarak, viskoziteyi etkiler [49].



Şekil 2.1.: Plazmada içindeki eritrositlerin laminer akım çizgilerine etkileri. (a) eritrositlerin olmadığı durumda plazmanın oluşturduğu laminer akım çizgileri, (b) şekil değiştiremeyen (rijid) eritrositlerin varlığında akım çizgilerinin distorsiyonu, (c) şekil değiştirebilen eritrositlerin varlığında akım çizgilerinin azalmış distorsiyonu, (d) eritrosit agregasyonundan dolayı artmış distorsiyon

Kayma kuvvetleri yeterince büyükse, eritrositler plazma içinde bir sıvı damlası gibi davranırlar. Hidrodinamik kuvvetler küçüldükçe, eritrositler geniş diskoid yüzeylerinden birbirlerine yaklaşarak kümelenirler ve üç boyutlu agregatlar meydana getirirler [46]. Akım hızının yavaşlaması halinde böyle

agregatlar oluşması kan akımı içinde sıvı tabakaları arasındaki sürtünme kuvvetini artırır ve kanı daha viskoz hale dönüştürürler [49].

2.1.2. Kapiller Kan Akımı (Mikrodolaşım)

İnsan dolaşım sisteminde kapiller damarlar 3–8 µm çaptadır. Bu koşullarda, kanın bütün olarak iki fazlı bir sıvı sistemi gibi düşünülmesi olanaksızdır. Bunun yerine, kanın hücresel elemanlarının ve plazmanın bu boyuttaki damarlardan geçişi ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Yer yer kan hücrelerinin boyutlarından daha küçük bir çapa sahip olabilen bu damarlarda akım hızı, büyük ölçüde kan hücrelerinin şekil değiştirme yetenekleri (deformabilite) ile yakından ilişkilidir [2, 50-51].

2.2. Kan Akımına Etkili Fiziksel Faktörler

Kan akım hızı ise kanın bir saniye süresince katettiği mesafe olup birimi cm/saniyedir. Kanın damarlar içindeki akım hızı birçok fizyolojik faktörden etkilenir. Bunlar arasında damarların yarıçapı, uzunluğu gibi geometrik özellikleri, damarların yapı ve dallanmaları gibi mekanik özellikleri, akımı oluşturmak için kalp tarafından oluşturulan basınç ve kanın reolojik özellikleri yer alır [52-53].

19. Yüzyılın ortalarında kan akımını sağlayan fiziksel faktörleri inceleyen J.L.M Poiseuille, bir borudaki sıvının akım hızı ile borunun çapı, uzunluğu ve sürücü kuvvet (basınç) arasındaki ilişkiyi tanımlamıştır. Poiseuille bu çalışmasında rijit bir boru kullanmış ve içinden de basit bir sıvı geçirmiştir. Bu nedenle borunun çapı ve sıvının viskozitesi sabit kalmıştır. Oysa dolaşım sistemindeki damarlar rijit olmayıp kasılıp gevşeme yeteneğine sahip olduklarından çapları akıma göre değişebilmektedir. Bunun yanında damarların içinden akan kan ise basit bir sıvı olmayıp viskozitesi akım koşullarına göre değişmektedir. Buna rağmen Poiseuille yasası dolaşımın hemodinamiklerini anlamak açısından temel oluşturur. Poiseuille yasasına göre, damar içinde akan kanın reolojik özellikleri ve sistemin geometrik yapısı damar yatağının akıma gösterdiği direnci belirler [53].

$$Q = \frac{\pi}{8} \frac{\Delta P \cdot r^4}{L \cdot \eta} \quad (1)$$

Poiseuille eşitliğinde; akım direnci yarıçapın (r) dördüncü kuvveti ile ters, damarın uzunluğu (L) ve sıvının viskozitesi (η) ile doğru orantılıdır. Direncin yarıçapın dördüncü kuvveti ile ters orantılı olması nedeniyle, damar çapındaki en ufak değişim kan akımını büyük oranda etkilemektedir.

2.3. Kan Akımının Düzenlenmesi

Kan, seri ve paralel şekilde düzenlenmiş kan damarları içinde sistemik dolaşımın yüksek basınçlı bölgelerinden düşük basınçlı bölgelerine doğru hareket eder. Bu hareketi sağlayan itici güç kanın kalp tarafından pompalanmasıyla oluşturulur. Kalbin 1 dakikada pompaladığı kan miktarına kardiyak output (CO) denir ve organlara akıma gösterdikleri dirençle ilişkili olarak dağılır. Bir organa olan kan akımı ise (Q) aşağıdaki formülle belirlenir [41, 54]:

$$Q = (TPVR/R) CO$$

Bu formülde TPVR sistemik dolaşımın total periferik vasküler direnci, R ise dokunun içindeki vasküler dirençtir. Dolaşım sisteminde kan akımının belirleyen 3 ana mekanizma vardır. Bunlar nöral, humoral ve lokal mekanizmalar olup her biri birbirinden bağımsız olarak çalışır [41]. Nöral mekanizmalar merkezi sinir sistemi tarafından düzenlenir ve başlıca sempatik sinir sonlanmalarından norepinefrin salınmasına dayanır. Humoral mekanizmalar dolaşımda bulunan anjiyotensin II ve epinefrin gibi vazodilatör etkili hormonlar tarafından düzenlenir. Lokal mekanizmalar ise bir dokunun kendi iç dinamikleriyle belirlenir. Lokal mekanizmalar aşağıda ayrıntılı bir şekilde anlatılacaktır.

2.3.1. Kan Akımının Lokal Olarak Düzenlenmesi

Organizmadaki dokular ve organlar metabolik ve fonksiyonel ihtiyaçlarını karşılamak üzere kendi kan akımlarını düzenleyebilirler. Bu olay, kan akımının lokal yada yerel kontrolü olarak tanımlanan kompleks bir mekanizmadır [7-8]. Kan akımının lokal kontrolü iki kısımda incelenir: Akut kontrol ve uzun süreli (kronik) kontrol. Akut kontrol, dolaşım sisteminde arteriyoller, metarteriyoller ve prekapiller sfinkterler düzeyinde gerçekleşir ve doku için gerekli olan kan akımının saniyeler içinde düzenlenmesini sağlar. Kan akımının kronik kontrolü ise uzun sürede meydana gelen ve mevcut damarların boyutlarında ve/veya sayısında değişiklik olması ile kendini gösteren mekanizmadır [54-55].

Kan akımının lokal düzenlenmesinde rol alan mekanizmalar aşağıda sıralanmıştır [7-11, 55].

- 1) Metabolik ve miyojenik kontrol
- 2) Endotel aracılı kontrol
- 3) Eritrosit aracılı kontrol

2.3.1.1. Metabolik ve Miyojenik Kontrol

Bir çok fizyoloji kitabında kan akımının lokal kontrolü kan akımının otoregülasyonu başlığı altında incelenir. Bu terim, kan akımındaki ani değişikliklere rağmen doku kan akımının sabit tutulmasını sağlayan miyojenik ve metabolik mekanizmaları tanımlar [55].

Bir dokunun metabolik aktivitesi dokuya olan kan akımını düzenler. Bu olaya kan akımının metabolik olarak düzenlenmesi denir. Dokunun metabolizma hızı arttıkça ya da oksijen düzeyi azaldıkça dokulardan vazodilatör metabolitler salınır. Bu vazodilatör metabolitler lokal olarak arteryollere, metarteriyollere ve prekapiller sfinkterlere difüze olarak kas tonüsünü azaltır [55]. Böylelikle bu bölgede kan akımının artmasına neden olarak dokudaki oksijen ve besin maddesi açığı kapatılır. Dokudaki metabolik aktivite arttıkça ya da dokuya oksijen sunumu azaldıkça dokudan daha fazla miktarda vazodilatör madde salınır ve vazodilatasyon devam eder. Metabolik regülasyonda rol alan vazodilatör maddeler arasında adenosin, karbon dioksit (CO_2), laktik asit, adenosin fosfat bileşikleri, histamin, potasyum (K^+) ve hidrojen (H^+) iyonları yer almaktadır [55].

Dokunun metabolizma hızının değişmesiyle dokulardan vazodilatör metabolitlerin salınmasının yanı sıra dokudaki oksijen seviyeleri de vasküler düz kas hücrelerinin kasılma durumunu etkiler. Çünkü düz kas dokusu kasılı kalabilmek için oksijene ve besin faktörlerine ihtiyaç duyar. Oksijen veya besin faktörlerinin eksikliği durumunda ise kan damarları dilate olarak dokuya kan akımını arttırır. Buna ters şekilde dokudaki oksijen konsantrasyonu arttıkça kasın kasılma gücü de artacak ve prekapiller sfinkterler kapanacaktır [56].

Miyojenik düzenlenme, kan akımı kontrolünün doku metabolizmasıyla ilgili olmayan kısmını oluşturur. Bu teori, küçük kan damarlarının intralüminal basınç artışına bağlı olarak gerilmesi durumunda damar duvarında bulunan düz kas hücrelerinin kasılması ilkesine dayanır [57]. Bu nedenle kan basıncının artmasına bağlı olarak damar duvarının gerildiği durumlarda damarlar ani bir şekilde kasılarak dokuya olan kan akımını kısıtlar. Kan basıncının düşük olduğu durumlarda ise düz kasın gerilmesi de az olur ve damarlar gevşer. Burada amaç kan basıncında meydana gelen değişimlere rağmen dokuya olan kan akımını sabit tutmaktır. Miyojenik kontrol, düz kas hücrelerinin doğal bir özelliği olup nöral ve hormonal mekanizmalardan bağımsız olarak gerçekleşir [58]. Miyojenik vazokonstriksiyon sırasında meydana gelen olaylar aşağıda sırasıyla verilmiştir [59].

1. Lümen çapında artış
2. Gerime bağlı olarak düz kasta depolarizasyon
3. Voltaja bağlı kalsiyum (Ca^{+2}) kanallarının açılması
4. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunda artış
5. Miyozin ince zincirinin fosforlanması

Intralüminal basıncın düz kas hücreleri tarafından nasıl algılandığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu konuda üstünde durulan olasılıklardan biri düz kas hücre membranında bulunan mekanosensitif iyon kanallarının kan basıncındaki artış ile aktive olmasıdır. Buna göre intralüminal basınçtaki artışla aktive olan kanallardan hücre içine Na^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının girişi olmaktadır [60].

2.3.1.2. Endotel Aracılı Kontrol

Endotel tabakası bütün kan damarlarının luminal yüzeyini saran ve salgıladığı birçok endotel kaynaklı faktörle vasküler homeostasisin oluşumunda rol alan yüksek düzeyde özelleşmiş ve metabolik olarak aktif bir organdır. Bu tabakayı oluşturan endotel hücreleri salgıladıkları birçok vazoaaktif mediatör aracılığı ile vasküler düz kas hücrelerinin tonüsü ve büyümesini etkilediği gibi bunun yanında dolaşımdaki lökositlerin, eritrositlerin ve trombositlerin reaktivitesini ve vasküler geçirgenliği de düzenleyerek vasküler homeostasisin sağlanmasında önemli roller alır [61].

Endotel hücreleri tarafından salındığı ve düz kas hücrelerinin tonüsünü etkilediği bilinen faktörler arasında nitrik oksit, arazidonik asid metabolitleri, endotelin ve adrenomedüllin gibi peptitler, çeşitli pürinler, adenosin ve reaktif oksijen radikalleri yer alır [62-63]. Her ne kadar endotel kaynaklı vazoaaktif maddeler daha önce tanımlanmış olsa da “Endotel aracılı yanıtlar” terimi Robert Furchgott ‘un 1980 yılında yaptığı bir dizi çalışma sonucu kullanılmaya başlanmış ve endotel hücrelerinin vasküler düz kas hücrelerinin tonüsünü belirlemedeki esas rolleri anlaşılmaya başlanmıştır [64]. Endotel aracılı yanıtlarda rol alan maddelerden aşağıda kısaca bahsedilmiştir. Çalışmamız açısından önem taşıyan NO’dan ise daha ayrıntılı olarak söz edilecektir.

Endotelinler :

Endotelinler (ET), 21 aminoasitden oluşan ve damar düz kasında kasılmaya neden olan peptitlerdir [65]. Başlıca endotel hücreleri tarafından üretilip salgılansa da lökositler, makrofajlar ve kardiyomiyositler gibi başka hücreler tarafından da üretildiği gösterilmiştir. ET’lerin gen sekansı 1987 yılında tanımlanmış ve aynı yıl endotelin olarak isimlendirilmiştir [66].

ET, preproendotelin olarak sentez edilip, endotelin dönüştürücü enzim (ECE) aracılığıyla aktif ET’ye dönüştürülerek salınır [67]. ET’ler, ET-A, ET-B ve ET-C reseptörleri aracılığıyla vasküler etkilerini gösterirler. ET-A

reseptörü damar düz kasında daha fazlayken ET-B reseptörü endotel hücrelerinde bulunur. İlk aktive olduğunda güçlü vazokonstriksiyonu uyarmasına karşın ilerleyen süreçte NO salınımını uyarak etkisini azaltır [68].

ET ailesi ET-1, ET-2, ET-3 ve ET-4 olmak üzere 4 farklı izotipten oluşur. Bunlar arasından en baskın olarak sentez edilen izoform ET-1'dir ET-1 diğer ajanlara kıyasla 10 kat daha güçlü bir vazokonstriksiyon yapar [69]. Deney hayvanlarında sistemik olarak ET-1'e ait reseptörler bloke edilirse damarlarda vazodilatasyona ve kan basıncında %10-20 azalma görülür [69]. Benzer şekilde ECE enziminin inhibisyonu da normotansif insanlarda kan basıncının düşüşüne sebep olmuştur. ET-1, kasıcı etkisini IP3 yolağı aracılığıyla gösterir [70]. Düşük konsantrasyonlarda, ANG II, serotonin, α -adrenerjik agonistler gibi protein kinaz C aracılıklı etki gösteren diğer vazokonstriktörleri de artırır.

Prostasiklin :

Prostasiklin endojen prostanoid ailesinin bir üyesi olup prostaglandin I₂ (PGI₂) olarak da bilinir. PGI₂, endotelden salındığı keşfedilen ilk vazodilatör ajandır ve endotelden salındıktan sonra damar düz kasında cAMP aracılığıyla gevşemeye yol açar [71].

PGI₂, siklooksijenaz 1 (COX 1) ve siklooksijenaz 2 (COX 2) enzimleri aracılığıyla araşidonik asitten üretilir [72]. PGI₂, vasküler homeostazisin sürdürülmesinde ve kan akımının kontrolünde esansiyel rol oynar [73]. Bütün bunların yanında PGI₂ trombosit agregasyonunu güçlü şekilde baskılayarak hemostaz sürecini etkiler. Prostasiklinlerin, iskelet kaslarında kan akımı ve metabolik vazodilatasyonu düzenlemede büyük önemi vardır [74]. Prostosiklin sentezini uyaran agonistler arasında en güçlü uyaran bradikinin, bunun yanı sıra substans P, platelet kaynaklı büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü ve adenin nükleotidleridir [69].

Endotel Kaynaklı Hiperpolarize Edici Faktör (EDHF) :

EDHF, damar düz kas hücrelerini hiperpolarize ederek gevşemelerine yol açıp damar çapında artışa neden olan bir ajandır. İlk olarak NO ve PGI₂ dışında endotel hücrelerinden sentezlenen bir vazodilatör madde olarak tanımlanmıştır [75].

EDHF kaynaklı vazodilatör yanıtların potasyum kanallarının bloke edilmesiyle ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Literatürde EDHF'nin etkisiyle ilgili üç farklı mekanizma önerilmektedir. Bu mekanizmalar türler arasında, damar yatakları arasında ve endotelial uyaranlara göre farklılık göstermektedir. Bunlardan ilkinine göre EDHF Ca⁺² bağımlı K⁺ kanalları aracılığıyla endotelde hiperpolarizasyon oluşturur. Oluşan hiperpolarizasyon, gap junctionlar aracılığıyla vasküler düz kasa iletilerek düz kasta gevşemeye yol açar [76]. Bu fikre göre; endotelial K⁺ kanalları, düz kasta voltaj bağımlı

Ca^{+2} kanalları aracılığıyla Ca^{+2} girişini azaltarak vasküler düz kasın kasılabilirliğine etki eder [77]. İkinci mekanizmaya göre EDHF, epoksieikosatrienoik asit (EET) gibi sitokrom p450 yolağının bir ürünüdür ve EET, BK_{Ca} kanalları aracılığıyla düz kasta hiperpolarizasyona yol açar [77]. Üçüncü mekanizmaya göre ise; endotel hücrelerinden orta ve küçük Ca^{+2} bağımlı K^{+} kanalları aracılığıyla K^{+} çıkışı düz kas hücrelerindeki inward rectifying potasyum kanallarını (K_{IR}) ve sodyum potasyum ATPaz'ları ($\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPaz) aktive ederek düz kasta gevşemeye neden olur [78].

Her ne kadar EDHF'nin varlığı ve etkisi bilinse de literatürde EDHF'nin kimyasal bileşimine ilişkin kesin veriler bulunmamaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalarda K^{+} , hidrojen peroksit (H_2O_2), C-natriüretik peptid, anandamid, EET gibi birçok mediyatör EDHF olarak tanımlanmıştır. EDHF aracılı gevşeme iletim ve direnç damarlarının her ikisinde de tanımlansa da direnç arterlerinde ve damar boyu küçüldükçe katkısı daha fazladır [71].

Nitrik Oksit:

Nitrik oksit, birçok fizyolojik olayda önemli rolü olan, nonpolar, renksiz bir gazdır [79]. 1987 yılına kadar vücutta bulunuş nedeni ve metabolizması tam olarak bilinmeyen NO'nun fizyolojik ve patolojik olaylardaki rollerinin anlaşılmasıyla 1992'de yılın molekülü seçilmiştir [80-81]. Furchgott 1980 yılında ilk defa, izole edilmiş tavşan aortalarında, düz kas hücreleri tarafından asetilkoline gevşeme yanıtının oluşturulması için endotel bütünlüğünün şart olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada asetilkoline cevaben görülen gevşeme yanıtının endotel hücrelerinden Ca^{+2} aracılı salınan bir faktör tarafından oluşturulduğu düşünülmüş ve orijini tam olarak bilinmeyen bu faktöre endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) adı verilmiştir [64]. Aynı yıl Dr. Robert Furchgott, endotelyal muskarinik reseptörlerin asetilkolin ile aktive edilmesi durumunda EDRF salıverildiğini göstermiştir. Ardından 1987'de Dr. Moncada ve Dr. Ignarro'nun EDRF'nin NO olabileceğine dair kanıtlar elde etmesiyle bilimde birçok sorunun yanıtının NO olduğu anlaşılmıştır. Dr. Furchgott, Dr. Ignarro ve Dr. Moncada NO'nun kardiyovasküler sistemde bir sinyal molekülü olarak rolü ile ilgili çalışmaları nedeniyle 1998 yılında Nobel Tıp ve Fizyoloji Ödülüne layık görülmüşlerdir [81-82]. Bu çalışmalar, atmosferi kirlettiği, ozon tabakasını deldiği ve asit yağmurlarına neden olduğu bildirilen NO'nun kaderini bir anda değiştirmiştir.

Suda az çözünen, lipofilik bir molekül olan nitrik oksit hücre membranından kolaylıkla geçer. Nitrik oksitin yüksüz bir molekül olması, çifleşmemiş elektron taşıması hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır [79, 83]. Aynı zamanda NO, taşıdığı çifleşmemiş elektron nedeniyle bir radikal molekül olarak isimlendirilebilir. Diğer serbest radikaller genelde hücreler için zararlı iken NO, düşük konsantrasyonlarda bile çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak, aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olabilmektedir [84]. NO, bu özellikleri ile ideal bir fizyolojik haberci molekül özelliği kazanmaktadır.

Nitrik Oksidin Fonksiyonları:

NO'nun Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri: NO sentez inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda NO yokluğunun vasküler dirençte artışa ve kan basıncında yükselmeye neden olduğu bulunmuştur [81, 85-86]. Bu çalışmalar, damar direncinin dengelenmesinde NO'nun önemli oranda homeostatik rolü olduğunu göstermektedir [87-88].

Endotel hücresinde oluşan nitrik oksit bir kısmı damar düz kas hücresine difüze olurken, geri kalan kısmı kana geçerek dolaşımdaki komşu hücreler (lökosit, trombosit) üzerinde etkili olur [88-89]. NO, düz kas hücresine difüze olduktan sonra cGMP'yi arttırarak düz kas gevşemesine neden olur, cGMP artışı 6 farklı mekanizma ile gevşemeyi meydana getirebilir. Bu mekanizmalar şunlardır [79]:

1. Sarkoplazmik retikulumda Ca^{+2} -ATPaz'ın aktivasyonu ile hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun azalması.
2. Miyozin hafif zincirinin defosforilasyonu.
3. Düz kas hücresi membranındaki reseptör aracılı Ca^{2+} kanallarının inhibe edilmesi.
4. Hücre içi Ca^{+2} düzeyinin düşmesini sağlayan Ca^{+2} taşıyıcılarının, G proteinlerinin, reseptörlerin ve kanal proteinlerinin fosforile edilmesi.
5. Membrandaki Ca^{+2} -ATPaz'ın uyarılması.
6. Potasyum kanallarından potasyum geçişinin arttırılmasıyla hiperpolarizasyon oluşması.

NO'nun Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri: NO, gastrointestinal sistemde birçok fizyolojik etkiye sahiptir. Sekresyon ve motilite, kan akımı, elektrolit ve su absorpsiyonu, mukozal koruma ve inflamasyon gibi olaylarda rolü olduğu gösterilmiştir [90]. NO, mide kan akımını arttırır. NO donörleri vagal uyarı veya histaminle indüklenen asit salgılanmasını azaltabilir [91]. Ayrıca NO donörleri duodenal mukus sekresyonunu arttırarak gastrik asite karşı mukozal koruma sağlar.

NO'nun Sinir sistemi Üzerine Etkileri: NO merkezi sinir sisteminde hafıza oluşumu, denge ve koku alma gibi birçok fonksiyonu destekleyen bir nörotransmitter olarak işlev görmektedir [79, 85, 92-93]. Periferik sinir sisteminde ise nonadrenerjik nonkolinerjik sinir sisteminde etki ederek vazodilatasyon, solunum, mide ve barsak fonksiyonlarının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır [94].

NO'nun Renal Sistem Üzerine Etkileri: NO renal kan akımı, renal otoregülasyon, glomerüler filtrasyon, renin salgılanması ve tuz atılımı gibi

renal fonksiyonların kontrolünde en önemli parakrin düzenleyicidir. Böbrekte glomerüler ve medüller mikrodolaşım, endojen NO tarafından regüle edilir [95-96]. Tubuloglomerular feedback, kısmen NO salınımı tarafından düzenlenir [96].

NO'nun İmmün ve İnflamatuvar Sistemler Üzerine Etkileri: Proinflamatuvar sitokinlerin iNOS'u uyarak NO üretimini artırırlar. NO'nun, makrofajların intraselüler ve ekstraselüler patojenleri ortadan kaldırmada etkilerine aracılık ettiği, bununla beraber sitotoksik etkide NO formunun değil O_2^- ile etkileşimi ile meydana gelen peroksinitritin etkili olduğu bildirilmiştir [85]. Ayrıca, makrofaj kökenli NO'nun inhibitör etkileri tümör hücreleri üzerine olduğu gibi lenfositlerde de görülür [97]. Aktive olmuş makrofajların lenfositlerin mitojen veya antijenlere verdiği proliferatif cevaptaki baskılayıcı etkisi kısmen NO'ya atfedilmektedir [98-100].

Nitrik Oksit Üretimi:

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından sentezlenir. Fonksiyonel olarak 1990 yılında Bult ve arkadaşları tarafından tanımlanan NOS'un primer yapıları yüksek homolojiye sahip, üç farklı izoformu bulunmaktadır: 1) nöronal NOS (NOS I veya nNOS); 2) indüklenebilir NOS (NOS II veya iNOS); 3) endotelial NOS (NOS III veya eNOS) [85, 101-105]. Nöronal NOS ve endotelial NOS yapısal olarak eksprese edilirken (NOS 1, NOS 3) diğer NOS izoformu olan indüklenebilir NOS yapısal değildir ve çeşitli sitokinler tarafından indüklenebilir (NOS 2).

Nitrik oksit, NOS enzimlerinin katalizlemesiyle L-arjinin'in terminal guanido nitrojeninden sentezlenir. Bu sentez iki basamaktan oluşur: Birinci basamak L-arjinini N-oksidasyonu ile L-OH-arjinin oluşumudur. İkinci basamakta ise L-OH arjinin C-N bağı oksidatif olarak parçalanır ve sonuçta sitrulin ve NO oluşur. NOS enzimi, L-arginin amino asidinin terminal guanidino grubundaki nitrojenin oksidasyonunu sağlar [104, 106]. Bu reaksiyon, hem oksijen hem de nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) bağımlıdır ve nitrik oksidin yanı sıra L-sitrullin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. NOS aracılı NO oluşumu için gerekli olan substratlar, L-arjinin aminoasiti, moleküler oksijen ve NADPH'dır. Kofaktör olarak ise tetrahidrobiopterin (BH4), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve sitokrom P450 kullanılmaktadır [79, 102, 104-105]. NO sentezi yapan hücreler arjininin hücre içine aktif bir şekilde alınmasını sağlayan mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizma diğer katyonik aminoasitlerin taşınımında da kullanılabilen bir y^+ taşıyıcıyı içerir [107].

Bu üç NOS izoformunun subselüler lokalizasyonu da değişkenlik gösterir. nNOS ve iNOS çözümlü sitozolik proteinlerdir. eNOS ise hücresel membranda partiküler subselüler fraksiyonda özellikle de plazmalemma kaveola'da bulunur [108]. Endotel hücrelerinde bulunan eNOS enzim aktivitesi lokalizasyonu ile belirlenir. Yeni sentezlenen eNOS enzimi Golgi kompleksinde membrana myristol ve palmitol gruplarıyla bağlı halde bulunur

[109]. Daha sonra veziküler taşıma yoluyla hücre membranına taşınarak burada kolesterol ve lipitten zengin membran girintileri olan ve kaveola adı verilen yapılara yerleşir. eNOS proteini burada oldukça fazla eksprese edilen kaveolin-1 proteinine bağlanır [110]. Bu bağlanma eNOS enziminin katalitik aktivitesi inhibe eder. Çünkü kaveolin-1 proteini eNOS enziminin aktive olmasında önemli bir basamak olan kalmodulin bağlanmasını engeller. Hücreye Ca^{+2} girişiyle ise kalmodulin eNOS enzimine bağlanır ve eNOS ile kaveolin-1 arasındaki ilişkiyi ortadan kaldırarak enzimin aktive olmasını sağlar. Böylelikle eNOS enzimi membrandan ayrılarak sitoplazmaya geçer. Sitoplazmada Protein kinaz B olarak da bilinen Akt enzimi eNOS enzimini serin 1177 bölgesinden fosforlayarak aktivitesinin daha da artmasına yol açar. Ayrıca eNOS'un bir stres proteini olan HSP 90 ile bağlanması da hem kalmodulinin hem de Akt'nin enzime bağlanmasını kolaylaştırarak enzim aktivasyonunda önemli bir rol oynar. eNOS'un inhibe olması ise hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonlarında azalma ve enzimin defosforile olması ile gerçekleşir. Bu faktörler eNOS'un tekrar kaveolin-1 proteinine bağlanmasına ve golgi kompleksine geçerek burada palmitol gruplarının enzime eklenmesiyle kaveolaya taşınarak inaktive olmasına neden olur.

Belli koşullar altında; NOS, NO yerine O_2^- üretebilir [105]. NOS tarafından O_2^- oluşumu, oksijenaz domaininin hem grubu aracılığıyla olur, sübstrat (L-arjinin) ve kofaktör (BH4) varlığına bağlıdır [111-112]. NOS, her iki faktörün veya birinin konsantrasyonunun düşük olması durumunda O_2^- oluştururken, sübstratı ve kofaktörü yeterli miktarda olduğu zaman NO üretir.

NOS enzimi, oksijenaz (1 - 491 aminoasit) ve redüktaz (492 - 1205 amino asit) olmak üzere 2 adet globüler protein motifine sahiptir [113]. Memeli NOS'ları sadece dimerik formda oldukları zaman fonksiyonel olarak aktiftirler. Redüktaz bölgesi, NO üretimi için gereken elektronları, redükte olmuş NADPH'ı dehidrojenize ederek üretir [105]. Elektronlar daha sonra oksijenaz bölgesine geçerler. Kalsiyum bağlı kalmodulinin NOS'un COOH-terminal redüktaz ve NH₂ terminal oksijenaz domaininin arasına bağlanmasından sonra elektron transferi aktive olur. Kalmodulin, flavinlerden NOS'un hem bölgesine elektron transferinde görevli olup, NO biyosentezinde önemli bir basamak olan, flavin indirgenmesinin hızını belirler [114-116]. Oksijenaz bölgesi, NO üretim yeridir ve hem, L-arjinin ve BH4 bağlar. Ayrıca çinko (Zn) bağlama bölgesine sahiptir [117] (Şekil 8). Her NOS dimeri bir çinko iyonu içerir ve bu da dimerik molekülün stabilizasyonunu sağlar. Tüm NOS izoformları kalmodulin bağlanma bölgesi içerse de kalmodulinin NOS2'ye bağlanması onu kalıcı bir alt birim haline getirir. eNOS ve nNOS'a kalmodulin bağlanması ve aktivasyonu fizyolojik Ca^{+2} konsantrasyon değişikliklerine cevaben meydana gelirken, kendisine sıkıca bağlı kalmoduline sahip olan iNOS düşük Ca^{+2} konsantrasyonlarında bile maksimum flavin redüksiyonuna imkan sağlar [87-89, 118].

Nitrik Oksit'in Metabolizması:

İnsan plazmasında oksijen varlığında NO hızlı bir şekilde esas yıkım ürünü olan nitrite (NO_2^-) dönüşür. Plazmada bulunan nitrit, eritrositler tarafından hücre içine alınarak methemoglobin tarafından nitrate (NO_3^-) oksitlenebilir. Nitrat daha sonra plazmaya tekrar geçer [119]. Plazmada bulunan NO'nun bir diğer yıkım yolu da güçlü bir antioksidan olan peroksinitriti (ONOO^-) oluşturmak üzere O_2^- anyonlarıyla hızlı bir şekilde reaksiyona girmesidir. Fazla miktarda bulunan peroksinitrit daha sonra nitrate parçalanabilir. Bunların yanında NO oksijen ile de reaksiyona girer ve reaktif bazı ara ürünler oluşturabilir. NO'nın sıvı bir ortamda otooksidasyonu, dinitrojentrioksit (N_2O_3) gibi reaktif nitrojen oksit ürünlerinin oluşumuna neden olabilir [102]. Bu ürün farklı substratları okside veya nitroze ederek nitrozaminler veya nitrozotollerin ortaya çıkmasına sebep olabilir. Yapılan çalışmalar plazmada yüksek konsantrasyonlarda bulunan redoks aktif tiollerin NO ile ilişki kurarak onu memeli dolaşımında biyoaktif S-nitrosotoller (RSNO) şeklinde taşıyabildiklerini göstermiştir [120]. Plazmadaki RSNO'lar yüksek moleküler ağırlıklı RSNO'lar (S-nitrosoalbumin) ve düşük moleküler ağırlıklı RSNO'lar (S-nitrosoglutatyon) olmak üzere iki gruba ayrılır. Oksijen varlığında NO'nun plazmada tioller ile girdiği reaksiyon sonucu oluşan esas ürünün SNOAlb olduğu düşünülmektedir [81, 88].

Plazmaya ek olarak NO, eritrositlerde direk Hb'le reaksiyona girerek de metabolize olur [119-120]. Eritrosit içinde bulunan Hem proteininin oksijenasyon durumuna göre NO ile Hb arasında üç farklı reaksiyon gerçekleşebilir: Sıvı ortamlarda NO hızlı bir şekilde oksihemoglobin (OksiHb) ile reaksiyona girerek NO_3^- ve methemoglobin (MetHb) oluşumuna sebep olur. Genel olarak, bu reaksiyonun NO'nun in-vivo ortamdaki esas inaktivasyon yolu olduğu düşünülmesine rağmen son zamanlardaki çalışmalar bunun her koşul altında doğru olmayabileceğini düşündürmektedir. NO'nun eritrosit içindeki oksihemoglobin ile reaksiyon hızı onun eritrosit içine difüzyon hızı ile sınırlı olup, serbest oksihemoglobin ile reaksiyon hızına göre 650 kat daha yavaştır. Alternatif olarak, NO deoksihemoglobinin hem grubuna bağlanarak nitrozilhemoglobin (NOHb) oluşumuna sebep olur. Üçüncü bir yol ise NO veya NO_2 ve N_2O_3 gibi daha yüksek oksidasyon ürünlerinin beta hemoglobin zincirlerinin sülfhidril gruplarının 93. sistein rezidüsü ile reaksiyona girerek SNOHb oluşumuna sebep olmasıdır [26, 120]. NO ile hemoglobin arasındaki bu 3 farklı reaksiyonun gerçekleşme oranı oksijen parsiyel basıncına bağlıdır. Venöz kanın NO ile muamele edilmesi sonucu daha fazla NOHb daha az NO_3^- , arteriyal kanın muamelesi sonucu ise daha fazla NO_3^- daha az NOHb olduğu gösterilmiştir. Ek olarak hemoglobinin oksijenasyon durumu SNOHb oluşumunu kolaylaştırır. Stamler ve arkadaşları hem demirine oksijen bağlanmasının hemoglobinin beta zincirinde bulunan sistein rezidüsüne NO bağlanmasını artırarak, SNOHb oluşumunu sağladığını göstermişlerdir [26]. Deoksijenasyon ise SNOHb'nin allosterik dönüşümüne sebep olarak NO salınımını sağlar.

eNOS Aktivitesinin Kontrolü:

eNOS, bazal koşullarda endotel hücresinde sürekli olarak ancak az miktarda NO sentezi yapar. Kültüre edilmiş endotel hücrelerinde eNOS enzimi yapısal olarak eksprese olmasına rağmen bazı faktörlerin de enzim aktivitesini ve bazal ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir. Kayma gerilimi, eNOS aktivitesini arttırmaktadır. Düzenli egzersiz yaptırılan köpeklerde de eNOS düzeylerinin arttığı bildirilmiştir [121]. TNF- α , okside LDL artışı ve hipoksi gibi faktörler ise eNOS aktivitesini azaltmaktadır. Ayrıca kaveolanın transmembran proteini olan kaveolin de eNOS'u inhibe edebilir [108]. Bu inhibisyon Ca-kalmodulin kompleksi tarafından tamamen ortadan kaldırılabilir [108].

eNOS fosforilasyonu, eNOS aktivitesini kontrol eden kritik regülatör mekanizma olarak tanımlanır. eNOS üzerinde en az 5 spesifik fosforilasyon bölgesi tanımlanmıştır [122]. eNOS fonksiyonunda fosforilasyonun önemini destekleyen veriler bulunması ve giderek artmasına rağmen fosforilasyonun regülasyonunda rol alan protein kinazlar ve fosfatazlarla ilgili çelişkili bilgiler bulunmaktadır. Örneğin, eNOS'un serin 1177 aminoasitinin, in vivo ve in vitro koşullarda 5 farklı protein kinaz tarafından fosforillendiği gösterilmiştir [123-127]. Serin 1177 bölgesi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen diğer bölgelerin fosforilasyonunun önemi hala tartışmalıdır [122]. eNOS enzimi fizyolojik uyarılara cevaben serin 1177, serin 633, serin 615, threonin 495 ve serin 114 bölgelerinden fosforillenmektedir.

eNOS-serin 1177 bölgesinin fosforillenmesi, enzim aktivitesinin artmasına neden olur. Bu bölgenin fosforillenmesi ile bazal aktivitenin 2 kat arttığı bildirilmiştir [125, 128] eNOS-threonin 495 bölgesinin fosforillenmesi ile ise enzim aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir [108, 122, 124, 129]. Literatürde diğer fosforilasyon bölgelerinin eNOS enzim aktivitesi üzerine etkilerine dair çelişkili bilgiler bulunmaktadır [122].

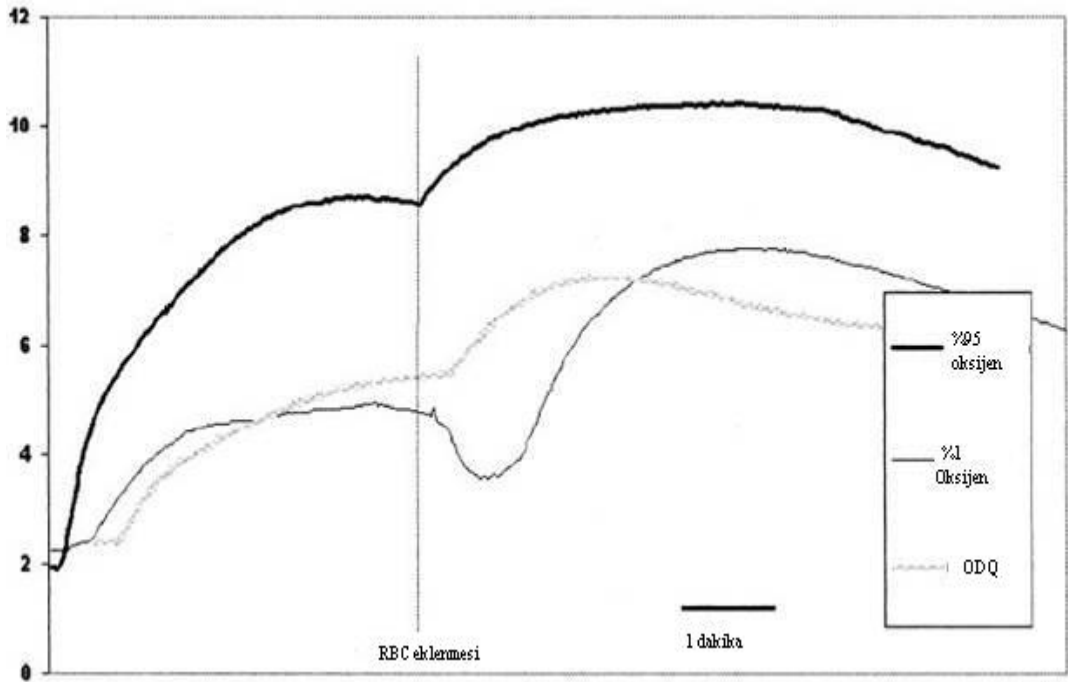
2.3.1.3. Eritrosit aracılı kontrol

Eritrositler yüksek miktardaki hemoglobin içerikleri nedeniyle genel olarak solunum yüzeyleri (akciğerler, solungaçlar) ile metabolik olarak aktif dokular arasında O₂ taşınmasını sağlayan hücreler olarak tanımlanırlar. Ancak son yıllarda eritrositlerin çok önemli bir görevi daha olduğu açığa çıkmıştır. Bu da kan akımının lokal olarak düzenlenmesidir [3, 11, 26, 130]. Dokulara oksijen sunumunun gerçekleşmesi kan akımıyla ilişkili olduğundan eritrositler tarafından kan akımının düzenlenebiliyor olması fizyolojik açıdan büyük önem taşımaktadır.

Lokal kan akımının eritrositler tarafından düzenlenmesine ilişkin son yıllarda oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Bunlardan ilki James ve arkadaşlarına ait olup bu çalışmada tavşan torasik aortaları farklı oksijen parsiyel basıncı içeren ortamlarda fenilefrin ile kastırılmış ve damar gerimleri platoya ulaştığı anda ortama eritrosit eklenmiştir. %1 oranında oksijen içeren

koşullarda damar banyosuna eritrosit eklenmesiyle damar düz kasında %35 oranında gevşeme yanıtı gelişirken oksijene koşullarda damar banyosuna eritrosit eklenmesi kasılma yanıtına neden olmuştur. Hipoksik koşullarda gözlenen bu gevşeme yanıtı bir siklik guanozin monofosfat (cGMP) inhibitörü olan 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) varlığında ise inhibe olmaktadır. Bu nedenle damar preparatlarının üzerine eklenen eritrositlerin yalnızca hipoksik koşullarda ve düz kas hücrelerinde cGMP yolağını kullanarak dilatasyon yanıtına neden olduğu söylenebilir (Şekil 2.3.2.) [14]. Öte yandan Stamler ve arkadaşları endotel tabakası sıyrılmış damar segmentlerine hipoksik koşullarda eritrosit eklenmesiyle damar düz kas tonüsünün azaldığını göstererek eritrositlerin endotelden bağımsız olarak gevşeme yanıtına neden olduğunu kanıtlamıştır [16]. Bütün bunların yanı sıra, eritrositlerin özellikle hipoksi ve mekanik stres koşullarında endotel aracılı yollar ile de damar düz kas hücrelerinde oldukça hızlı ve büyük miktarda gevşemeye neden olduğu bilinmektedir [17, 131].

Yukarıda bahsedildiği gibi eritrositler hem endotel aracılı hem de endotelden bağımsız mekanizmalarla damar düz kasında gevşemeye neden olmaktadır. Bu mekanizmalar eritrositlerden salınan moleküllere göre 2 ana başlıkta toplanabilir [14-17]. Bunlar; 1) Eritrositlerden ATP salınımı 2) Eritrositlerden NO ya da NO biyoaktivitesine sahip moleküllerin salınımıdır.



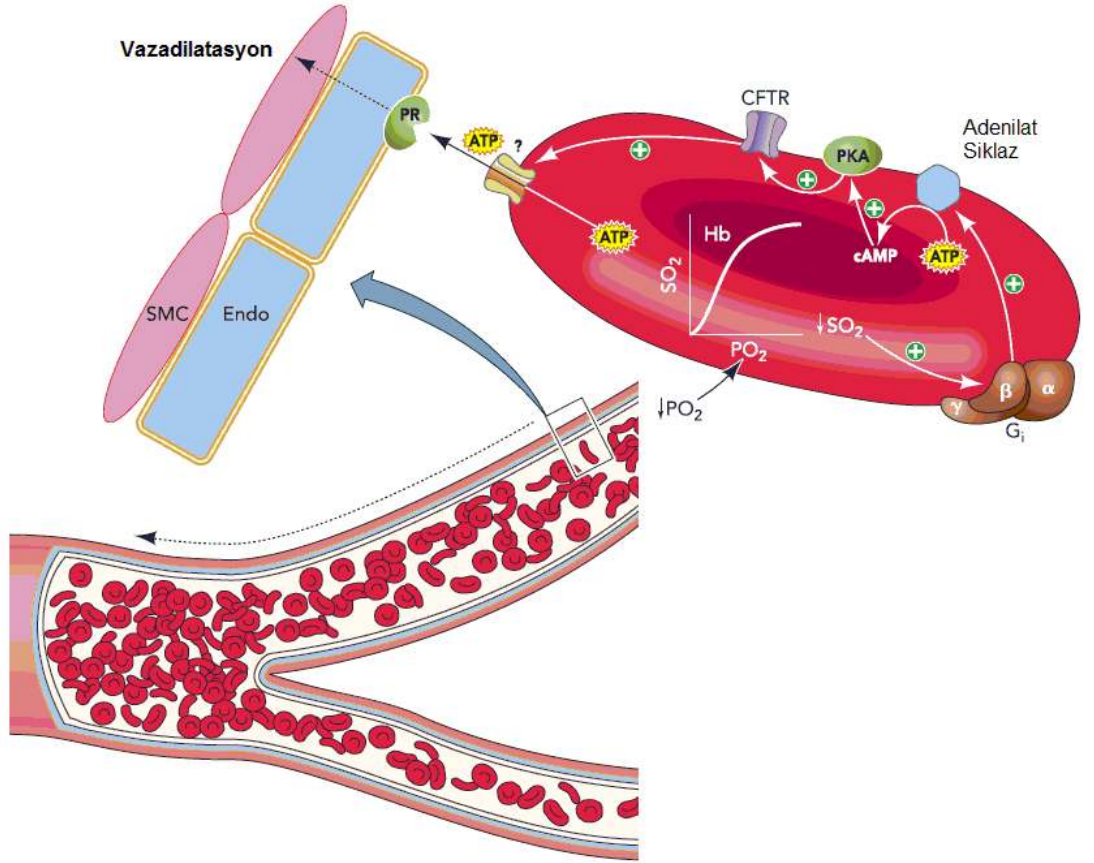
Şekil 2.2. Tavşan torasik aortalarına %95 ve %1 oksijen içeren ortamlarda eritrosit eklenmesinin damar tonüsüne etkisi [14].

Eritrositler'den ATP Salınımı:

ATP, hücrelerde koenzim olarak kullanılan bir nükleotit olup en önemli işlevi hücre içi biyokimyasal reaksiyonlar için gereken kimyasal enerjiyi taşımaktır. Eritrositler, hücre membranında yerleşmiş glikolitik enzimler tarafından üretilen milimolar düzeylerde ATP içerir [132].

Eritrositlerden ATP salınımı tarihsel olarak eritrositlerin kan akımı düzenlenmesinde tanımlanan ilk rolleridir ve ilk defa 1992 yılında Forrester ve arkadaşlarının insan eritrositleri ile yaptıkları bir çalışmada gösterilmiştir [11, 17, 133]. Eritrositlerden plazmaya salınan ATP endotel hücreleri üzerinde bulunan reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir. ATP'nin endotel hücrelerinde bulunan hedef reseptörleri purinerjik reseptörlerdir. Eritrositlerden salınan ATP parakrin yolla etki ederek endotel hücre yüzeyinde bulunan P2y reseptörlerine bağlanır. Bu reseptörler Gq proteini ile eşleşen G protein bağlı reseptörler olup aktive olunca fosfolipaz C (PLC) aktivasyonu üzerinden hücre içinde inositol 3 fosfat yapımını artırırlar. endotel hücrelerinde nitrik oksit (NO) ve araşidonik asit metabolitlerinin sentezi başlar ve sentezlenen NO, düz kas hücrelerine difüze olarak burada guanilat siklaz aktivasyonu üzerinden gevşeme yanıtına neden olur [134]. Günümüzde çeşitli fizyolojik ve farmakolojik uyaranlara cevaben eritrositlerden kontrollü bir şekilde ATP salınımının gerçekleştiği bilinmektedir. Eritrositlerden ATP salınımını sağlayan fizyolojik uyaranlar arasında eritrositlerin mikrodolaşımdan geçerken karşılaştıkları mekanik kuvvetler [12-13, 23] ve düşük oksijen parsiyel basınçları [28, 133, 135] yer almaktadır. Her iki durumda da hücreden salınan ATP miktarı uyaranın büyüklüğünden etkilenmektedir. Hücreden ATP çıkışına neden olan farmakolojik uyaranlar arasında ise eritrosit membranında bulunan beta adrenerjik reseptörleri aktive eden ajanlar yer almaktadır. Bunlar da doza bağımlı olarak ATP salınımını düzenlerler [21].

ATP bir polivalen anyon olup hücre membranından geçemediği kabul edilir [136]. Literatürde eritrositlerden ATP salınımını açıklayan mekanizmalar arasında Pannexin-1 adı verilen bir gap junction proteini, kistik fibrosis gen ürünü klor kanalı (CFTR) ve voltaj bağımlı anyon kanalları (VDAC) yer almaktadır [137-139].



Şekil 2.3. Eritrositlerden ATP salınımı aracılığıyla kan akımının düzenlenmesi [18].

Eritrositlerden ATP salınımını gerçekleştiren mekanizmalar da açıklığa kavuşturulmuş olup bunlar heterotrimerik G proteinleri olan stimülatör G proteini (Gs) ve inhibitör G proteini (Gi) adenilat siklaz, protein kinaz A ve kistik fibrosis transmembran iletkenlik düzenleyicisini (CFTR) içermektedir (Şekil 2.3.2.1.). Yapılan çalışmalar Gs ile ilişkili olan adrenerjik reseptörlerin ve prostasiklin reseptörlerinin konsantrasyona bağımlı şekilde hücrede siklik adenozin monofosfat (cAMP) artışına neden olarak hücreden ATP salınmasına yol açtığını göstermiştir. Ancak, mekanik kuvvetlere ya da düşük oksijen basınçlarına maruz kalan eritrositlerde aktive olan G proteini Gs değil Gi'dir. Bu uyarılar Gi proteinlerinin adenilat siklaz aktivasyonuna neden olan $\beta\gamma$ subunitelerini aktive ederek hücre içinde cAMP seviyelerinde artışa neden olmaktadır [18, 140].

Bütün bunların yanında eritrositlerden plazmaya ATP salınımını inhibe eden mekanizmalar da iyi bilinmektedir. Bunlar arasından ilki NO aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar lümene salınan ATP'nin endotel hücrelerini uyarmasıyla bu hücrelerden yapıp salıverilen NO'nun sadece düz kas hücrelerine değil bunun yanında lümene doğru da difüze olduğu ve eritrositleri etkilediği hipotezine dayanmaktadır. Buna göre eritrositler bol miktarda NO bulunan bir damar yatağına girdiklerinde fazladan

NO salınımı gerekli değildir ve NO eritrositlerden ATP çıkışını inhibe etmektedir. NO'nun bu etkisini, fizyolojik uyaranlara cevaben eritrositlerden ATP salınmasını sağlayan Gi proteinini inaktive ederek gerçekleştirdiği gösterilmiştir [19]. Ayrıca lümene salınan ATP'nin burada bulunan enzimler tarafından metabolize edilmesiyle oluşan adenozin difosfat (ADP)'ında ATP salınımında rolü olduğu öne sürülmektedir. ADP, eritrositler üzerinde bulunan purinerjik reseptörlere bağlanmakta ve hücre içinde cAMP düzeylerini azaltarak ATP salınımında azalmaya neden olmaktadır [141].

Eritrositler'den NO ve NO Biyoaktivitesine Sahip Moleküllerin Salınımı:

Eritrosit ve NO ilişkisini araştıran ilk çalışmalar eritrositlerde bulunan hemoglobinin 'NO tüketici' etkisi üzerinde durmuştur [15, 142-143]. Bu nedenle eritrositlerin damar düz kas tonüsünün belirlemesindeki tek temel fonksiyonlarının plazma içindeki NO seviyelerinin azaltılması yönünde olduğu düşünülmüştür. Eritrositlerin NO tüketici etkileri kan akımıyla ve hemoglobinin lokalizasyonu ile yakından ilişkilidir. Kan akımında meydana gelen artış NO tüketici etkiyi azaltırken [144], hemoglobinin plazmada serbest halde olması bu etkiyi 600 kat arttırmaktadır [15]. Ayrıca parsiyel oksijen basıncı da hemoglobinin NO'ya afinitesini etkilemektedir. Yüksek oksijen parsiyel basınçlarında hemoglobinin NO'ya afinitesi artarken, parsiyel oksijen basıncının düşmesiyle bu afinite azalmaktadır [24, 145].

Bütün bunların yanında son yıllarda yapılan çalışmalar eritrositlerin NO biyoaktivitesindeki rollerinin sadece NO tüketimi değil; bunun plazmaya NO salınımını gerçekleştirmek de olduğunu göstermiştir. Bugün eritrositler tarafından NO salınmasına ilişkin 3 farklı mekanizmadan bahsetmek mümkündür:

1) Eritrositler endotel hücreleri tarafından üretilen NO'yu S-nitrosohemoglobin halinde taşıyarak hipoksik koşullarda NO şeklinde salarlar [26]

2) Eritrositler plazmada bulunan nitriti hipoksik koşullarda NO'ya çevirirler [130, 146]

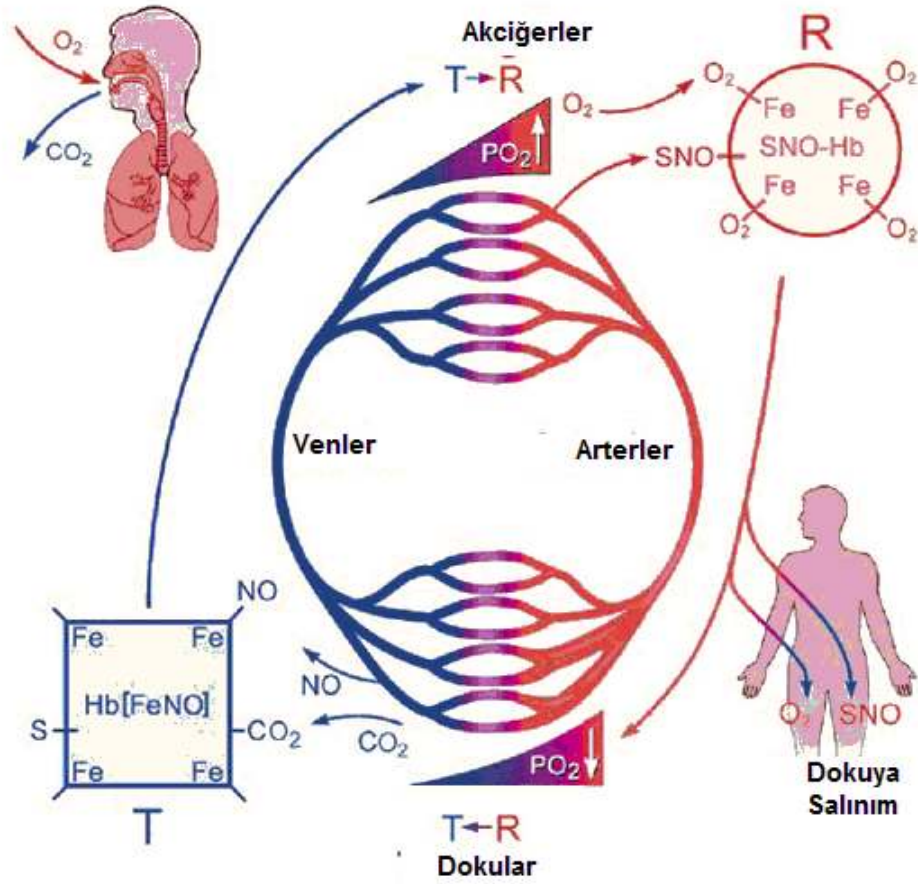
3) Eritrositler eNOS enziminin aktivasyonu ile NO üretirler [3, 32, 37]

Eritrositlerde gerek eNOS enzimi aracılığıyla gerekse diğer yollarla üretilen NO'nun hücreden nasıl çıktığı ise henüz tam olarak netlik kazanmamıştır. Bu konuda öne sürülen görüşler arasında NO'nun eritrositlerden serbest olarak difüzyona uğraması ve membranda yerleşmiş proteinler tarafından NO çıkışının kolaylaştırılması yer almaktadır [147-148]. Bahsedilen membran proteinleri arasında Band 3 (anyon değiştirici) en önemlisidir [25].

1) NO'nun S-nitrosotiol Şeklinde Taşınması:

S-nitrosohemoglobinin de içinde yer aldığı S-nitrosotioller (SNO), bir tiolün sülfür atomuna kovalent olarak bağlanmış nitrosil grubu içeren yapılardır. Genel formülleri RSNO dur. RSNO'lar, sistein ya da glutatyon gibi düşük moleküler ağırlıklı moleküllerden Hb gibi yüksek moleküler ağırlıklı proteinlere kadar değişen farklı organik yapılardan oluşabilir [149]. NO ve hemoglobinin S-nitrosotioller şeklinde birlikte bulunabileceği ilk olarak 1992 yıllarında literatürde yerini almıştır [26, 150]. Bugün ise NO'nun protein tiollerine bağlanarak proteinlerin konformasyonu, fonksiyonu ve diğer moleküllerle ilişkisini düzenlediğine dair yüzlerce yayın bulunmaktadır. Hemoglobin tarafından inaktive edilmeye karşı oldukça dirençli olan bu yapının NO'ya göre daha uzun bir biyolojik aktivite süresi olduğu da gösterilmiştir [151].

1995 yılında Jia ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada eritrositler içinde SNO oluştuğu ve bu yapıdan NO'nun uygun koşullarda ayrılıp hücre dışına çıktığı ilk kez kanıtlanmıştır (39). Daha sonra yapılan araştırmalar eritrositlerin akciğerlerde oksijen ile yüklenmeleri sırasında endotel tarafından sentezlenen NO'nun eritrosit içine girdiğini ve oksijen ile yüklü R konumundaki hemoglobinin beta zincirine bağlanarak SNO oluşturduğunu göstermiştir. SNO eritrositler içinde damar sisteminin diğer bölümlerine taşınmakta ve hipoksik koşullarda hemoglobinin desatürasyonu sırasında oksijen ile birlikte ortama salınmaktadır (2; 64). Dolayısıyla eritrositler birer NO taşıyıcısı olarak NO biyoaktivitesine katılmaktadır (Şekil 2.3.2.2.)



Şekil 2.4. Eritrositlerde SNO oluşumu ve dokulara salınımı [152].

Eritrositler tarafından SNO şeklinde taşınan ve hipoksik koşullarda lümene salınan NO'nun damar düz kasında siklik guanozin monofosfat (cGMP) aracılı vazodilatasyon yanıtının gelişmesine neden olduğu birçok araştırmada gösterilmiştir [16, 24, 31].

2) Nitritin İndirgenmesi:

Nitrit, NO'nun biyolojik bir metabolitidir ve deneysel çalışmalarda lokal ve sistemik dolaşımdaki eNOS aktivitesinin bir göstergesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunun yanında nitritin, asidotik ve hipoksik koşullarda bir NO prekürsörü olduğu gösterilmiş ve böylece nitrite bakış açısı daha da gelişmiştir [153-154].

Dolaşım sisteminde bulunan nitritin kaynağı büyük oranda eNOS enzimi tarafından yapıp lümene difüze olan NO'dur [155]. eNOS enzimi bulunmayan farelerin plazma nitrit seviyelerinin kontrollerine göre % 70 oranında daha düşük olduğu gösterilmiştir [156-157]. Nitritin fizyolojide

giderek artan önemine karşın kanda stabil şekilde bulunmaması ve kan alınırken meydana gelen kontaminasyonlar nedeniyle plazma örneklerinde nitrit konsantrasyonlarının belirlenmesi oldukça güçleştirir. Bu nedenle bugüne kadar rapor edilen sonuçlarda nitritin plazma konsantrasyonları oldukça geniş aralıklarda tanımlanmıştır [158-159]. Schechter ve arkadaşları dinlenim durumunda tam kandaki nitrit seviyelerini yaklaşık 200 nM; eritrositteki nitrit seviyelerini ise 300nM olarak saptamıştır. Buna göre eritrositler plazmadan daha fazla miktarda nitrit içermektedir [160].

Eritrositler tarafından nitritin NO'ya indirgenmesi, lümende bulunan nitritin eritrosit içine girmesiyle gerçekleşir. Nitritin eritrositlere girişi hakkındaki ilk görüşler Band 3 proteininin aracılığını işaret etse de bu süreçte başka mekanizmaların da rol alabileceği düşünülmektedir [161-162]. Eritrositler hücre içindeki nitriti deoksihemoglobin veya membranda bulunan ksantin oksidoreduktaz ve nitrik oksit sentaz enzimleri aracılığıyla NO'ya indirgeyebilmektedir [130, 163]

Eritrositler tarafından nitrit indirgenmesi yoluyla oluşturulan NO'nun damar düz kasında gevşemeye neden olduğu gösterilse de [153, 164-165]; böyle bir yanıt elde edebilmek için gereken nitrit konsantrasyonları fizyolojik sınırların üstünde olduğundan fizyolojik koşullarda nitritin vazodilatör rolü tam olarak netlik kazanmamıştır [166-167].

3) NOS aracılığıyla NO Sentezi:

Doku kan akımının düzenlenmesinde önemi rolleri olduğu bilinen NO'nun sentezinden son yıllara kadar sadece endotel hücreleri sorumlu tutulmuştur [168-169]. Ancak deneysel çalışmalar ve teorik analizler, dolaşım sisteminde endotel hücrelerinin dışında başka hücrelerden de, NO sentezlendiğini ve dolaşıma salındığını göstermiştir [148, 170]. Bu hücreler arasında özellikle eritrositler vurgulanmaktadır [32].

Bu konuda yapılan ilk çalışmalar eritrositlerde bir NOS enziminin var olduğunu gösterse de bu çalışmalarda enzimin aktif olduğu kanıtlanamamış ve eritrositlerin gelişim sürecinde fonksiyonunu kaybeden inaktif bir protein olarak tanımlanmıştır [171]. İlk olarak 2006 yılında Kleinbongard ve arkadaşları tarafından yapılan kapsamlı bir çalışmada kan hücrelerinden köken alan NO'nun büyük oranda eritrositler tarafından üretildiği gösterilmiştir [32-33]. Eritrositlerde bu enzim hem sitozolde hem de membranın iç yüzünde yerleşmiş durumdadır ve membranda sitoplazmadan %20-30 daha fazla miktarda bulunur. Ayrıca bu iki kompartmandaki enzimler arasında diğer NOS taşıyan hücrelerde de olduğu gibi fonksiyonel bir ilişki olduğuna dair deliller mevcuttur [32].

Eritrositlerde bulunan NOS enzimi endotel hücrelerinde bulunan eNOS enzimi gibi L-arjinin tarafından uyarılır ve genel NOS inhibitörlerine duyarlıdır. Enzimin aktivitesi serin 1177 bölgesinden fosforilasyon ile olur. Bu fosforilasyon hücre içi kalsiyum miktarı ve fosfotidol inositol 3 kinaz (PI3K)

tarafından düzenlenmektedir [32]. Bu nedenlerle eritrosit NOS enziminin eNOS enzimine benzerliği dikkat çekmektedir. Ayrıca L-arjininin L-sitrüline dönüşüm hızıyla belirlenen NOS enzim aktivitesi eritrositlerde ve endotel hücrelerine birbirine yakındır (0.3 -0.7 pmol/pg/dk) [32].

Eritrositlerde NOS ile İlişkili Proteinler:

eNOS enzimi eritrositler içindeki lokalizasyonlarına göre 3 farklı proteinle ilişki kurar. Bunlar kaveolin-1, kalmodulin ve hücre içi stres proteinleridir [172].

Kaveolin-1: Membranda bulunan NOS enzimi, hücre membranının kaveola adı verilen ve kolesterol ve lipitten zengin membran girintileri içinde bulunan kaveolin-1 adlı proteine bağlanır. eNOS enziminin bu proteine bağlanması enzimin inaktif hale geçmesine neden olur [172].

Kalmodulin (CaM): CaM hücrelerde yüksek miktarda bulunan küçük, asidik bir Ca^{+2} bağlayıcı proteindir [173]. Hücrede çeşitli proteinlere bağlanıp onları aktive ederek Ca^{+2} sinyalinin hücresel yanıtı çevrilmesini sağlar. Eritrositlerde CaM, Ca^{+2} pompası, hücre iskeleti proteinleri ve eNOS enzimi ile ilişkiye girer [174]. Hücre içine kalsiyum girişinin ardından kalsiyum bağlanmasıyla aktive olan CaM, membranda kaveolin-1 proteinine bağlı halde bulunan eNOS enzimine bağlanır ve enzimin membrandan sitoplazmaya geçerek aktifleşmesine olanak sağlar [172].

Stres proteinleri: Bütün hücreler çevresel değişimlere karşı koruma sağlayan ve genel olarak Hsp ya da stres proteinleri adı verilen bir seri protein içerir. Eritrositlerde Hsp'lerin bir grubunun bulunduğu gösterilmiştir. Olgun eritrositler yapısı bozulmuş olan proteinlerin yenileriyle değişmesini sağlayacak hücre içi mekanizmalara sahip olmadığından şaperonların proteinleri koruyucu ve sabitleştirici etkisi çok önemlidir [175]. eNOS enziminin sitoplazmaya geçmesinin ardından HSP proteinleri enzime bağlanır ve bu şekilde enzimin aktivitesi korunur [172].

Eritrosit NOS Kofaktörleri:

L-arjinin: Eritrositlerdeki NOS aktivitesi L-arjinin eklenmesiyle artmaktadır. L-arjinin, sığır eti ve ceviz gibi günlük besin öğelerini de içeren birçok farklı besinde bulunmakla birlikte hepatik üre siklusunda endojen olarak da üretilmektedir [176]. Eritrositlerde L-arjinin metabolizmasında görevli enzimler bulunmaktadır. Bunlardan biri, L-arjinini üre ve L-ornitine çeviren arjinaz-1 enzimidir. Diyabetik hastalarda arjinaz-1 ekspresyonunun artmasıyla NOS aracılı NO yapımının azaldığı gösterilmiştir [177-178]. Koroner arter hastalığı, pulmoner hipertansiyonu, periferel arteriyel tıkanıklık hastalığı olan bireylerde de diyetle L-arjinin eklenmesinin yararlı olduğu gösterilmiştir [178]. Ayrıca flavanoldan zengin kakao ile beslenmenin insan

eritrositlerindeki arjinaz-1 aktivitesini azaltarak NOS aktivitesinde artışa neden olduğu da bilinmektedir [179].

CAT1 transporter: CAT1, L-lizin, L-histidin, L-ornitin ve L-arjinin gibi katyonik aminoasitlerin hücreye taşınmasında rol alan ve hücrelerde oldukça fazla düzeyde eksprese edilen bir proteindir [180]. İnsanlarda bulunan CAT1, eritroid hücre kolonunda glikoforin-A pozitif nükleer hücrelerde 8 kat fazla bulunarak seçici bir ekspresyon paterni izler. CAT-1, L-arjininin hücre içine taşınmasını sağlayarak NO sentezinin düzenlenmesine katıldığı bilinmektedir [181].

Kalsiyum (Ca^{+2}): Eritrositlerde bulunan kalsiyumun büyük kısmı hücre membranında yer almaktadır [182]. Hücre içi Ca^{+2} düzeylerinin artışı hücrede bir dizi biyokimyasal ve morfolojik değişimlerin başlamasına neden olur [183]. Ca^{+2} konsantrasyonunun artışı membran protein paterninin değişmesine, hücreden su çıkışıyla ve hücre büzülmesiyle sonuçlanan potasyum çıkışının aktivasyonuna neden olur [184-185]. Eritrositlerde bulunan Ca^{+2} pompası hücre içi Ca^{+2} seviyelerini 0.634 $\mu\text{g/ml}$ düzeyinde tutmak için hücreye giren Ca^{+2} 'u uzaklaştırır [182]. Eritrositler yaşlandıkça hücre Ca^{+2} düzeylerinde artış gözlenir. Bu artışa paralel olarak hücre ATP içeriği ve CaM aktivitesi azalır. Bütün bunlar hücre membranının viskoelastik karakterini etkileyecek şekilde hücre iskeleti yapısında yeniden düzenlenmelere neden olabilir [186].

Asetilkolin (ACh): ACh reseptörleri (AChR) lenfositler ve eritrositler gibi kan hücrelerinin yüzeyinde bulunmaktadır. ACh ile inkübe edilen eritrositlerin deformabilitesi artarken agregasyon eğilimi de azalmaktadır. Bunun yanında, eritrositlerin ACh ile inkübasyonu hücre yüzeyinde bulunan muskarinik reseptörleri aracılığı ile NO metabolitleri olan nitrit ve nitrat konsantrasyonunu artırır. Endotel hücrelerinde bulunan ACh reseptörleri (AChR) eNOS enziminin çok belirgin bir aktivatörüdür. Bu reseptörler ligand kapılı katyon kanalları olup 4 farklı polipeptid subünitesinden oluşur. AChR'nin 2 ana sınıfı liganda cevabına göre muskarinik ve nikotinik reseptörler olarak 2'ye ayrılır. Eritrositler muskarinik reseptörlerin agonisti olan koline cevap verirler.

Eritrosit NOS Aktivitesinin Düzenlenmesi:

Enzim aktivitesinin serin 1177 bölgesinden fosforilasyon ve hücre içi kalsiyum düzeyleri tarafından belirlenmesi ve genel NOS inhibitörlerine duyarlı olmasıyla endotel kaynaklı eNOS enzimine benzerlikler taşıyan eritrosit kaynaklı NOS, bazı noktalarda da bu enzimden ayrılır [32]. Eritrositler çekirdek, endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi gibi hücre organelleri içermediğinden birçok NOS düzenleme mekanizmasına da sahip değildirler [187]. Bunun yanında eritrosit NOS enziminin aktivitesi endotel hücrelerinde olduğu gibi enzimin hücre içindeki lokalizasyonuna bağlıdır ve yine endotel hücrelerinde olduğu gibi döngüsel olarak işlemektedir. Bu mekanizmalar henüz teorik olsa da eritrosit NOS enziminin düzenlenme mekanizması şöyle işlemektedir: Eritrosit NOS enzimi sitoplazmada kaveolin-1 proteinine bağlı olarak inaktif halde bulunur ve buradan membrana veziküler transport yoluyla

taşıyarak membranda lipitten zengin bölgelere bağlanır. Kayma gerilimi sinyalleri ya da reseptör aracılı uyarım bir yandan enzimin serin 1177 bölgesinden fosforilasyonuna neden olurken bir yandan da hücreye Ca^{+2} girişine neden olur. Hücreye giren Ca^{+2} 'un kalmodulin ile bağlanmasıyla kalmodulin aktif hale geçer ve membranında bulunan NOS enzimine bağlanır. Bu bağlanma NOS enzimi ile kaveolin-1 proteini arasındaki bağı koparıp NOS'un aktifleşerek membrandan sitoplazmaya geçmesine neden olur. Sitoplazmada bulunan Hsp90 proteinleri aktif hale geçen NOS'a bağlanarak enzimin aktivitesini stabilize eder ve böylece NO oluşumunu artırır. Hücre içi konsantrasyonlarında meydana gelen düşüş ile birlikte ise NOS ile kalmodulin arasındaki bağ zayıflar ve NOS kaveolin-1 proteinine yeniden bağlanır. Böylece enzim tekrar inaktif duruma geçer. Bu mekanizmaların yanında enzimin serin 1177 bölgesinden fosforilasyonu ve hücre membranındaki asetilkolin reseptörünün aktive olması da enzim aktivasyonunu arttırmaktadır.

.Bugüne kadar yapılan çalışmalarda eritrositlerden eNOS enzim aktivitesine bağlı olarak NO çıkışının asetilkolin, insülin ve mekanik stres uygulamasıyla arttığı gösterilmiştir [32, 34, 36-38]. Mekanik strese cevaben eNOS aktivasyonundan ilerdeki sayfalarda daha ayrıntılı olarak bahsedilecektir.

2.4. Kan Damarlarına Etki Eden Hemodinamik Kuvvetler

Kan damarlarında etkili olan hemodinamik koşullar damar duvarına yakın bölgelerde çeşitli yüzeysel kuvvetlerin oluşmasına neden olur. Bu kuvvetler 2 ana kategoride incelenir: İlki, damarın içindeki nabız basıncı değişikliklerinden kaynaklanan sirkumferansiyal stres ve diğeri de kan akımından kaynaklanan ve damar duvarına paralel yönde etki eden kayma gerilimi'dir. Kan basıncından köken alan kuvvetler bütün damar duvarı tabakalarına (intima, medya ve adventisya) iletilirken kayma gerilimi yalnızca damar duvarının kan ile ilişki halinde olan en iç tabakası olan endotele iletilir. Kan damarlarının duvarına etki eden sirkumferansiyal kuvvetler damar çapını damar duvarının elastik özelliklerine ve gerilebilme yeteneğine bağlı olarak düzenlerken kayma gerilimi endotel hücrelerinden sentezlenip salınan moleküller aracılığı ile düzenler [188].

2.4.1. Duvar Kayma Gerilimi

Kayma gerilimi, laminar akım koşullarında sıvı tabakalarının birbirinin üzerinden kaymasını sağlayan kuvvet olarak tanımlanır. Silindirik borularda sıvı hareketini oluşturan bu kuvvet dyn/cm^2 olarak, yani birim alana uygulanan kuvvet biçiminde ifade edilir [188]. Dolaşım sisteminde, kan ve damar duvarı arasında yerleşmiş olan endotel hücreleri, kan akımından kaynaklanan kayma geriliminin etkisinde kalırlar [189-190]. Endotel hücrelerine

paralel yönde etki eden kuvvetler “duvar kayma gerilimi” olarak ifade edilebilirler.

2.4.2. Duvar Kayma Gerilimini Belirleyen Faktörler

Duvar kayma geriliminin büyüklüğü, damarın yarıçapı, damar duvarına komşu bölgedeki sıvının hareket hızı (duvar kayma hızı) ile damar duvarına temas eden sıvının viskozitesi tarafından belirlenir [190].

Sıvı akım hızı (Q), damar yarıçapı (r), sıvının viskozitesi (η) değişkenleri tarafından belirlenen duvar kayma gerilimi (δ) aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\delta = \frac{4 \cdot Q \cdot \eta}{\pi \cdot r^3} \quad (2)$$

Formülde de belirtildiği üzere, kayma gerilimi damarın yarıçapından önemli ölçüde etkilenir. Bu nedenle damar yarıçapında meydana gelen ufak bir değişim, kayma geriliminde büyük farklara neden olmaktadır. Bunun yanında kanın akışkanlık özellikleri de duvar kayma gerilimini belirleyen bir diğer önemli etkidir. Dolaşım sisteminde daha büyük lümen çapına ve daha yavaş kan akım hızına sahip venlerdeki duvar kayma gerilimi düzeyleri arterlere göre daha düşüktür. Ortalama kayma gerilimi büyük venlerde 1 Pa'dan daha az iken; küçük arteriyollerde bu değer 10-70 Pa arasında değişmektedir [191-192].

Ayrıca dolaşım sistemi boyunca kan damarlarının geometrisinde görülen değişiklikler aynı damarın farklı bölgelerinde duvar kayma geriliminin değişmesine neden olmaktadır [193-194]. Bu değişiklikler en çok damar eğimlerinin ve damar dallanmalarının görüldüğü bölgelerde göze çarpmaktadır. Damar eğimlerinin ve dallanmalarının olduğu bu bölgelerdeki duvar kayma gerilimi değerleri aynı damarın farklı bölgelerine göre daha düşüktür [192, 195].

Duvar kayma gerilimini etkileyen bir diğer faktör de kardiyak döngüdür. Kan akım hızı ve duvar kayma gerilimi sistolde yüksek iken diyastolde daha düşüktür. Ancak diyastol fazı, kardiyak döngünün 2/3'ünü oluşturması nedeniyle diyastol fazındaki duvar kayma gerilimi seviyesi, ortalama duvar kayma geriliminin büyük kısmını oluşturmaktadır. Sistol fazı boyunca nabız basıncındaki artışın yanı sıra duvar kayma geriliminde görülen artış da arter çapında meydana gelen artışa bağlı olarak sınırlandırılmaktadır. Bu etki özellikle elastik arterlerde görülmektedir [196].

Vücut içinde duvar kayma gerilimini tam olarak belirlemek oldukça zordur. Çünkü duvar kayma gerilimi hesabında yer alan değişkenler olan kanın akım hızı ve hız gradiyenti ile kanın viskozitesi için damar duvarına yakın bölgedeki değerler belirlenmelidir. Oysa bu değerler damarın kesit alanı boyunca değişmektedir. Bu nedenle arteryal duvar kayma gerilimi ölçümleri, %20-50 arasında hatalı olabilmektedir [197].

2.5. Duvar Kayma Geriliminin Eritrositlere Etkileri

Eritrositler memeli organizmasının mekanik kuvvetlerden en çok etkilenen, en çok şekil değiştirmeye zorlanan hücrelerindendir. Eritrositlerin en yüksek oranda mekanik etkilere maruz kalığı bölge mikrodolaşımdır. Mekanik kuvvetlerin eritrositlerde bir dizi hücre içi sinyal yolağını aktive ettiği ve hücre iskeletinde yeniden düzenlenmelere neden olduğu bilinmektedir [198].

Mekanik stres uygulaması eritrositlerde plazma membranının yapısında çeşitli değişikliklere neden olmaktadır. Fizyolojik düzeylerdeki kayma gerilimi eritrosit membranının monovalan katyonlara ve Ca^{+2} 'a olan geçirgenliğini artırır [5-6]. Kayma gerilimi aracılı iyon akımlarında membranın mekanik olarak hasarlanması ve mekanosensitif iyon kanallarının aktivasyonu en önemli rolü oynar. Kayma geriliminin bir analogu olan hücre hacminin artırılması yönteminin insan eritrositlerinde mekanosensitif Ca^{+2} 'a geçirgen katyon kanallarının açılmasına neden olduğu gösterilmiştir [199]. Buna zıt olarak hücre hacminin azaltılması ile hücrenin büzülmesi ise non selektif katyon kanalları aracılığıyla hücreye Ca^{+2} girişine neden olmakta ve bu kanallar hücre hacminin artışıyla inhibe olmaktadır [200]. Bütün bunların yanı sıra eritrositlerde gerimle aktive olan inward rektifying katyon kanalları da bulunmaktadır [201].

Mekanik kuvvetlerin etkisi altında eritrosit membranının gerek monovalan katyonlara gerekse Ca^{+2} 'a geçirgenliğinin artması bu hücrelerin başlıca mekanik özelliklerini etkileyebileceği bildirilmiştir. Örneğin, hücre içi kalsiyum konsantrasyon artışı membran iskeleti içindeki protein ilişkilerini değiştirerek membran rijiditesini arttırmaktadır. Mekanik stres altında artan potasyum geçirgenliğinin de eritrosit deformabilitesi değişikliklerinden sorumlu olabileceği gözlenmiştir [202].

Endotel hücrelerinde birçok sinyal yolağı mekanik kuvvetlerin etkisiyle aktive olmaktadır [203]. Endotel hücrelerinde kayma gerilimine cevaben aktive olan sinyal yollarında integrinlerin [204] ve heterotrimerik G proteinlerinin [205] rol aldığı gösterilmiştir. Eritrositlerde ise heterotrimerik G proteinlerinin G_i subtipi, adenilat siklaz, protein kinaz A ve sistik fibrosis transmembran kondüktans düzenleyicisi mekanik kuvvetlere cevaben aktive olan sinyal yollarının bileşenleridir [140]. Bu sinyal yollarının aktivasyonu sonucunda eritrositlerden ATP salınımı gerçekleşmektedir [13]. Bunun yanında mekanik kuvvetlerin etkisiyle eritrositlerdeki NOS enziminin aktive olduğu ve bu aktivasyonda enzimin serin 1177 bölgesinden

fosforilasyonunun da rol aldığı gösterilmiştir. Bu konu aşağıda daha ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

2.5.1. Duvar Kayma Gerilimi ve NO Salınımı

Endotel Hücrelerinden NO Salınımı:

Duvar kayma gerilimi değişikliklerinin NO bağımlı mekanizmaları etkilediği çok iyi bilinmektedir [206-211]. NO, dolaşımın kontrolünde anahtar bir rol oynar [212-213]. Vasküler düz kas tonusunun ve akım direncinin düzenlenmesinde NO'nun önemi iyi bilinmektedir [213-215]. Hipoksi ve kayma gerilimi gibi çeşitli faktörler eNOS aracılı NO sentezini etkiler [88, 216-219]. Bu faktörler sadece mevcut enzimin aktivitesini değil endotel hücrelerinde eNOS proteinin ekspresyonunu da etkiler [88, 220]. Endotel hücreleri üzerinde etkili mekanik faktörler hücrelerdeki NO üretiminin ana belirleyicisi olarak bilinir [88, 220]. Duvar kayma geriliminin azalması NO üretimini azaltır ve düz kas tonusunun artmasına neden olur [221]. Bununla ilgili olarak, 'akım aracılı gevşeme' terimi literatürde iyi tanımlanmış bir mekanizmayı işaret eder. Bu mekanizma damar duvarına etki eden kayma gerilimi artışına cevaben damar gevşemesine neden olan endotel aracılı bir süreçtir. Bu süreçte akıma verilen gevşeme yanıtı sağlam bir endotel tabakasının varlığına bağlıdır. Çünkü endotel hücreleri kan akımından kaynaklanan kayma gerilimini algılayan sensörlerdir ve bu uyarıya cevaben salgıladıkları vazodilatör maddelerle damar düz kasında gevşemeye neden olurlar. Endotel hücrelerinden salgılanan bu vazodilatör maddeler arasında prostaglandinler, ATP, EDHF ve en önemli olarak da NO yer alır.

Endotel hücresinden NO üretimini belirlemede akım hızının rolünü teyit eden çok sayıda deneysel çalışma yayınlanmıştır [221-224]. Varin ve arkadaşlarının çalışmasında, sol koroner arter ligasyonu ile sıçanlarda kronik kalp yetmezliği oluşturulmuş ve bu hayvanlarda grasilis kası arterlerinde NO tarafından aracılık ettiği bilinen akım aracılı gevşeme yanıtlarının baskılandığı gösterilmiştir [221]. Aynı kas örneklerinde NOS ekspresyonun da azaldığı saptanmıştır [221]. İlginç olarak hem akım aracılı gevşeme hem de NOS'daki azalma kardiyak debi ve iskelet kas damarlarına kan akımını arttıran yüzme egzersizi ile önlenebilmektedir [221]. Miyauchi ve arkadaşları endotelial NO aktivitesi üzerine sıvı kuvvetlerinin etkilerini gösteren sonuçlara ulaşmışlardır [224]. Çalışmalarında, sıçanlarda 45 dakika ağır egzersiz sonrası akciğer ve böbreklerde NOS aktivitesini araştırmışlardır. Egzersiz sırasında akciğerlerde kan akımı artışı gerçekleşirken, böbreklerde tam tersi olur. Egzersiz yapmayan sıçanlarla karşılaştırıldığında, egzersiz yapan sıçanların akciğerlerinde total NOS aktivitesinin arttığı, böbreklerde ise aktivitenin azaldığı saptanmıştır [224]. Yukarıda bahsedilen iki çalışmada kan akımındaki değişikliklere bağlı olarak duvar kayma geriliminin değişmesi

durumunda NO sentezleyen mekanizmaların etkilendiği açık bir şekilde gösterilmiştir [221, 224].

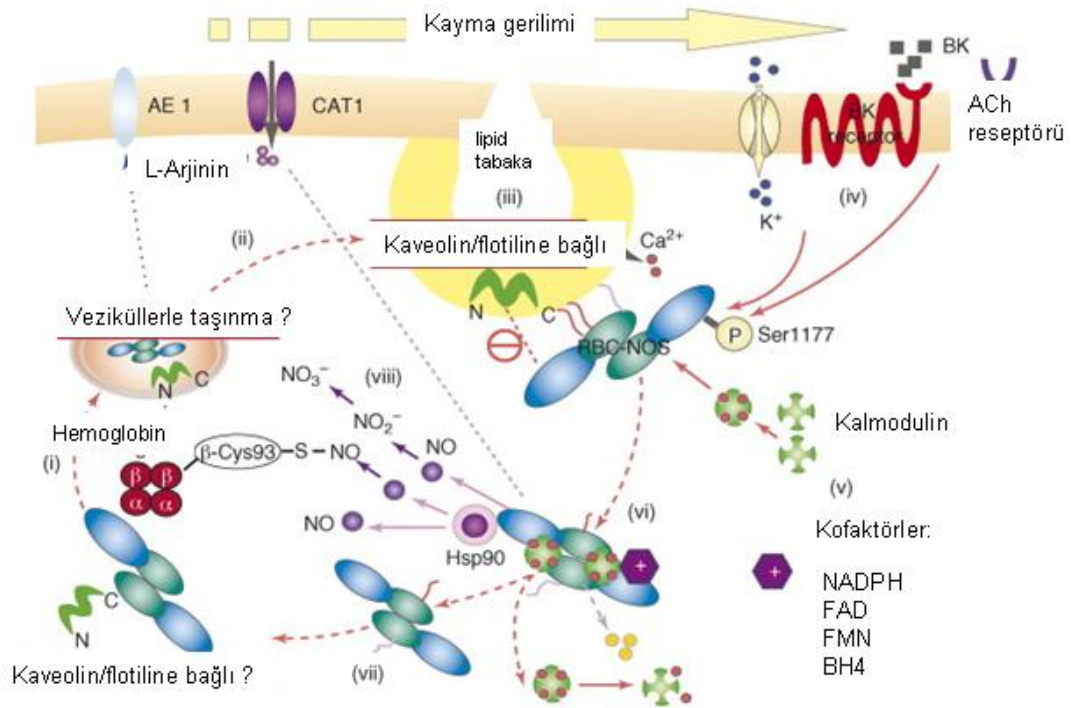
Eritrositlerden NO Salınımı

Endotel hücrelerindeki NOS enzimi gibi eritrositlerde bulunan NOS enziminin de mekanik kuvvetlerin etkisiyle aktive olabileceği hipoteze edilmiştir (Şekil 2.5.) [3, 172]. Bu konudaki ilk deneysel çalışma 2007 yılında Fischer ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada eritrositlerin kardiyopulmoner bypass (CBP) cerrahisinde ekstrakorporeal dolaşımından geçişleri sırasında karşılaştıkları mekanik kuvvetlerin bu hücrelerdeki eNOS enzimini aktive ettiği gösterilmiş ve bu aktivasyon CBP cerrahisi sırasında görülen hipotansiyonun nedeni olarak sunulmuştur [35]. Araştırmacılar eritrositlerdeki eNOS enzim aktivitesinin ekstrakorporeal dolaşıma maruz kalma süresiyle ilişkili olarak arttığını gözlemişlerdir. Ancak bu çalışmada eritrositlerin maruz kaldığı mekanik kuvvetlerin düzeyini tahmin etmek güçtür.

Başkurt ve arkadaşları tarafından yapılan bir dizi deneysel çalışmada ise eritrositlerdeki eNOS enziminin dolaşım sisteminde gözlenen mekanik stres düzeylerinde de aktive olacağı hipotezi üç farklı deney düzeneğinde test edilmiştir. Bu düzeneklerde eritrositler mikrodolaşımda ve büyük damarlarda gözlenen mekanik kuvvetleri taklit edecek şekilde birbirinden farklı özellikte ve büyüklükteki mekanik stres uygulamalarına tabi tutulmuştur [36-38]. İlk çalışmada eritrosit süspansiyonları 10 cmH₂O basınç farkı altında 5 µm çapında ve 11 µm uzunluğundaki silindirik porlara sahip filtrelerden geçirilmiştir [38]. Belirtilen koşullarda mekanik stres uygulaması eritrositlerden NO çıkışının artmasına neden olmaktadır. Bu çıkışın non-spesifik NOS inhibitörü olan L-NAME ile inhibe edilmesi ve süspansiyon ortamına kalsiyum eklenmesiyle arttırması, NO oluşumunda NOS enzim aktivasyonunun ve hücre içi kalsiyumun önemini vurgulamıştır. İkinci çalışmada ise eritrosit süspansiyonları 0.12 cm çapa ve 33 cm boya sahip bir kapiller borudan 30 dakika boyunca pompalanarak hücrelere 2 Pa düzeyinde kayma gerilimi uygulanmıştır [37]. Bu şekilde mikrodolaşım koşullarında gözlenen mekanik kuvvet düzeyleri modellenmiştir. Eritrositlerin bu şartlarda kayma kuvvetlerine maruz kalması hücrelerden özellikle hipoksik koşullarda NO çıkışına neden olmuştur. Hücrelerden mekanik stres uygulamasına cevaben NO çıkışının gerçekleştiği süspansiyon ortamında NO ve nitrit nitrat konsantrasyonlarının tayini ile gösterilmiştir. Ayrıca bu çıkışın eNOS enzim aktivasyonuna bağlı olduğu immunohistokimya metodlarıyla kanıtlanmıştır [37-38]. Son çalışmada ise bir lam üzerine yapıştırılmış eritrositler üzerinden fizyolojik tuz solüsyonu (PBS) akımı yapılarak hücrelere 0.1 Pa düzeyinde kayma kuvveti uygulanmıştır. Bu sırada hücre içi NO ve Ca⁺² seviyeleri ölçülmüştür. Buna göre eritrositlere uygulanan kayma gerilimi hücrelerde NO ve Ca⁺² artışına neden olmaktadır. Bu çalışmalar eritrositlerde NO sentezine neden olan enzimatik mekanizmaların bulunduğunu doğrulamakta ve bu

mekanizmaların hücreye uygulanan kayma kuvvetleriyle aktifleştğini göstermektedir.

Eritrositler tarafından eNOS enzim aktivitesiyle oluşturulup plazmaya salınan NO'nun damar düz kasına ulaşp burada vazodilatasyona neden olup olamayacağı ise çeşitli matematiksel modellerle araştırılmıştır. Chen ve arkadaşları 2009 yılında yayınladıkları çalışmalarında, hemorajik şok gelişen bireylerde dolaşımda NO seviyelerinin azaldığı bilgisinden yola çıkarak "eritrosit kaynaklı eNOS vasküler tonüsün korunmasında önemli ise kanama sırasında kaybedilen eritrositler sadece dokulara oksijen taşıma kapasitesinin düşmesinden değil aynı zamanda vasküler tonüsün bozulmasından da sorumludur" görüşünü ortaya atmışlardır. Bu hipotezi test etmek için uyguladıkları ve eritrositlerden NO yapımını ve damarın enine kesiti boyunca difüzyonunu taklit eden matematiksel modelde özellikle şiddetli kanamada hematokritin % 30'un altına düşmesiyle düz kas hücrelerine ulaşacak NO miktarının önemli düzeyde düşeceğini savunmuşlardır [39]. Ancak bu modelleri deneysel olarak kanıtlayan bir çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 2.5. Eritrosit nitrik oksit sentaz aktivitesinin mekanik stres ile kontrolüne ilişkin hipotez [172].

2.6. Hipotez ve Amaç

Eritrositlerin damar düz kas tonüsünün belirlenmesinde rol oynadığını gösteren çalışmalar son on yıl içinde hız kazanmış ve kan akımının lokal olarak düzenlenmesine yeni bir bakış açısı getirmiştir [16, 160, 225]. Eritrositlerin bu işlevine aracılık eden mekanizmalar eritrositlerden ATP ve NO salınımıyla ilişkilidir [17, 31]. Eritrositlerin S-nitrosohemoglobinin oluşturarak ve nitrit redüktaz aktivitesi göstererek plazmaya NO salınımı gerçekleştirdiği bilinmektedir [24, 226]. Öte yandan eritrositlerde aktif bir NOS enziminin gösterilmesi, eritrositlerin enzimatik yolla oluşan NO için de bir kaynak oluşturabileceğini göstermiştir [32]. Eritrositlerde bulunan NOS enzimi, dolaşım sisteminde gözlenen fizyolojik düzeylerdeki mekanik kuvvetlerin etkisiyle aktifleşmekte ve hücrelerden NO çıkışı gerçekleşmektedir [37-38]. Ancak, mekanik kuvvetlerin etkisi altında eritrositlerde NO yapımının arttığı gösterilmiş olsa da bu hücreler tarafından yapılıp salınan NO'nun düz kasta gevşeme yanıtına neden olup olamayacağı bilinmemektedir.

Bu çalışma, eritrositlerde bulunan ve mekanik kuvvetlerin etkisi altında aktif hale geçen NOS enzimi tarafından üretilen NO'nun damar tonüsünün belirlenmesinde fizyolojik bir önemi olup olmadığını saptamak amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla, mekanik strese maruz bırakılmış eritrosit süspansiyonları, endotel hücreleri sıyrılmış ve organ banyosuna asılmış küçük mezenterik arterlerden perfüze edilmiş ve bu sırada damar çapında meydana gelen değişimler incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ve Histoloji Anabilim Dallarında ve Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilen bu çalışmada 12-14 haftalık dişi Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesinden temin edilen ve ağırlıkları 260–290 g arasında değişen sıçanlar, sıcaklığı $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ olan ve 12 saat gün ışığı - 12 saat karanlık periyodu uygulanan bir odada tutulmuş ve kısıtlamaksızın (ad libitum) ticari sıçan yemi ve su erişimleri sağlanmıştır. Bütün deney prosedürü sıçanlardan kan ve doku örnekleri alındıktan sonraki 6 saat içinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması

Tiyopental anestezisi (80mg/kg, ip) altında sıçanların abdomenleri açılmış ve abdominal aortadan ethylenediaminetetraasetic acid (EDTA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, ABD 1,5 mg/ml) içeren enjektörler ile kan alınarak sıçanlar kansızlaştırma yöntemi ile feda edilmiştir. Kan alma işleminin hemen ardından mezenter yatak mide ve çekum ile birleşen kısımlarından bağlanarak izole edilmiştir. İzole edilen mezenter yatak 4°C 'de Krebs solüsyonu (NaCl 119 mM, KCl 4.7 mM, NaHCO_3 24, KH_2PO_4 1.18 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.17 mM, CaCl_2 2.5 mM ve glukoz 11.2 mM) içeren bir petri kabına alınarak laboratuvar ortamına taşınmıştır.

3.2. Kan Örneklerinin Hazırlanması ve Gruplandırma

Sıçanların abdominal aortalarından toplanan kan örnekleri içinde bulunan lökositler dansite gradiyenti yöntemiyle uzaklaştırılmıştır. Bunun için, 8 ml kan örneği 50 ml'lik polipropilen tüpe alınmış ve üzerine 16 ml polisükröz (60 g/l) ve sodium ditriazot (167 g/l) solüsyonu (Histopaque1119; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) eklenerek 700g'de 30 dakika boyunca santrifüj

edilmiştir. Santrifüjün ardından dipte çökmüş halde bulunan eritrosit paketinin üzerinde kalan bölüm aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra eritrosit paketi 3 defa Krebs solüsyonunda yıkanmış ve yine aynı solüsyon içinde resuspanse edilerek hematokriti 0.1 l/l.'ye ayarlanmıştır. Son olarak eritrosit süspansiyonunun içine 1mM konsantrasyonda L-Arjinin (L-arjinin; A5131, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) eklenmiş ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.

Bu aşamadan sonra eritrosit süspansiyonları özelliklerine göre 3 gruba ayrılmıştır. Eritrosit süspansiyonların özellikleri aşağıdaki gibidir:

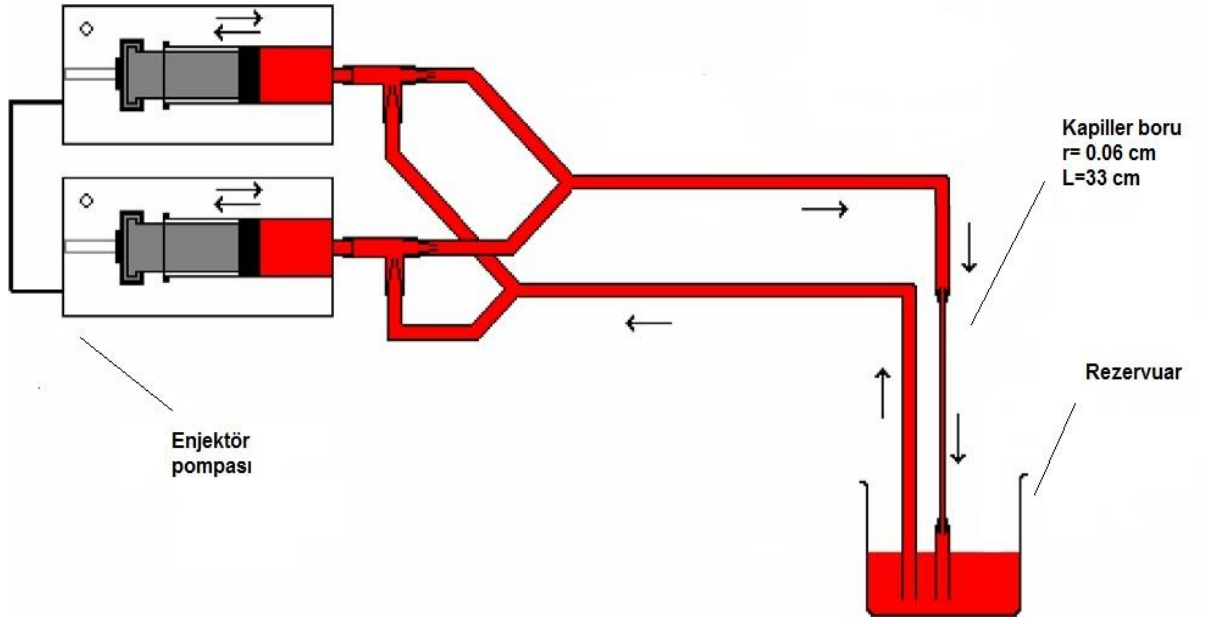
- a) Kontrol: Mekanik strese uğramayan eritrosit süspansiyonları
- b) Mekanik Stres (MS): 2 Pa düzeyinde mekanik strese uğrayan eritrosit süspansiyonları
- c) Mekanik Stres + L-NAME (MS+ L): Mekanik stres uygulamasının öncesinde L-NAME (L-NAME; N-5751, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) ile muamele edilen eritrosit süspansiyonları

3.3. Mekanik Stres Uygulaması

Eritrosit süspansiyonları özel olarak tasarlanmış bir akım sisteminde 20 dakika boyunca 2 Pa büyüklüğünde mekanik kuvvetlere maruz bırakılmıştır. Bu akım sistemi, iç çapı 0.12 cm ve uzunluğu 33 cm olan cam kapiller bir borudan ve senkronize çalışan bir çift enjektör pompasından (Model NE1000,dual pump system; New Era Pump Systems Inc., Wantagh, NY, USA) oluşmaktadır (Şekil 3.1). Birbirine zıt yönde çalışan pompalar enjektörlerden birinin kapiller boruyu besleyecek şekilde itilmesini, diğerinin ise otomatik olarak doldurulmasını sağlayarak kapiller boru içinde sürekli akım oluşturmaktadır. Eritrositlerin kapiller borudan geçerken karşılaşacakları mekanik kuvvetlerin büyüklüğü aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\delta = \frac{4 \cdot Q \cdot \eta}{\pi \cdot r^3} \quad (1)$$

Bu formülde δ , duvar kayma kuvveti (2 Paskal); r, cam kapiller borunun yarıçapı; η , eritrosit süspansiyonlarının viskozitesi ve Q ise süspansiyonun akım hızını ifade etmektedir. Akım hızı, duvar kayma kuvveti 2 Paskal olacak şekilde hesaplanarak uygulanmıştır.



Şekil 3.1 Mekanik stres düzeneği. Bu düzeneğe birbirine zıt yönde çalışan bir çift enjektör pompası ve eritrositlerin mekanik strese maruz kaldığı cam bir kapiller borudan oluşmaktadır.

3.4. Damar Segmentlerinin İzolasyonu ve Basınç Miyografına Asılması

Laboratuvar ortamına 4 °C'de Krebs solüsyonu içinde taşınan mezenter yatak yine 4 °C'de Krebs solüsyonu içeren cam diseksiyon petrisine alınmış ve toplu iğne yardımıyla petrinin silikondan oluşan zeminine sabitlenmiştir. Daha sonra diseksiyon mikroskobu (SZ61, OLYMPUS; Tokyo, Japan) altında mezenter arterin 3. dalı (dış çapı 260 ile 356 µm arasında değişen) mikro-diseksiyon cerrahi malzemeleri yardımıyla etrafındaki bağ dokudan sıyrılmıştır. Bağ dokudan temizlenen damar segmentinin dal içermeyen kısmı mezenter yataktan çıkarılarak Krebs solüsyonu ile dolu olan başka bir cam petriye alınmış ve endotel tabakası sıyrılmıştır. Bu işlem damar segmentinin içinden 40 mikrometre çapa sahip bir tungsten telin boydan boya 3 defa dikkatli bir şekilde geçirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasında damar segmentinin düz kas tabakasına zarar vermemeye özen gösterilmiştir.

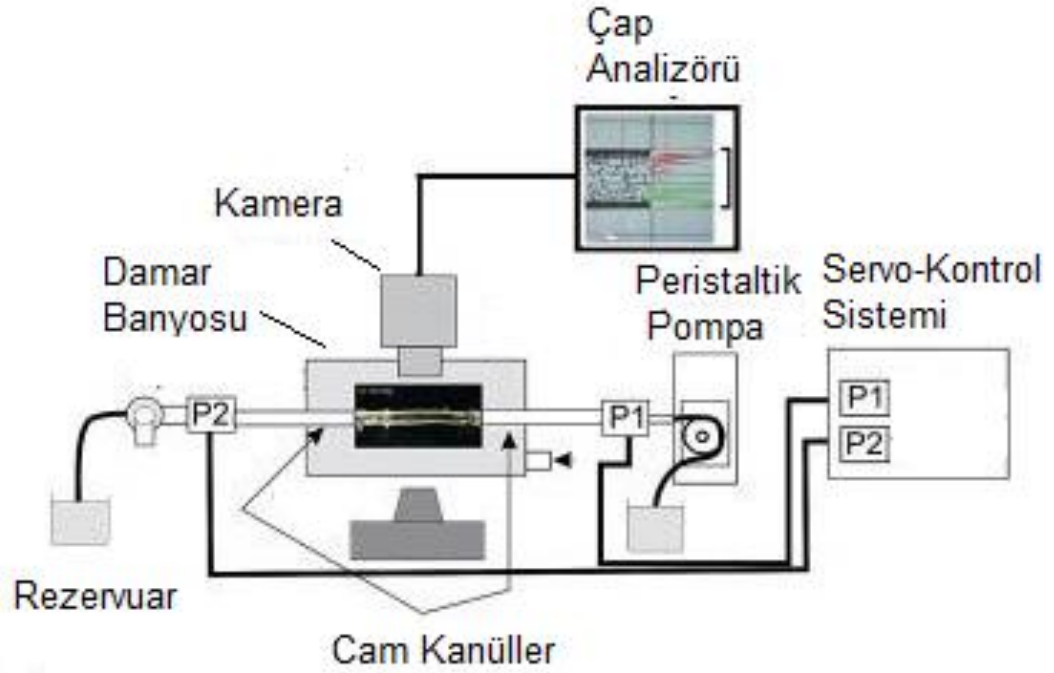
Damar segmentlerinin perfüzyonu Şekil 3.2.'de şematize edilen basınç miyografi düzeneğinde gerçekleştirilmiştir. Bu sistemde, damar segmenti iki ucundan cam kanüllere bağlanmakta ve damarın hem agonist aracılı hem de akım aracılı yanıtları incelenebilmektedir. Ayrıca bu sistemde dışarıdan verilecek ajanların intraluminal veya ekstraluminal olarak uygulanabilmesi mümkündür. Basınç miyografi sistemi içerdiği servo-kontrollü basınç ünitesi sayesinde akımı ve basıncı birbirinden bağımsız olarak ayarlayarak damarın

içinden istenilen akım ve basınç koşullarında akım gerçekleştirilmesine olanak sağlar. Bu sistemde damar duvarına uygulanacak gerim, damar içi basıncın istenilen düzeye yükseltilmesiyle sağlanır. Damar duvarı üzerine bu şekilde eşit dağılım gösteren bir basıncın uygulanabilmesi, damarın silindirik şeklinin korunmasına ve spontan tonus geliştirmesine de olanak sağlamaktadır.

Farklı akım hızlarında damar segmentlerinin intralüminal basınçlarını sabit tutmak üzere tasarlanmış olan basınç miyografi düzeneği, iki ayrı döner pompa, damarın giriş ve çıkışındaki basınçları ölçmeye yarayan iki adet basınç transdüseri ve servo kontrol ünitesinden oluşmaktadır (PS/200/Q, Living Systems Burlington, VT; Şekil 5). Pompalardan biri ayarlanabilen sabit bir hızla damar içine doğru akım sağlarken, diğeri damar içindeki basıncı sabit tutmak üzere servo kontrol ünitesi tarafından belirlenen hızlarda ve yönlerde akım sağlayabilmekte ve böylece akım hızını ve perfüzyon basıncını birbirinden bağımsız olarak ayarlayabilmektedir

Endotel tabakası yukarıda bahsedildiği şekilde sıyrılan damar segmenti içinde Krebs Solüsyonu bulunan damar banyosuna alınmış ve diseksiyon mikroskobu altında çapı 120-150 µm olan cam kanüllere 11-0 naylon sutureler kullanılarak her iki ucundan bağlanmıştır. Daha sonra damar banyosu damar segmentinin dış çapını monitorize etmek üzere video analiz sistemi (Model V94, Living Systems Instrumentation, Burlington, VT) içeren bir kamera (XC73CE, Sony, Japan) ile ilişkili inverted mikroskop (Eclipse TS100, Nikon, Japan) üzerine yerleştirilmiştir. Ardından damar banyosunun giriş ve çıkışındaki sıvı basıncını ölçmek ve banyo içindeki solüsyonun sıcaklığını 37°C' de sabit tutmak üzere sırasıyla basınç transdüserleri ve banyo ısıtıcısı ile gerekli bağlantılar sağlanmıştır.

Son olarak, damar banyosuna asılan damar segmentinin akım sırasında sıvı kaçağına neden olabilecek şekilde dallanma bölgeleri içerip içermediği test edilmiştir. Bunun için servo-kontrollü perfüzyon sistemi açılarak damar segmentinin Krebs Solüsyonu ile doldurulmasıyla farklı intralüminal basınç değerleri (40, 80, 120 mmHg) oluşturulmuş ve her bir değerde servo-kontrolün devreden çıkartılmasından sonra intralüminal basınçta meydana gelen değişimler izlenmiştir. Servo kontrolün devreden çıkartılmasıyla intralüminal basıncın düşmesi damarda kaçak olduğunu gösterirken intralüminal basıncın sabit kalması damarda kaçığa neden olacak dallanma bölgeleri olmadığını göstermiştir. Dallanma bölgeleri içermediği gösterilen damar segmentinin intralüminal basıncı 40 mmHg'ya ayarlanmış ve servo-kontrollü perfüzyon sistemi tarafından deney boyunca 40 mmHg'da sabit tutulmuştur.



Şekil 3.2 Basınç Miyografi. RP1: Sistem basıncın 40 mmHg'da sabit kalmasını sağlayan servo-kontrollü pompa. RP2: Kanın rezervuardan kapiller boru içine perfüzyonunu sağlayan sabit akım pompası. S. P1, P2: Basınç transducerleri

3.5. Deney Protokolü

Damar segmentini içeren damar banyosunun yukarıda bahsedildiği şekilde basınç miyografi düzeneği ile bağlantısı sağlandıktan sonra sırasıyla aşağıdaki protokol izlenmiştir:

1) Dinlenme periyodu: Damar segmenti içi Krebs Solüsyonu ile dolu iken 40 mmHg intraluminal basınç ve 37°C banyo sıcaklığı koşullarında 45 dakikalık dinlenme periyoduna bırakılmıştır. Dinlenme periyodu süresince damar içinden sıvı akışı olmamıştır. Dinlenme periyodu sırasında 15 dakikalık aralıklarla damar banyosu içindeki Krebs Solüsyonu dışarıda bulunan bir rezervuarda % 95 O₂ %5 CO₂ içeren karışımla gazlanmakta olan yenisi ile değiştirilmiştir. Dinlenme periyodunun 30. dakikasında damar segmentinin 80 mM KCl uygulamasına cevaben geliştirdikleri kasılma yanıtları incelenerek damar düz kasının sağlamlığı doğrulanmıştır. Daha sonra endotel sağlamlık testi gerçekleştirilerek deney alınacak olan damarların endotel tabakasının sıyrılmış olduğu gösterilmiştir. Bunun için 10⁻⁶ M fenilefrin (Phe) ile kastırılan damar segmenti 10⁻⁶ M asetilkolin (ACh) ile muamele edilmiş ve damarın gevşeme yanıtı izlenmiştir. ACh'e gevşeme

yanıtı vermeyen damar segmentleri endotelsiz olarak kabul edilerek çalışmaya dahil edilmiştir.

2) İnkübasyon Periyodu: Çalışmaya alınan damar segmentleri, mekanik kuvvetlerin etkisiyle eritrositlerden salındığı bilinen ATP'nin [13] damar düz kas hücrelerinde bulunan purinerjik P2X reseptörleri üzerinden neden olabileceği vazokonstriksiyonu [18, 227] önlemek amacıyla, bir non selektif purinerjik P2 reseptör antagonisti olan pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2,4-disulfonic acid (PPADS) ile 10^{-3} M konsantrasyonda 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir [228]. Bu aşamadan sonraki tüm deney protokolleri PPADS içeren Krebs Solüsyonu varlığında gerçekleştirilmiştir.

3) Damar Segmentlerinin Perfüzyonu: İnkübasyon döneminin sonunda perfüzyon aşamasına geçmeden önce bütün damarlar, çapları maksimal çaplarının % 60-65'i olacak şekilde Phe (10^{-6} - 10^{-5} M) ile kasılmıştır. Damar çapının stabilize olmasının ardından perfüzyon aşamalarına geçilmiştir. Damar segmentlerinin perfüzyonu aşağıda belirtildiği gibi üç farklı özellikteki eritrosit süspansiyonu ile önce yüksek pO_2 ve ardından düşük pO_2 koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Farklı özellikteki eritrosit süspansiyonlarının perfüzyonları arasında damar segmentleri 10 dakikalık dinlenme periyoduna bırakılmıştır. Her perfüzyon periyodunun başlangıcında ve ortasında (yüksek pO_2 koşullarından düşük pO_2 koşullarına geçerken) damar çapları standardize edilmiştir. Bunun için, eğer bir önceki perfüzyon süresince damar çapında artış gözlenmiş ise damar tekrar Phe ile kasılmış ve başlangıç çapının % 60-65'ine ulaşması sağlanmıştır. Tüm perfüzyon protokolleri 40 mmHg basınç altında, 20 μ l/dakika hızında ve 37 $^{\circ}$ C'de gerçekleştirilmiş olup damar çapındaki damar dış çap ölçümlerinin alınmasıyla izlenmiştir.

a- Kontrol Grubuna Ait Eritrosit Süspansiyonlarının Perfüzyonu: Dinlenme ve PPADS ile inkübasyon periyodunun ardından, basınç miyografi düzeneğinde damar segmentinin girişine kadar olan boru sistemi kontrol grubuna ait eritrosit süspansiyonları ile doldurulmuş ve akıma başlanmıştır. Akıma cevaben oluşan damar çapı değişimleri önce yüksek pO_2 ardından düşük pO_2 koşullarında 5'er dakika boyunca kaydedilmiştir.

b- M.S. Grubuna Ait Eritrosit Süspansiyonlarının Perfüzyonu: Kontrol grubuna ait eritrosit süspansiyonlarının perfüzyonu bittikten sonra mekanik stres grubuna ait eritrosit süspansiyonlarının perfüzyonuna başlanmıştır. Bunun için öncelikle basınç miyografi düzeneğinde damar segmentinin girişine kadar olan boru sistemi Mekanik Stres grubuna ait eritrosit süspansiyonu ile doldurulmuştur. Ardından peristaltik pompa açılarak eritrositlerin damar içine akışı sağlanmıştır. Perfüzyona başlanmasının ardından önce yüksek daha sonra düşük pO_2 koşulları altında 5'er dakikalık sürelerle perfüzyonun damar çapında meydana getirdiği değişimler kaydedilmiştir.

- c- M.S+L-NAME Grubuna Ait Eritrosit Süspansiyonlarının Perfüzyonu: Mekanik stres grubuna ait eritrosit süspansiyonlarının perfüzyonunun ardından M.S+L-NAME grubuna ait süspansiyonların perfüzyonuna geçilmiş ve damar çapı değişimleri sırasıyla yüksek ve hipoksik düşük pO_2 koşulları altında, yukarıda bahsedilen şekilde izlenmiştir.
- d- Pasif Çapın Belirlenmesi: Yukarıda belirtilen tüm protokollerin sonlanmasının ardından maksimal pasif çapın (D_p) belirlemesi amacıyla pasif çap ölçülmüştür. Bu amaçla damar banyosunda bulunan Krebs Solüsyonu kalsiyum içermeyen Krebs Solüsyonu ile değiştirilmiş ve 30 dakikalık inkübasyon periyodunun sonunda damar dış çaplarının ölçümüyle pasif çap belirlenmiştir.

Yüksek ve Düşük pO_2 Koşullarının Oluşturulması

Farklı özellikteki eritrosit süspansiyonlarının perfüzyonuna cevaben oluşan damar çapı değişimleri yüksek ve düşük pO_2 koşullarda değerlendirilmiştir. Yüksek pO_2 koşulları damar banyosunun oda havasıyla eşitlenmesi ile sağlanmıştır. Düşük pO_2 koşulların oluşturulması için damar banyosu sıvısı, eksternal bir rezervuarda % 100 nitrojen ile 20 dakika boyunca gazlanarak pO_2 seviyesi düşürülen Krebs Solüsyonu ile değiştirilmiş ve ardından damar banyosunun üzeri kapatılarak % 100 nitrojen ile gazlanmaya devam edilmiştir. Damar banyosu ortamında yüksek ve düşük pO_2 koşullarının oluşturulduğunu göstermek üzere banyo sıvısından alınan örneklerde pO_2 ölçümleri bir kan gazı analizörü (Stat Profile® Critical Care Xpress, Nova Biomedical, USA) kullanılarak yapılmıştır. Buna göre banyo sıvısının pO_2 değeri yüksek pO_2 koşullarında ~130 mmHg, düşük pO_2 koşullarında ise ~33 mmHg olarak saptanmıştır.

Ayrıca yüksek ve düşük pO_2 içeren koşullarda damar segmentinden perfüze edilen eritrosit süspansiyonları perfüzyon öncesinde ve sonrasında ayrı ayrı toplanarak bu örneklerde de aynı yöntemle pO_2 düzeyleri ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda perfüzyon öncesinde alınan örneklerde PO_2 düzeyi ~159 mmHg.olarak ölçülmüştür. Yüksek pO_2 koşullarındaki perfüzyon sonrasında damar çıkışından toplanan eritrosit süspansiyonlarının PO_2 düzeyi 138 ± 15.6 mmHg; düşük pO_2 koşullarında perfüze edilen eritrosit süspansiyonları için bu düzey 48 ± 7.1 mmHg olarak bulunmuştur.

Nitrat/ Nitrit Ölçümü

Nitrat/nitrit konsantrasyonu, eritrosit süspansiyonlarının süpernatantlarında ticari kit (780001; Cayman Chemicals Co., Michigan, ABD) kullanılarak spektrofotometrik bir yöntem olan Griess metoduna göre tayin edilmiştir [229]. Bu yöntemde ilk basamak, nitratın, nitrat redüktaz enzimi aracılığıyla nitrite dönüştürülmesidir. İkinci basamak ise, Griess reaktiflerinin eklenmesiyle nitritin koyu mor azo bileşiklerine çevrilmesidir. Sonuçta elde edilen değerler, total nitrat / nitrit konsantrasyonunu vermektedir.

Her bir grup eritrosit süspansiyonundan yaklaşık 300 mikrolitre örnek alınmış olup mekanik strese uğrayan eritrosit süspansiyonlarından örnek alımı mekanik stres uygulaması biter bitmez yapılmıştır. Bu örnekler +4 °C'de, 2700 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilerek süspansiyonların hücresel kısmı ile süpernatantları ayrılmıştır. Süpernatantlar daha sonra 10 kda'luk özel filtreli endorf tüplere konulmuş ve +4 °C, 100.000 g'de 20 dak boyunca santrifüj edilerek süpernatanttaki proteinlerin izole edilip uzaklaştırılması sağlanmıştır. Santrifüj sonrası 36 kuyucuklu özel petri kabının her bir kuyucuğuna proteinden saflaştırılmış 80 µl örnek konmuştur. Örneğin üzerine 10 µl enzim kofaktörü karışımı ve 10 µl nitrat redüktaz karışımı eklenmiş ve 3 saat boyunca oda ısısında inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 50 µl Griess R1 reaktifi ve aynı miktarda R2 reaktifi eklendikten sonra 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda örnekleri içeren petri kabı spektrofotometreye yerleştirilmiş ve 540 nm dalga boyunda örneklerin absorbansları kaydedilmiştir. Absorbans değerleri nitrat standart eğrisinde yerine konarak nM cinsinden total nitrit + nitrat miktarları hesaplanmıştır.

Fosforile NOS Tayini

Her bir grup eritrosit süspansiyonundan 100 mikrolitre örnek alınarak daha önceden poli-L-lizin ile kaplanmış cam lamaların üzerine eritrosit yayması yapılmıştır. Hücrelerin lam yüzeyine çökmeleri ve bu yüzeye tutunmaları için 30 dakika oda ısısında beklenmiştir. Bu sürenin ardından üzerine eritrosit yapışmış lamalar açık havada 30 dakika süresince kurumaya bırakılmıştır. Kurutma periyodunun ardından fiksasyon işlemine geçilmiştir. Bunun için, lam üzerindeki hücreler 30 dakika boyunca 0.1 M PBS içerisinde çözünmüş % 4 paraformaldehit ile inkübe edilmiştir. Fiksasyon süreci tamamlanınca lamalar 3 kez 0.1 M PBS ile yıkanmıştır. Oluşabilecek non-spesifik bağlanmaları engellemek üzere 0.1M PBS içinde hazırlanmış %3'lük sığır serum albumini (BSA) ve permeabilizasyon için %0.05 Tween 20 ile 1.5 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra serin-1177 bölgesinden fosforlanmış eNOS proteinine karşı geliştirilmiş ve tavşandan izole edilmiş primer antikor ile 1:10 dilüsyonda ve 3 saat boyunca inkübe edilmiştir (Cell Signaling, Boston, USA). Slaytlar daha sonra 3 kez 0.1 M PBS ile yıkanmış ve FITC-konjuge sekonder antikor (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) ile 1 saat

boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun hemen ardından slaytlar 3 kez 0.1M PBS yıkanmış ve florsan geliştirici medium (Vector Laboratories, Peterborough, Cambridgeshire, UK) eklenerek kapatılmıştır. Florsanan mikroskop kullanılarak (Olympus AX70) görüntülenmiştir. Fotoğraflar bir CCD kamera ile çekilmiş ve Olympus DP kontrol programı (version 3.2.1.276) ile işlenmiştir. Hücrelerde Ser1177P-eNOS proteininin dağılımını belirlemek üzere immuno-reaktivitenin yoğunluğu semi-kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Buna göre eritrositler a) boyanmamış b) orta düzeyde boyanmış c) yoğun düzeyde boyanmış olarak 3 kategoride değerlendirilmiştir.

3.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Bütün sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Eritrosit süspansiyonlarıyla perfüzyona cevaben meydana gelen damar yanıtları aşağıdaki formül ile deney bitiminde ölçülen pasif çap (D_p) kullanılarak hesaplanmış ve maksimum dilatasyonun yüzdesi (Δd) şeklinde sunulmuştur [230]:

$$\Delta d (\% \text{ maksimum dilatasyon}) = (D_5 - D_0) / (D_p - D_0) \times 100$$

Formülde yer alan D_5 , 5 dakikalık perfüzyon sonunda ölçülen damar çapını; D_0 , perfüzyon başlangıcında ölçülen damarın bazal çapını ve D_p damarın pasif çapını simgelemektedir.

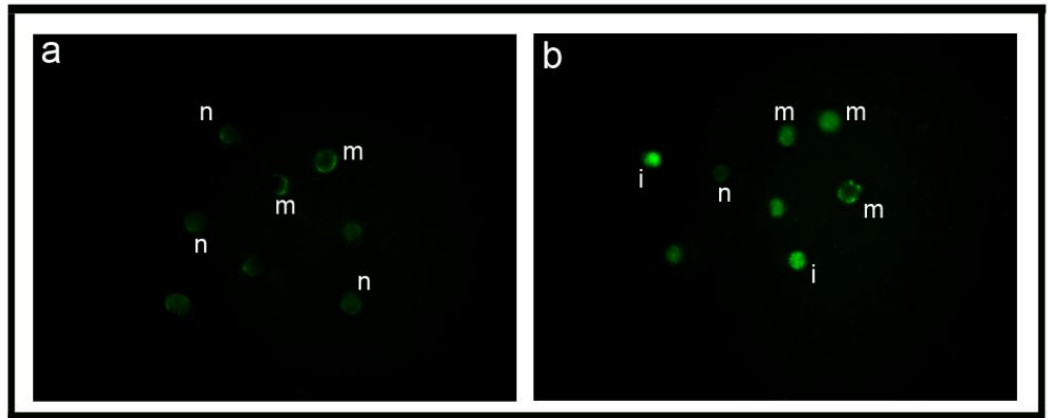
Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi ve ardından Bonferroni Post-Hoc testi kullanılarak yapılmıştır. Damar çaplarında saptanan % değişimlerin (% maksimum gevşeme) kıyaslanması % 0 değişime karşı yapılmıştır. 0.05'den küçük P değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

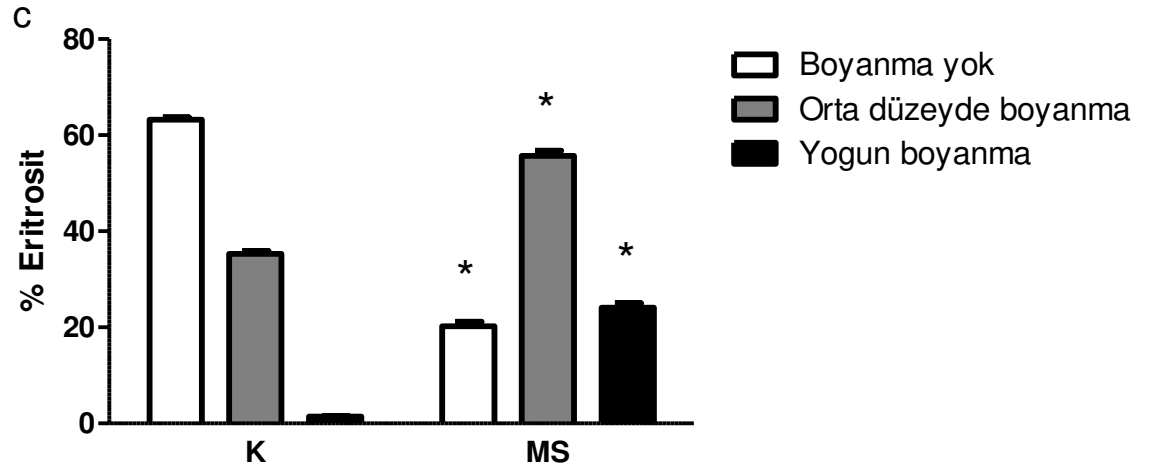
BULGULAR

4.1. Perfüzyon Çalışmalarında Kullanılan Eritrosit Süspansiyonlarının Özellikleri

4.1.1. eNOS Fosforilasyonu

Eritrosit süspansiyonlarının 20 dakika boyunca 2 Pa düzeyinde mekanik strese maruz bırakılmasının ardından eritrositlerdeki eNOS enziminin ser1177 bölgesinden fosforilasyonuna spesifik immun-floresan boyanma görüntüleri Şekil 4.1'de sunulmuştur. Buna göre mekanik stres uygulaması eritrositlerin Ser1177-peNOS fosforilasyonunu arttırmıştır. Şekil 4.1-a ve b' de kontrol ve mekanik stres uygulanan gruplarda ser1177-peNOS ekspresyonlarının tipik örneği görülmektedir. İmmunflorasan işaretlemenin semi-kantitatif analizi ise Şekil 4.1-c'de izlenmektedir. Buna göre mekanik stres uygulaması serin 1177 fosforile eNOS antikoru ile işaretlenemeyen hücre sayısında azalmaya neden olurken orta ve yoğun düzeyde işaretlenen hücre sayısında artışa neden olmaktadır.

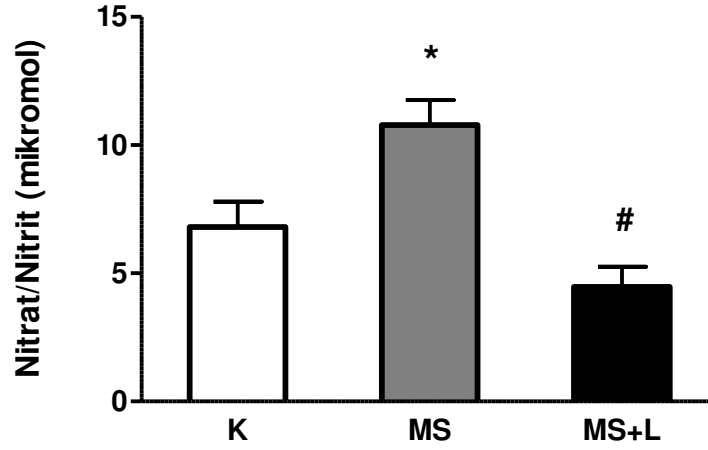




Şekil 4.1 Serin 1177 bölgesinden fosforlanan eNOS enziminin immun-florasan işaretleme yöntemi ile tayini. (a) Mekanik strese uğramayan (kontrol) eritrositler (b) 20 dakika boyunca 2 Pa düzeyinde mekanik strese uğrayan eritrositler (c) İmmun-florasan olarak işaretli Ser1177P-eNOS proteininin semikantitatif analizi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. ($n = 3$). *: $p < 0.05$ Mekanik stres uygulanmayan (kontrol) gruptan fark.

4.1.2. Nitrat/Nitrit Düzeyleri

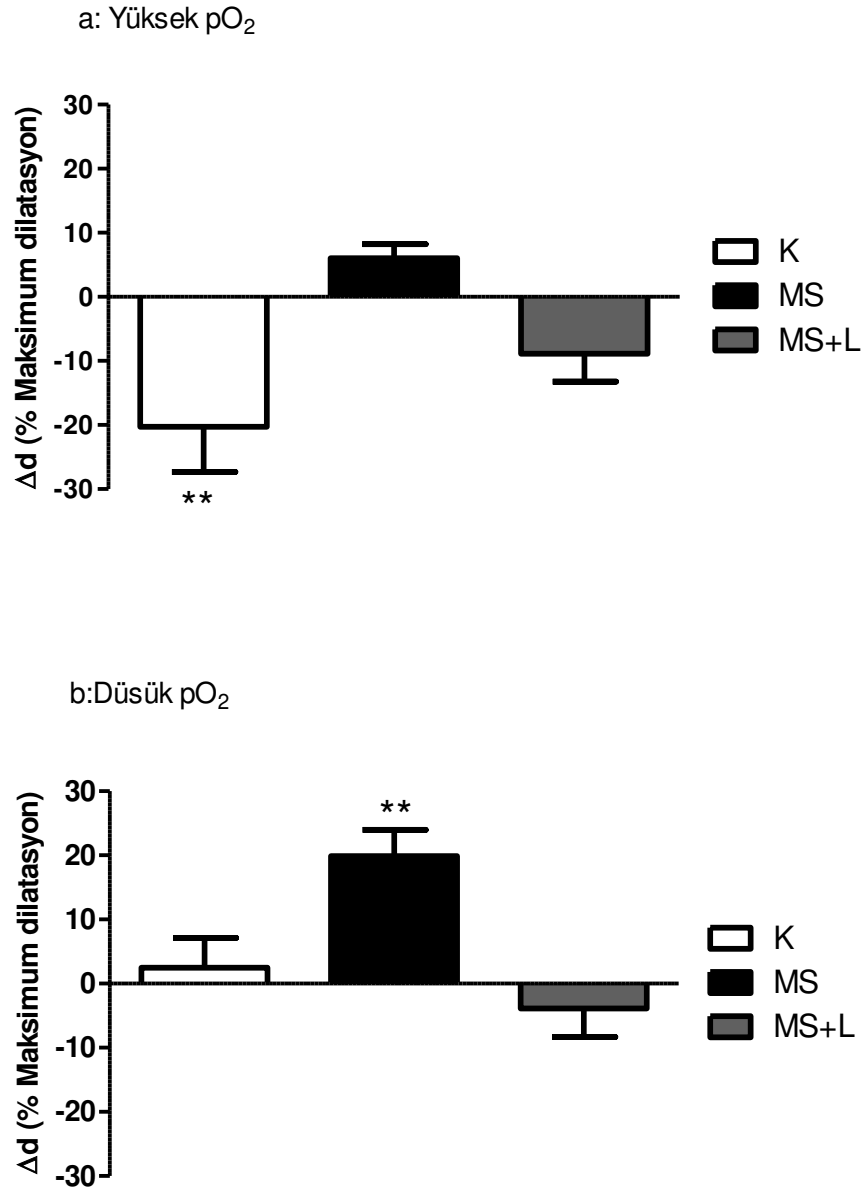
Şekil 4.1.2. kontrol ve mekanik stres koşullarında eritrositlerin süspansiyon ortamlarından elde edilen nitrat/nitrit konsantrasyonlarını göstermektedir. 20 dakika boyunca 2 Pa düzeyinde mekanik stres uygulaması süspansiyon ortamında bulunan nitrat/nitrit konsantrasyonunu istatistiksel olarak önemli düzeyde arttırmıştır ($p < 0.05$). Eritrositlerin mekanik stres uygulamasından önce L-NAME ile inkübe edilmesi ise mekanik stres uygulamasına bağlı olarak görülen bu artışı inhibe etmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 4.2 20 dakika boyunca 2.0Pa mekanik kuvvetlere maruz bırakılan eritrositlerin süspansiyon ortamında bulunan nitrat/nitrit konsantrasyonu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.(n=8). *: $p < 0.05$ Mekanik strese uğramamış gruptan (kontrol) fark; #: $p < 0.05$ mekanik stres grubundan fark.

4.2. Eritrosit Süspansiyonlarıyla Perfüzyonun Damar Çapına Etkisi

Damar segmentlerinin yüksek ve düşük pO_2 koşullarında eritrosit süspansiyonlarıyla perfüzyonunun damar çapında neden olduğu değişimler, şekil 4.3-a ve 4.3-b'de görülmektedir. İzole damar segmentlerinin pasif çapı (D_p) $343.7 \pm 11.9 \mu m$ 'dir. Damar segmentlerinin mekanik strese uğramayan kontrol grubuna ait eritrosit süspansiyonlarıyla perfüzyonu yüksek pO_2 koşullarında damar çapında önemli miktarda ($p < 0.01$) düşüşe neden olurken düşük pO_2 koşullarında bu yanıt gözlenmemiştir. Perfüzyon aşamasından önce 2 Pa büyüklüğünde mekanik kuvvetlere maruz bırakılan eritrosit süspansiyonlarının yüksek pO_2 koşullarında perfüzyonu damar çapında herhangi bir değişime neden olmazken; düşük pO_2 koşullarında perfüzyonu damar çapını önemli oranda ($p < 0.01$) arttırmıştır. Mekanik stres uygulamasından önce L-NAME ile muamele edilen grubun yüksek ve düşük pO_2 koşullarında perfüzyonu ise damar çapında önemli bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 4.3 Eritrosit perfüzyonunun damar çapında neden olduğu değişimler
Panel A: Yüksek pO₂ koşullarında eritrosit süspansiyonlarının perfüzyonu. Panel B: Düşük pO₂ koşullarında eritrosit süspansiyonlarının perfüzyonu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir (n = 10). **: p < 0.01 yüzde sıfır değişimden fark.

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Bu çalışmanın bulguları, mekanik stres uygulamasına cevaben eritrositler tarafından NOS enzimi aracılığı ile üretilen NO'nun endoteli sıyrılmış küçük mezenterik arterlerde dilatasyona neden olduğunu göstermektedir. Damarlarda gözlenen bu dilatasyon yanıtı yalnızca hipoksik koşullarda oluşmakta ve eritrositlerin non-spesifik bir NOS inhibitörü olan L-NAME ile muamele edilmesiyle ortadan kalkmaktadır. Damar segmentlerinin mekanik strese uğratılmamış eritrosit süspansiyonları ile aynı hızda perfüzyona ise yüksek pO_2 içeren koşullarda damar çapında azalmaya neden olurken, hipoksik koşullarda herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. Bu sonuçlara göre damar segmentlerinin eritrosit süspansiyonları ile perfüzyona verdikleri yanıtı eritrositlerin mekanik olarak uyarılması ve ortamın PO_2 değerleri etkilemektedir.

Eritrositler tarafından kan akımının kontrolü metabolik, miyojenik ve endotel aracılı kontrolden sonra kan akımının yerel olarak düzenlenmesinde en yeni tanımlanan mekanizmadır. Literatürde eritrositlerin damar tonüsüne etkilerini açıklayan 2 temel mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmalar eritrositlerden ATP ve NO salınımını içermekte olup bu mekanizmaların bizim çalışmamızda gözlenen damar yanıtlarına katkıları şu şekildedir:

1) Eritrositlerden hipoksi ve mekanik stres koşullarında ATP salınır. Plazmaya salınan ATP, endotel hücrelerinde bulunan purinerjik reseptörlerine bağlanarak buradan başlıca NO salınmasına neden olur [12-13]. NO ise daha sonra düz kas hücrelerinde gevşeme yanıtı oluşturur [13, 18]. Bizim çalışmamızda endotel tabakaları sıyrılmış damar segmentleri kullanılmıştır. Böylelikle çalışmamızda yer alan mekanik stres ve/veya hipoksi koşullarında eritrositlerden salınabilecek ATP'nin endotel aracılığıyla damar tonüsünde oluşturabileceği etkileri engellenmiştir. Öte yandan, ATP'nin damar düz kas hücrelerinde bulunan purinerjik reseptörlerine bağlanarak burada kasılma yanıtının gelişmesine neden olduğu da bilinmektedir [18, 227]. Çalışmamızda eritrositlerden salınabilecek ATP'nin düz kas hücrelerine etkisini önlemek amacıyla, damar segmentleri perfüzyon aşamasının öncesinde ve perfüzyon süresince bir non-spesifik purinerjik reseptör blokörü olan PPADS ile muamele edilmiş ve ATP'nin düz kas hücresi üzerindeki reseptörüne bağlanması engellenmiştir. Bu nedenlerle çalışmamızda eritrosit süspansiyonlarının perfüzyonuna cevaben gözlenen damar yanıtlarına eritrositlerden salgılanan ATP'nin katkısı bulunmamaktadır.

2) Eritrositlerden salınarak damar tonüsünü etkileyebilecek bir diğer faktör de NO'dur. İçerdikleri Hb nedeniyle 'NO süpürücüsü' olarak değerlendirilen eritrositlerin [145], son yıllarda aktifliği kesin olarak kanıtlanan

çeşitli mekanizmalarla aynı zamanda bulundukları ortamdaki NO biyoaktivitesine önemli düzeyde katkıda bulundukları da gösterilmiştir [32]. Eritrositlerde gerek non-enzimatik [24-25] gerekse enzimatik [32] yollarla NO oluşmakta ve her iki mekanizma ile oluşan NO hücre dışına çıkabilmektedir [146, 231]. Sözü edilen non-enzimatik mekanizmalardan bir tanesi, akciğerlerde üretilen NO'nun eritrosit içine girip burada oksihemoglobinle reaksiyona girerek S-nitrosohemoglobin (SNO) oluşturması ve eritrositler mikrodolaşımdan geçerken bu yapıdan ayrılıp hücre dışına çıkmasıyla oluşmaktadır [24]. Bir diğeri ise eritrositlerin plazmada bulunan nitriti NO'ya çevirmesiyle ilişkilidir. Bu olay eritrositlerdeki hemoglobinin nitrit redüktaz aktivitesi göstermesiyle açıklanmaktadır [27]. Eritrositlerin damar tonüsü üzerine etkilerine aracılık edebileceği düşünülen ve son yıllarda önem kazanan enzimatik mekanizma ise eritrositlerde bulunan NOS enzimi aracılığı ile NO üretilmesini kapsar [32]. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda non-enzimatik yollar ile oluşan NO'nun hücre dışına çıkarak lokal damar düz kas tonüsünü etkilediği gösterilmiştir [16, 24, 130]. Ancak eritrosit kaynaklı NOS aracılığı ile üretilen NO'nun damar tonüsüne etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Eritrositlerde aktif bir NOS enziminin varlığı Kleinbongard ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları geniş kapsamlı çalışmalarıyla kanıtlanmıştır. Buna göre eritrositlerde yer alan NOS enzimi hem sitoplazmada hem de membranın iç yüzünde yerleşmiş durumdadır. Bununla birlikte endotel hücrelerinde bulunan eNOS enzimine benzer şekilde genel NOS inhibitörlerine duyarlıdır, aktivitesi ise hücre içi Serin 1177 bölgesinden fosforilasyonu ve hücre içi Ca^{+2} düzeyleri tarafından belirlenmektedir [32].

Eritrositlerde aktif bir NOS enziminin bulunmasıyla birlikte bu enzimin aktifleşme mekanizmaları merak uyandırmıştır. Bu konuda yapılan ilk çalışmalar eritrositlere insülin ve asetilkolin uygulamasına cevaben NOS enziminin aktive olduğunu ve hücrelerden NO çıkışının arttığını göstermiştir [32, 34]. Öte yandan endotel hücrelerinde bulunan NOS enziminde olduğu gibi eritrositlerde bulunan NOS enziminin de hücrelere etki eden mekanik kuvvetler tarafından aktifleşebileceği birçok araştırmacı tarafından ileri sürülmüştür [3, 32]. Bu konudaki ilk deneysel çalışma 2004 yılında Fisher ve arkadaşları tarafından yapılmış ve eritrositlerde bulunan NOS enziminin, hücrelerin ekstrakorporeal dolaşımdan geçerken karşılaştıkları mekanik kuvvetler tarafından aktifleştirildiği gösterilmiştir [35]. Bununla birlikte laboratuvarımızda yapılan bir dizi çalışmada eritrositler farklı şiddetlerde mekanik kuvvetlere maruz bırakılmıştır. Bahsedilen çalışmalar dolaşım sisteminde gözlenen fizyolojik düzeyleri de kapsayan mekanik stres koşullarında, eritrositlerde bulunan NOS enziminin aktifleştiğini ve hücrelerden NO çıkışının gerçekleştiğini göstermiştir [36-38].

Çalışmamızda eritrositlerdeki NOS enzimini aktive etmek üzere eritrosit süspansiyonları 20 dakika boyunca, 2 Pa düzeyinde kayma gerilimine maruz bırakılmıştır. Önceki çalışmamızda NOS enzimini aktive ettiğini gösterdiğimiz bu kayma gerilimi düzeyi [37], dolaşım sisteminde mikrodolaşım düzeyinde gözlenen değerler arasında olup, özellikle sıçan mezenterik arteriollerinde

saptanan değerler ile uyumludur [188, 232]. Çalışmamızda 2 Pa düzeyinde uygulanan kayma geriliminin eritrositlerde bulunan NOS enzimini aktive ettiği iki parametreyle gösterilmiştir. Bunlardan bir tanesi enzimin serin 1177 bölgesinden fosforilasyon derecesinin belirlenmesi, diğeri ise NO yıkım ürünleri olan nitrit ve nitratın süspansiyon ortamındaki konsantrasyonunun ölçülmesidir. Buna göre mekanik kuvvetlere maruz kalan eritrositlerde fosforile NOS immun-florasan boyanmasında ve süspansiyon ortamındaki total nitrat/nitrit konsantrasyonlarında kontrol örneklerine göre istatistiksel olarak önemli düzeyde bir artış olduğu saptanmıştır. Nitrat/nitrit konsantrasyonunda gözlenen bu artış, eritrositlerin mekanik stres uygulamasından önce bir non-spesifik NOS inhibitörü olan L-NAME ile muamele edilmesiyle ortadan kalkmıştır. Bu sonuçlar çalışmamızda uygulanan mekanik stress düzeyi ve sresinin eritrositlerde bulunan NOS enzimini aktive etmekte yeterli olduğunu ve hücrelerden NO çıkışına neden olduğunu göstermektedir.

Eritrositlerde NOS'un varlığı, mekanik kuvvetlerle uyarıldığı ve bu yolla üretilen NO'nun hücre dışına çıktığı gösterilmiş olsa da eritrosit kaynaklı NO'nun lokal NO biyoyararlanımına ve vasomotor dengeye katkısı gösterilmemiştir. Son yıllarda bu konuda yayınlanan birçok matematiksel model çalışması bulunsa da bu çalışmaları destekleyecek deneysel veriler bulunmamaktadır [39, 233-234]. Eritrositler tarafından üretilen NO'nun vasküler sistemde önemli bir rol almasına ilişkin en önemli çekinceler şu yöndedir: 1) biyolojik çevrede NO yarı ömrünün çok kısa olması [235-236]; 2) eritrosit içinde önemli bir NO tüketicisi olan hemoglobinin yüksek konsantrasyonda bulunması. Sözü edilen faktörlerin, eritrositler tarafından üretilen NO'nun hcrenden çıkıp düz kas tonüsünü etkileyecek düzeyde lokal NO havuzuna katkı sağlamasını engelleyebileceği bildirilmiştir [237]. Chen ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında eritrositlerde üretilen NOS kaynaklı NO'nun yalnızca eritrositlerden NO çıkışını kolaylaştıracak spesifik taşıma mekanizmaları varlığında lokal NO havuzuna katkı sağlayabileceğini savunmuştur [39]. Eritrosit içindeki NO'nun membran lipitleri arasından serbest difüzyon yoluyla yalnızca sınırlı düzeyde çıkabileceği düşünülmektedir [30, 148, 234, 238]. Bunun yanında eritrosit membranında yer alan integral proteinlerinin eritrositlerden NO çıkışının gerçekleşmesinde rol alabileceği gösterilmiştir [237]. Anyon değiştiricisi (Band 3 proteini) eritrositlerden NO çıkışını kolaylaştıran proteinlerden birisidir [3, 172]. Bu protein, NO'nun hcrenden çıkışı için bir yol oluşturmasının yanı sıra, hücre içinde bulunan NO'nun membrana yakın bir şekilde bulunmasını sağlayarak [172], NO'nun hemoglobin ile reaksiyona girip tüketilmesini de önler. Ayrıca hemoglobinin oksijenasyon derecesi band 3 proteininin hcrenden NO çıkışını kolaylaştırıcı etkisinde önemli bir role sahiptir. Nitekim hemoglobinin desatürasyonu ile hcrenden Band 3 proteini aracılı NO çıkışının arttığı gösterilmiştir [3, 172].

Bu çalışmada eritrositlerde NOS enzim aktivitesi sonucu üretilen NO'nun damar düz kasına ulaşıp burada bir gevşeme yanıtına neden olup olamayacağı araştırılmıştır. Eritrositler tarafından bu yolla üretilen NO'nun damar tonüsüne katkısını ortaya koymak için endoteli sıyrılmış damar

segmentleri kullanılmış, ayrıca, eritrositlerdeki NOS enziminin aktif hale geçmesi (mekanik stres uygulamasına cevaben) bir grupta önlenmiştir. Bu amaçla eritrosit süspansiyonları mekanik stres uygulamasından önce NOS enzimini yarışmacı bir şekilde inhibe eden non-spesifik NOS inhibitörü L-NAME ile muamele edilmiştir. Çalışmanın bulgularına göre mekanik strese uğrayan eritrosit süspansiyonlarının perfüzyonu hipoksik koşullarda damar segmentlerinde gevşeme yanıtına neden olmuştur. Mekanik stres uygulamasından önce L-NAME ile muamele edilen eritrosit süspansiyonlarının perfüzyonu ise damar çapında herhangi bir değişime neden olmamıştır. Bu da bizim çalışmamızda eritrosit perfüzyonuna cevaben gözlenen gevşeme yanıtının başlıca eritrositlerdeki NOS enzim aktivitesi sonucu üretilen NO'ya bağlı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın önemli bir bulgusu da mekanik strese maruz kalan eritrosit süspansiyonlarının, yalnızca hipoksik koşullar altında vazodilatasyona neden olmasıdır. Eritrosit süspansiyonları mekanik strese maruz kalmış olsalar bile, yüksek pO_2 içeren koşullarda damar çaplarında herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. Hipoksik koşullarda gözlenen bu gevşeme yanıtı, kan damarlarında doku pO_2 'sindeki düşüşe bağlı olarak gözlenen vazodilatasyon yanıtından (hipoksik vazodilatasyon) bağımsızdır. Çünkü bu yanıt damar yatağı tipi ve doku hipoksi derecesine göre değişmekle birlikte, başlıca endotel hücreleri tarafından salgılanan gevşetici faktörler aracılığı ile gelişmektedir [239]. Hipoksik koşullarda endotel hücrelerinden salgılanarak damar düz kas tonüsünde azalmaya neden olduğu gösterilen faktörler arasında adenozin, NO, PGI_2 ve epoksieikosatrienoik asid (EET) yer almaktadır [239-242]. Bizim çalışmamızda ise endotel hücreleri sıyrılmış damar segmentleri kullanıldığı için, hipoksik koşullarda endotel hücrelerinden vazoaktif maddelerin salınımı gerçekleşmemiştir. Bununla birlikte çalışmamızda hipoksik koşullarda gözlenen gevşeme yanıtı sadece mekanik strese uğramış eritrosit süspansiyonlarının perfüzyonu sırasında gözlenmiş olup kontrol ya da MS+L grubuna ait eritrosit süspansiyonlarının aynı koşullardaki perfüzyonları sırasında oluşmamıştır. Bu bulgular MS grubu ile perfüzyon sırasında hipoksik koşullarda elde edilen gevşeme yanıtının eritrosit kaynaklı NO'ya bağlı olduğunu düşündürmektedir. Nitekim eritrositlerde eNOS enzim aktivitesi aracılığı ile üretilen NO'nun hücreden çıkışının hipoksik koşullarda yüksek pO_2 koşullarına göre daha fazla olduğu gösterilmiştir [37-38]. Dolayısıyla yalnızca hipoksik koşullarda oluştuğunu gösterdiğimiz vazodilatasyon yanıtı, mekanik strese uğramış eritrositler tarafından eNOS enzimi aracılığı ile üretilen NO'nun hücreden çıkışının artması ve damar düz kasında gevşemeye neden olmasıyla açıklanabilir.

Öte yandan, eritrositler tarafından non-enzimatik yollar ile (SNO aracılı) üretilen NO'nun hücreden çıkışının da yalnızca hipoksik koşullarda gerçekleştiği çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir [14, 24]. Bu çalışmaların iki tanesi telli miyograf düzeneğinde aort halkaları kullanılarak yapılmış ve eritrositlerin yalnızca hipoksik koşullarda damar düz kasında gevşemeye neden olduğu bildirilmiştir [14, 16]. Bu durum hipoksik koşullarda eritrositlerden SNO kaynaklı NO çıkışının artışıyla açıklanmıştır. Ayrıca hemoglobinin NO tüketici etkisinin hemoglobin oksijene durumda iken

deoksijene durumuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir [145, 243]. Bizim çalışmamızda da eritrosit süspansiyonları hipoksik koşullar altındaki damar segmentlerinden perfüze olurken taşıdıkları oksijenin bir kısmını dokuya bırakmakta ve deoksijene hale gelmektedir. Bu durum eritrosit süspansiyonlarının parsiyel oksijen basıncının damar girişinde 159 mmHg; damar çıkışında ise 48 mmHg olarak belirlenmesiyle gösterilmiştir. Dolayısıyla eritrositlerin hipoksik koşullardaki damar segmentlerinden perfüzyonu sırasında deoksijene hale gelerek NO tüketici etkilerinin azaldığı ve böylece hipoksik koşullarda hücrelerden NO çıkışının artışına katkı sağladığını söylemek mümkündür.

Bununla birlikte çalışmamızda elde edilen dilatasyon yanıtının oksijenasyona duyarlı olmasının bir başka nedeni de, damar düz kas hücrelerinin NO'ya duyarlılığının hipoksik koşullarda artması olabilir. Daha önce yapılan çalışmalar damar düz kas hücrelerinin RSNO ve diğer NO donörlerini içeren nitrovazodilatörlere geliştirdiği gevşeme yanıtının hipoksik koşullarda daha fazla olduğunu göstermiştir [14, 244]. Normal koşullar altında NO'nun düz kas hücrelerinde gevşemeye neden olan etkisi cGMP oluşumu üzerinden gerçekleşmektedir [85, 212, 245]. Ancak hipoksik koşullar altında buna ek olarak, NO'nun sarkoplazmik retikulum kalsiyum pompası (SERKA)'nı da aktive ettiği ve hücre içi kalsiyum düzeylerini azaltarak düz kas hücrelerinde gevşeme yanıtına neden olduğu bilinmektedir [246].

Endotel tabakası sıyrılmış damar segmentlerinin mekanik strese uğramayan eritrosit süspansiyonlarıyla yüksek pO_2 koşullarında perfüzyonu ise, damar çapında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir azalmaya neden olmuştur. Daha önce yapılan birçok çalışmada damar segmentlerinin içlerinden geçen sıvı akımıyla kasılma yanıtı geliştirebileceği gösterilmiştir [247-250]. 'Akım aracılı kasılma yanıtı' olarak literatürde yerini alan bu mekanizma özellikle damar düz kas hücrelerinde bir araşidonik asid yıkım ürünü olan 20-hidroksi-5,8,11,14-ekosaterreneoik asid (20-HETE) oluşumuna bağlanmaktadır [251-252]. 20-HETE ise Ca^{+2} bağımsız yollarla damar düz kasında kasılmaya neden olmaktadır [252]. Öte yandan izole düz kas hücrelerine kayma gerilimi uygulanmasıyla yapılan birçok çalışmada düz kas hücrelerinin sıvı akımından kaynaklanan kayma kuvvetlerini hücre yüzeylerinde bulunan glikokaliks tabakasıyla algıladıkları ve bu sinyali bir kasılma yanıtına dönüştürdükleri gösterilmiştir [252-255].

Vasküler sistemde düz kas hücreleri direk olarak kan akımından kaynaklanan kayma kuvvetlerine maruz kalmazlar. Çünkü bütün kan damarlarının iç yüzeyini saran endotel tabakası düz kas hücrelerinin akımla direk olarak karşılaşmasını engeller. Endotel hasarlanması ya da endotel tabakasının sıyrılması durumlarında ise düz kas hücreleri direk olarak kan akımından kaynaklanan kayma gerilimine maruz kalırlar. Bu durum klinik olarak koroner anjiyoplasti gibi kardiyovasküler girişimlerden sonra gözlenebilmektedir [252]. Bizim çalışmamızda eritrosit süspansiyonları endotel tabakası sıyrılmış damar segmentlerinden perfüze edilmiş, dolayısıyla damar düz kas hücreleri direk olarak sıvı akımına maruz kalmıştır. Bu nedenle eritrosit süspansiyonlarının yüksek pO_2 koşullarında perfüzyonu

sırasında gözlenen kasılma yanıtının, damar düz kas hücrelerinin kayma gerilimine doğrudan maruz kalmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Sonuç olarak bizim deneysel bulgularımız eritrositler tarafından eNOS enzim aktivasyonu ile üretilen ve hücre dışına salınan NO'nun, vasküler düz kas tabakasına ulaşarak burada gevşeme yanıtı oluşturduğunu göstermiştir. Daha önceki çalışmalar ile birlikte bizim bulgularımız birleştirildiğinde eritrositlerin lokal kan akımının düzenlenmesinde özellikle hipoksik koşullar altında önemli bir rol oynadığı ve bu hücrelerde NOS enzim aktivasyonu yolu ile üretilen NO'nun eritrosit aracılı kan akımı regülasyonunun önemli bir parçasını oluşturduğu söylenebilir.

SONUÇLAR

1. Eritrositlerin 20 dakika süresince 2 Pa düzeyinde mekanik kuvvetlere maruz bırakılması, eritrositlerde bulunan eNOS enziminin serin1177 bölgesinden fosforilasyonuna neden olmuştur.
2. Eritrositlerin 20 dakika süresince 2 Pa düzeyinde mekanik kuvvetlere maruz bırakılması eritrosit süspansiyon ortamında, NO yıkım ürünleri olan nitrat/nitrit konsantrasyonunda artışa neden olmuştur. Nitrit-nitrat düzeylerinde gözlenen bu artış, eritrositlerin mekanik stres uygulamasından önce bir non-spesifik NOS inhibitörü olan L-NAME ile muamele edilmesiyle ortadan kalkmıştır.
3. Damar segmentlerinin mekanik strese uğratılmamış eritrosit süspansiyonları ile perfüzonu yüksek pO_2 koşullarında damar çapında azalmaya neden olurken, hipoksik koşullarda herhangi bir değişiklik yaratmamıştır.
4. Mekanik strese maruz bırakılmış eritrosit süspansiyonlarının damar segmentlerinden perfüzyonu yüksek pO_2 içeren koşullarda damar çapında herhangi bir değişikliğe neden olmamış, ancak hipoksik koşullarda istatistiksel olarak önemli düzeyde gevşeme yanıtı oluşturmuştur.
5. Mekanik stres öncesinde non-spesifik NOS inhibitörü olan L-NAME ile muamele edilen eritrosit süspansiyonların yüksek pO_2 ve düşük pO_2 koşullarındaki perfüzyonu, damar yanıtlarında herhangi bir değişime neden olmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Baskurt, O.K. and H.J. Meiselman, *Blood rheology and hemodynamics*. Semin Thromb Hemost, 2003. **29**(5): p. 435-50.
2. Chien, S., *Red cell deformability and its relevance to blood flow*. Annu Rev Physiol, 1987. **49**: p. 177-92.
3. Barvitenko, N.N., N.C. Adragna, and R.E. Weber, *Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance*. Cell Physiol Biochem, 2005. **15**(1-4): p. 1-18.
4. Minetti, G. and P.S. Low, *Erythrocyte signal transduction pathways and their possible functions*. Curr Opin Hematol, 1997. **4**(2): p. 116-21.
5. Larsen, F.L., et al., *Physiological shear stresses enhance the Ca²⁺ permeability of human erythrocytes*. Nature, 1981. **294**(5842): p. 667-8.
6. Ney, P.A., M.M. Christopher, and R.P. Hebbel, *Synergistic effects of oxidation and deformation on erythrocyte monovalent cation leak*. Blood, 1990. **75**(5): p. 1192-8.
7. Johnson, P.C. and H.A. Henrich, *Metabolic and myogenic factors in local regulation of the microcirculation*. Fed Proc, 1975. **34**(11): p. 2020-4.
8. Meininger, G.A. and M.J. Davis, *Cellular mechanisms involved in the vascular myogenic response*. Am J Physiol, 1992. **263**(3 Pt 2): p. H647-59.
9. Campbell, W.B. and K.M. Gauthier, *What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors?* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002. **11**(2): p. 177-83.
10. Guyton, A.C., T.G. Coleman, and H.J. Granger, *Circulation: overall regulation*. Annu Rev Physiol, 1972. **34**: p. 13-46.
11. Ellsworth, M.L., et al., *The erythrocyte as a regulator of vascular tone*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 2): p. H2155-61.
12. Sprague, R.S., et al., *ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation*. Am J Physiol, 1996. **271**(6 Pt 2): p. H2717-22.

13. Sprague, R.S., et al., *Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 2): p. H1726-32.
14. Datta, B., et al., *Red blood cell nitric oxide as an endocrine vasoregulator: a potential role in congestive heart failure*. Circulation, 2004. **109**(11): p. 1339-42.
15. Gladwin, M.T., J.H. Crawford, and R.P. Patel, *The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(6): p. 707-17.
16. Diesen, D.L., D.T. Hess, and J.S. Stamler, *Hypoxic vasodilation by red blood cells: evidence for an s-nitrosothiol-based signal*. Circ Res, 2008. **103**(5): p. 545-53.
17. Sprague, R.S., et al., *Rabbit erythrocytes release ATP and dilate skeletal muscle arterioles in the presence of reduced oxygen tension*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 183-90.
18. Ellsworth, M.L., et al., *Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone*. Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 107-16.
19. Olearczyk, J.J., et al., *Nitric oxide inhibits ATP release from erythrocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **309**(3): p. 1079-84.
20. Olearczyk, J.J., et al., *NO inhibits signal transduction pathway for ATP release from erythrocytes via its action on heterotrimeric G protein Gi*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H748-54.
21. Olearczyk, J.J., et al., *Receptor-mediated activation of the heterotrimeric G-protein Gs results in ATP release from erythrocytes*. Med Sci Monit, 2001. **7**(4): p. 669-74.
22. Sprague, R.S., et al., *The role of G protein beta subunits in the release of ATP from human erythrocytes*. J Physiol Pharmacol, 2002. **53**(4 Pt 1): p. 667-74.
23. Sprague, R.S., et al., *Reduced expression of G(i) in erythrocytes of humans with type 2 diabetes is associated with impairment of both cAMP generation and ATP release*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3588-93.
24. Stamler, J.S., et al., *Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2034-7.
25. Pawloski, J.R., D.T. Hess, and J.S. Stamler, *Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity*. Nature, 2001. **409**(6820): p. 622-6.
26. Jia, L., et al., *S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control*. Nature, 1996. **380**(6571): p. 221-6.

27. Gladwin, M.T., *Role of the red blood cell in nitric oxide homeostasis and hypoxic vasodilation*. Adv Exp Med Biol, 2006. **588**: p. 189-205.
28. Jagger, J.E., et al., *Role of erythrocyte in regulating local O₂ delivery mediated by hemoglobin oxygenation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(6): p. H2833-9.
29. Robinson, J.M. and J.R. Lancaster, Jr., *Hemoglobin-mediated, hypoxia-induced vasodilation via nitric oxide: mechanism(s) and physiologic versus pathophysiologic relevance*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(4): p. 257-61.
30. Jeffers, A., et al., *Hemoglobin mediated nitrite activation of soluble guanylyl cyclase*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2005. **142**(2): p. 130-5.
31. Dufour, S.P., et al., *Erythrocyte-dependent regulation of human skeletal muscle blood flow: role of varied oxyhemoglobin and exercise on nitrite, S-nitrosohemoglobin, and ATP*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(6): p. H1936-46.
32. Kleinbongard, P., et al., *Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2943-51.
33. Bor-Kucukatay, M., et al., *Effects of nitric oxide on red blood cell deformability*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(5): p. H1577-84.
34. Carvalho, F.A., et al., *Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels*. J Appl Toxicol, 2004. **24**(6): p. 419-27.
35. Fischer, U.M., et al., *Extracorporeal circulation activates endothelial nitric oxide synthase in erythrocytes*. Ann Thorac Surg, 2007. **84**(6): p. 2000-3.
36. Ulker, P., et al., *Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells*. Nitric Oxide, 2011. **24**(4): p. 184-91.
37. Ulker, P., et al., *Mechanical stimulation of nitric oxide synthesizing mechanisms in erythrocytes*. Biorheology, 2009. **46**(2): p. 121-32.
38. Ulker, P., H.J. Meiselman, and O.K. Baskurt, *Nitric oxide generation in red blood cells induced by mechanical stress*. Clin Hemorheol Microcirc, 2010. **45**(2-4): p. 169-75.
39. Chen, K., R.N. Pittman, and A.S. Popel, *Hemorrhagic shock and nitric oxide release from erythrocytic nitric oxide synthase: a quantitative analysis*. Microvasc Res, 2009. **78**(1): p. 107-18.
40. Berne, R.M., Levy M.N., Stanton, B.A., *Physiology*. 2008: Günei Tıp Kitapevi.
41. Guyton, A.C., Hall, J.E. , *Circulatory System in Medical Physiology*. 2013, Elsevier Saunders.

42. EW, M., *Rheology of blood*. Physiol Reviews, 1969. **49**: p. 863-888.
43. L., D., *Rheology of blood in diagnostic and preventive medicine*. Butterwords, London, 1976: p. 1-259.
44. G, L., *Clinical Blood Rheology*. 1988, Boca Raton FL: CRC Press. 93-106.
45. Charm SE, K.G., *Blood flow and microcirculation*. Newyork: John Willy - Sons, 1974. **164**(9): p. 3-210.
46. GDO, L., *Nature and clinical importance of blood rheology*, ed. L. GDO. 1988, Inc Florida: CRC Press. 19-23.
47. Schmid-Schonbein, H., R.E. Wells, and J. Goldstone, *Fluid drop-like behaviour of erythrocytes--disturbance in pathology and its quantification*. Biorheology, 1971. **7**(4): p. 227-34.
48. Wells, R. and H. Schmid-Schonbein, *Red cell deformation and fluidity of concentrated cell suspensions*. J Appl Physiol, 1969. **27**(2): p. 213-7.
49. Stoltz, J.F., *Hemorheology: Importance of erythrocyte aggregation*. Clin Hemorheol Microcirc, 1987. **7**: p. 15-23.
50. Shiga, T., N. Maeda, and K. Kon, *Erythrocyte rheology*. Crit Rev Oncol Hematol, 1990. **10**(1): p. 9-48.
51. Gordon, R.J. and M.B. Ravin, *Rheology and anesthesiology*. Anesth Analg, 1978. **57**(2): p. 252-61.
52. Badeer, H.S., *Hemodynamics for medical students*. Adv Physiol Educ, 2001. **25**(1-4): p. 44-52.
53. Pfitzner, J., *Poiseuille and his law*. Anaesthesia, 1976. **31**(2): p. 273-5.
54. Fronek, K. and B.W. Zweifach, *Microvascular pressure distribution in skeletal muscle and the effect of vasodilation*. Am J Physiol, 1975. **228**(3): p. 791-6.
55. Clifford, P.S., *Local control of blood flow*. Adv Physiol Educ, 2011. **35**(1): p. 5-15.
56. Hester, R.L. and L.W. Hammer, *Venular-arteriolar communication in the regulation of blood flow*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **282**(5): p. R1280-5.
57. W, I., *The Arc of Quito*. Science, 1902. **16**(396): p. 194-5.
58. Davis, M.J., *Myogenic response gradient in an arteriolar network*. Am J Physiol, 1993. **264**(6 Pt 2): p. H2168-79.
59. Hill, M.A. and M.J. Davis, *Coupling a change in intraluminal pressure to vascular smooth muscle depolarization: still stretching for an explanation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(6): p. H2570-2.

60. Drummond, H.A., S.C. Grifoni, and N.L. Jernigan, *A new trick for an old dogma: ENaC proteins as mechanotransducers in vascular smooth muscle*. Physiology (Bethesda), 2008. **23**: p. 23-31.
61. Feletou, M., E.H. Tang, and P.M. Vanhoutte, *Nitric oxide the gatekeeper of endothelial vasomotor control*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 4198-217.
62. Chen, G., H. Suzuki, and A.H. Weston, *Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels*. Br J Pharmacol, 1988. **95**(4): p. 1165-74.
63. Griffith, T.M., *Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis?* Br J Pharmacol, 2004. **141**(6): p. 881-903.
64. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
65. O'Brien, R.F., R.J. Robbins, and I.F. McMurtry, *Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance*. J Cell Physiol, 1987. **132**(2): p. 263-70.
66. Yanagisawa, M., et al., *A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels*. J Hypertens Suppl, 1988. **6**(4): p. S188-91.
67. Attina, T., et al., *Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond*. Heart, 2005. **91**(6): p. 825-31.
68. Luscher, T.F. and R.R. Wenzel, *Endothelin and endothelin antagonists: pharmacology and clinical implications*. Agents Actions Suppl, 1995. **45**: p. 237-53.
69. Griendling, K.K., *Biology of the Vessel Wall*, in *Hurst's The Heart*, V. Fuster, Editor. 2007, The McGraw-Hill Companies. p. 137-139.
70. Simonson, M.S. and M.J. Dunn, *Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family*. FASEB J, 1990. **4**(12): p. 2989-3000.
71. Bellien, J., C. Thuillez, and R. Joannides, *Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans*. Fundam Clin Pharmacol, 2008. **22**(4): p. 363-77.
72. Ruan, K.H., *Advance in understanding the biosynthesis of prostacyclin and thromboxane A₂ in the endoplasmic reticulum membrane via the cyclooxygenase pathway*. Mini Rev Med Chem, 2004. **4**(6): p. 639-47.

73. Parkington, H.C., H.A. Coleman, and M. Tare, *Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization*. Pharmacol Res, 2004. **49**(6): p. 509-14.
74. Vallance, P., *Endothelial regulation of vascular tone*. Postgrad Med J, 1992. **68**(803): p. 697-701.
75. Fleming, I. and R. Busse, *Vascular cytochrome P450 in the regulation of renal function and vascular tone: EDHF, superoxide anions and blood pressure*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(7): p. 1309-11.
76. Little, T.L., J. Xia, and B.R. Duling, *Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall*. Circ Res, 1995. **76**(3): p. 498-504.
77. Coleman, H.A., M. Tare, and H.C. Parkington, *Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004. **31**(9): p. 641-9.
78. Edwards, L.A., *Symposium on diarrhea. 6. Infectious diarrhea*. Can Med Assoc J, 1977. **116**(7): p. 753-5.
79. Marin, J. and M.A. Rodriguez-Martinez, *Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions*. Pharmacol Ther, 1997. **75**(2): p. 111-34.
80. Koshland, D.E., Jr., *The molecule of the year*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1861.
81. Shinde, U.A., A.A. Mehta, and R.K. Goyal, *Nitric oxide: a molecule of the millennium*. Indian J Exp Biol, 2000. **38**(3): p. 201-10.
82. Janero, D.R., *Nitric oxide (NO)-related pharmaceuticals: contemporary approaches to therapeutic NO modulation*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(10): p. 1495-506.
83. Osorio, J.C. and F.A. Recchia, *The role of nitric oxide in metabolism regulation: from basic sciences to the clinical setting*. Intensive Care Med, 2000. **26**(9): p. 1395-8.
84. Lowenstein, C.J., J.L. Dinerman, and S.H. Snyder, *Nitric oxide: a physiologic messenger*. Ann Intern Med, 1994. **120**(3): p. 227-37.
85. Bhagat, K. and P. Vallance, *Nitric oxide 9 years on*. J R Soc Med, 1996. **89**(12): p. 667-73.
86. Vallance, P. and A. Hingorani, *Endothelial nitric oxide in humans in health and disease*. Int J Exp Pathol, 1999. **80**(6): p. 291-303.
87. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.

88. Lloyd-Jones, D.M. and K.D. Bloch, *The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis*. Annu Rev Med, 1996. **47**: p. 365-75.
89. Ignarro, L.J., *Nitric oxide-mediated vasorelaxation*. Thromb Haemost, 1993. **70**(1): p. 148-51.
90. Martin, M.J., M.D. Jimenez, and V. Motilva, *New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract*. Curr Pharm Des, 2001. **7**(10): p. 881-908.
91. Bogle, R.G., et al., *Regulation of L-arginine transport and nitric oxide release in superfused porcine aortic endothelial cells*. J Physiol, 1996. **490** (Pt 1): p. 229-41.
92. Dawson, T.M., V.L. Dawson, and S.H. Snyder, *A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide*. Ann Neurol, 1992. **32**(3): p. 297-311.
93. Ignarro, L.J., *Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology*. Biosci Rep, 1999. **19**(2): p. 51-71.
94. Tottrup, A., E.B. Glavind, and D. Svane, *Involvement of the L-arginine-nitric oxide pathway in internal anal sphincter relaxation*. Gastroenterology, 1992. **102**(2): p. 409-15.
95. Zatz, R. and G. de Nucci, *Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation*. Am J Physiol, 1991. **261**(2 Pt 2): p. F360-3.
96. Brezis, M., et al., *Role of nitric oxide in renal medullary oxygenation. Studies in isolated and intact rat kidneys*. J Clin Invest, 1991. **88**(2): p. 390-5.
97. Nathan, C.F. and J.B. Hibbs, Jr., *Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity*. Curr Opin Immunol, 1991. **3**(1): p. 65-70.
98. Hoffman, R.A., et al., *Alloantigen-induced activation of rat splenocytes is regulated by the oxidative metabolism of L-arginine*. J Immunol, 1990. **145**(7): p. 2220-6.
99. Albina, J.E., J.A. Abate, and W.L. Henry, Jr., *Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway*. J Immunol, 1991. **147**(1): p. 144-8.
100. Mills, C.D., *Molecular basis of "suppressor" macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway*. J Immunol, 1991. **146**(8): p. 2719-23.
101. Mohandas, N. and J.A. Chasis, *Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids*. Semin Hematol, 1993. **30**(3): p. 171-92.

102. Pfeilschifter, J., *Signalling pathways of nitric oxide*. Kidney Blood Press Res, 2000. **23**(3-5): p. 159-61.
103. Groves, J.T. and C.C. Wang, *Nitric oxide synthase: models and mechanisms*. Curr Opin Chem Biol, 2000. **4**(6): p. 687-95.
104. Stuehr, D.J., *Structure-function aspects in the nitric oxide synthases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**: p. 339-59.
105. Govers, R. and T.J. Rabelink, *Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **280**(2): p. F193-206.
106. Boucher, J.L., C. Moali, and J.P. Tenu, *Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(8-9): p. 1015-28.
107. Mendes Ribeiro, A.C., et al., *Identification of system y+L as the high-affinity transporter for L-arginine in human platelets: up-regulation of L-arginine influx in uraemia*. Pflugers Arch, 1999. **438**(4): p. 573-5.
108. Michel, T. and O. Feron, *Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?* J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2146-52.
109. Liu, J., G. Garcia-Cardena, and W.C. Sessa, *Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization*. Biochemistry, 1996. **35**(41): p. 13277-81.
110. Feron, O., et al., *The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle*. J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3125-8.
111. Vasquez-Vivar, J., et al., *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9220-5.
112. Wever, R.M., et al., *Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(2): p. 340-4.
113. Hemmens, B. and B. Mayer, *Enzymology of nitric oxide synthases*. Methods Mol Biol, 1998. **100**: p. 1-32.
114. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
115. Klatt, P., et al., *Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N omega-hydroxy-L-arginine as an intermediate*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 14781-7.

116. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5193-7.
117. Raman, C.S., et al., *Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center*. Cell, 1998. **95**(7): p. 939-50.
118. Cooke, J.P. and V.J. Dzau, *Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease*. Annu Rev Med, 1997. **48**: p. 489-509.
119. Ortega Mateo, A. and A. Amaya Aleixandre de, *Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects*. Pharmacol Res, 2000. **42**(5): p. 421-7.
120. Lauer, T., P. Kleinbongard, and M. Kelm, *Indexes of NO bioavailability in human blood*. News Physiol Sci, 2002. **17**: p. 251-5.
121. Wang, J., M.S. Wolin, and T.H. Hintze, *Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs*. Circ Res, 1993. **73**(5): p. 829-38.
122. Boo, Y.C. and H. Jo, *Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(3): p. C499-508.
123. Butt, E., et al., *Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 5179-87.
124. Chen, Z.P., et al., *AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase*. FEBS Lett, 1999. **443**(3): p. 285-9.
125. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
126. Harris, M.B., et al., *Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16587-91.
127. Fleming, I., et al., *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. Circ Res, 2001. **88**(11): p. E68-75.
128. McCabe, T.J., et al., *Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6123-8.

129. Behrendt, D. and P. Ganz, *Endothelial function. From vascular biology to clinical applications*. Am J Cardiol, 2002. **90**(10C): p. 40L-48L.
130. Cosby, K., et al., *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation*. Nat Med, 2003. **9**(12): p. 1498-505.
131. Isbell, T.S., et al., *SNO-hemoglobin is not essential for red blood cell-dependent hypoxic vasodilation*. Nat Med, 2008. **14**(7): p. 773-7.
132. Miseta, A., et al., *Relationship between cellular ATP, potassium, sodium and magnesium concentrations in mammalian and avian erythrocytes*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1175**(2): p. 133-9.
133. Bergfeld, G.R. and T. Forrester, *Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia*. Cardiovasc Res, 1992. **26**(1): p. 40-7.
134. You, J., et al., *Endothelial-mediated dilations of rat middle cerebral arteries by ATP and ADP*. Am J Physiol, 1997. **273**(3 Pt 2): p. H1472-7.
135. Ellsworth, M.L., *The red blood cell as an oxygen sensor: what is the evidence?* Acta Physiol Scand, 2000. **168**(4): p. 551-9.
136. Jensen, F.B., *Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport*. Acta Physiol Scand, 2004. **182**(3): p. 215-27.
137. Sridharan, M., et al., *Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced ATP release from human erythrocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(4): p. H1146-52.
138. Locovei, S., L. Bao, and G. Dahl, *Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7655-9.
139. Sridharan, M., et al., *Prostacyclin receptor-mediated ATP release from erythrocytes requires the voltage-dependent anion channel*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(3): p. H553-9.
140. Sprague, R.S., et al., *Participation of cAMP in a signal-transduction pathway relating erythrocyte deformation to ATP release*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(4): p. C1158-64.
141. Wang, L., et al., *ADP acting on P2Y₁₃ receptors is a negative feedback pathway for ATP release from human red blood cells*. Circ Res, 2005. **96**(2): p. 189-96.
142. Han, T.H., et al., *Nitric oxide reaction with red blood cells and hemoglobin under heterogeneous conditions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7763-8.

143. Vaughn, M.W., L. Kuo, and J.C. Liao, *Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation*. Am J Physiol, 1998. **274**(5 Pt 2): p. H1705-14.
144. Liao, J.C., et al., *Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8757-61.
145. Azarov, I., et al., *Nitric oxide scavenging by red blood cells as a function of hematocrit and oxygenation*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39024-32.
146. Rifkind, J.M., et al., *Nitrite-induced improved blood circulation associated with an increase in a pool of RBC-NO with no bioactivity*. Adv Exp Med Biol, 2009. **645**: p. 27-34.
147. Kim-Shapiro, D.B., A.N. Schechter, and M.T. Gladwin, *Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(4): p. 697-705.
148. Chen, K., et al., *Nitric oxide from nitrite reduction by hemoglobin in the plasma and erythrocytes*. Nitric Oxide, 2008. **18**(1): p. 47-60.
149. Barry W. Allen, J.S.S., Clude A. Piantadosi, *Hemoglobin, nitric oxide and molecular mechanisms of hypoxic vasodilation*. Trends in molecular medicine, 2009. **article in press**.
150. Allen, B.W. and C.A. Piantadosi, *How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO-hemoglobin paradigm*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(4): p. H1507-12.
151. Myers, P.R., et al., *Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide*. Nature, 1990. **345**(6271): p. 161-3.
152. McMahon, T.J., et al., *Nitric oxide in the human respiratory cycle*. Nat Med, 2002. **8**(7): p. 711-7.
153. Doyle, M.P., et al., *Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites*. J Biol Chem, 1981. **256**(23): p. 12393-8.
154. Hunter, C.J., et al., *Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator*. Nat Med, 2004. **10**(10): p. 1122-7.
155. Rhodes, P., et al., *The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **209**(2): p. 590-6.
156. Godecke, A., et al., *Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice*. Circ Res, 1998. **82**(2): p. 186-94.

157. Kleinbongard, P., et al., *Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(7): p. 790-6.
158. Meulemans, A. and F. Delsenne, *Measurement of nitrite and nitrate levels in biological samples by capillary electrophoresis*. J Chromatogr B Biomed Appl, 1994. **660**(2): p. 401-4.
159. Gorenflo, M., et al., *Metabolites of the L-arginine-NO pathway in patients with left-to-right shunt*. Clin Lab, 2001. **47**(9-10): p. 441-7.
160. Dejam, A., et al., *Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood*. Blood, 2005. **106**(2): p. 734-9.
161. Jensen, F.B., *Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2003. **135**(1): p. 9-24.
162. May, J.M., et al., *Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(6): p. C1946-54.
163. Webb, A.J., et al., *Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase*. Circ Res, 2008. **103**(9): p. 957-64.
164. Huang, Z., et al., *Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2099-107.
165. Crawford, J.H., et al., *Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation*. Blood, 2006. **107**(2): p. 566-74.
166. Ignarro, L.J. and C.A. Gruetter, *Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: possible involvement of S-nitrosothiols*. Biochim Biophys Acta, 1980. **631**(2): p. 221-31.
167. Moulds, R.F., R.A. Jauernig, and J. Shaw, *A comparison of the effects of hydralazine, diazoxide, sodium nitrite and sodium nitroprusside on human isolated arteries and veins*. Br J Clin Pharmacol, 1981. **11**(1): p. 57-61.
168. Lancaster, J.R., Jr., *Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8137-41.
169. Buerk, D.G., *Nitric oxide regulation of microvascular oxygen*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(7): p. 829-43.
170. Moncada, S., *Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **811**: p. 60-7; discussion 67-9.

171. Kang, E.S., et al., *Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins*. J Lab Clin Med, 2000. **135**(6): p. 444-51.
172. Ozuyaman, B., et al., *RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects*. Trends Mol Med, 2008. **14**(7): p. 314-22.
173. Hoeflich, K.P. and M. Ikura, *Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms*. Cell, 2002. **108**(6): p. 739-42.
174. Anderson, J.P. and J.S. Morrow, *The interaction of calmodulin with human erythrocyte spectrin. Inhibition of protein 4.1-stimulated actin binding*. J Biol Chem, 1987. **262**(13): p. 6365-72.
175. Gromov, P.S. and J.E. Celis, *Identification of two molecular chaperons (HSX70, HSC70) in mature human erythrocytes*. Exp Cell Res, 1991. **195**(2): p. 556-9.
176. Kleinbongard, P., S. Keymel, and M. Kelm, *New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood*. Thromb Haemost, 2007. **98**(5): p. 970-4.
177. Jiang, M., et al., *Arginase-flotillin interaction brings arginase to red blood cell membrane*. FEBS Lett, 2006. **580**(28-29): p. 6561-4.
178. Wang, B.Y., et al., *Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis*. Circulation, 1999. **99**(9): p. 1236-41.
179. Schnorr, O., et al., *Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo*. Arch Biochem Biophys, 2008. **476**(2): p. 211-5.
180. Kilberg, M.S., B.R. Stevens, and D.A. Novak, *Recent advances in mammalian amino acid transport*. Annu Rev Nutr, 1993. **13**: p. 137-65.
181. Shima, Y., et al., *L-arginine import via cationic amino acid transporter CAT1 is essential for both differentiation and proliferation of erythrocytes*. Blood, 2006. **107**(4): p. 1352-6.
182. Harrison, D.G. and C. Long, *The calcium content of human erythrocytes*. J Physiol, 1968. **199**(2): p. 367-81.
183. Allan, D., P. Thomas, and A.R. Limbrick, *The isolation and characterization of 60 nm vesicles ('nanovesicles') produced during ionophore A23187-induced budding of human erythrocytes*. Biochem J, 1980. **188**(3): p. 881-7.

184. Anderson, D.R., J.L. Davis, and K.L. Carraway, *Calcium-promoted changes of the human erythrocyte membrane. Involvement of spectrin, transglutaminase, and a membrane-bound protease.* J Biol Chem, 1977. **252**(19): p. 6617-23.
185. Allan, D. and P. Thomas, *Ca²⁺-induced biochemical changes in human erythrocytes and their relation to microvesiculation.* Biochem J, 1981. **198**(3): p. 433-40.
186. Nash, G.B. and H.J. Meiselman, *Red cell and ghost viscoelasticity. Effects of hemoglobin concentration and in vivo aging.* Biophys J, 1983. **43**(1): p. 63-73.
187. Bratosin, D., et al., *Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria.* Cell Death Differ, 2001. **8**(12): p. 1143-56.
188. Reneman, R.S., T. Arts, and A.P. Hoeks, *Wall shear stress--an important determinant of endothelial cell function and structure--in the arterial system in vivo. Discrepancies with theory.* J Vasc Res, 2006. **43**(3): p. 251-69.
189. Carallo, C., et al., *Evaluation of common carotid hemodynamic forces. Relations with wall thickening.* Hypertension, 1999. **34**(2): p. 217-21.
190. Katritsis, D., et al., *Wall shear stress: theoretical considerations and methods of measurement.* Prog Cardiovasc Dis, 2007. **49**(5): p. 307-29.
191. Oyre, S., et al., *Accurate noninvasive quantitation of blood flow, cross-sectional lumen vessel area and wall shear stress by three-dimensional paraboloid modeling of magnetic resonance imaging velocity data.* J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(1): p. 128-34.
192. Shaaban, A.M. and A.J. Duerinckx, *Wall shear stress and early atherosclerosis: a review.* AJR Am J Roentgenol, 2000. **174**(6): p. 1657-65.
193. Edelman, R.R., *Magnetic resonance angiography. An overview.* Invest Radiol, 1993. **28 Suppl 4**: p. S43-6.
194. Ku, D.N., et al., *Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress.* Arteriosclerosis, 1985. **5**(3): p. 293-302.
195. Malek, A.M., S.L. Alper, and S. Izumo, *Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis.* JAMA, 1999. **282**(21): p. 2035-42.
196. Reneman, R.S., J.M. Meinders, and A.P. Hoeks, *Non-invasive ultrasound in arterial wall dynamics in humans: what have we learned and what remains to be solved.* Eur Heart J, 2005. **26**(10): p. 960-6.

197. Wootton, D.M. and D.N. Ku, *Fluid mechanics of vascular systems, diseases, and thrombosis*. Annu Rev Biomed Eng, 1999. **1**: p. 299-329.
198. Ko, K.S. and C.A. McCulloch, *Partners in protection: interdependence of cytoskeleton and plasma membrane in adaptations to applied forces*. J Membr Biol, 2000. **174**(2): p. 85-95.
199. Ferrell, C.M., et al., *Lithium and protein kinase C modulators regulate swelling-activated K-Cl cotransport and reveal a complete phosphatidylinositol cycle in low K sheep erythrocytes*. J Membr Biol, 2000. **177**(1): p. 81-93.
200. Romero, P.J. and E.A. Romero, *Effect of cell ageing on Ca²⁺ influx into human red cells*. Cell Calcium, 1999. **26**(3-4): p. 131-7.
201. Egee, S., et al., *A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite Plasmodium falciparum*. J Physiol, 2002. **542**(Pt 3): p. 795-801.
202. Baskurt, O.K., M. Uyuklu, and H.J. Meiselman, *Protection of erythrocytes from sub-hemolytic mechanical damage by nitric oxide mediated inhibition of potassium leakage*. Biorheology, 2004. **41**(2): p. 79-89.
203. Davies, P.F., *Flow-mediated endothelial mechanotransduction*. Physiol Rev, 1995. **75**(3): p. 519-60.
204. Shyy, J.Y. and S. Chien, *Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress*. Circ Res, 2002. **91**(9): p. 769-75.
205. Gudi, S.R., C.B. Clark, and J.A. Frangos, *Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction*. Circ Res, 1996. **79**(4): p. 834-9.
206. Ayajiki, K., et al., *Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells*. Circ Res, 1996. **78**(5): p. 750-8.
207. Corson, M.A., et al., *Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress*. Circ Res, 1996. **79**(5): p. 984-91.
208. Kuchan, M.J., H. Jo, and J.A. Frangos, *Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells*. Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 1): p. C753-8.
209. Ranjan, V., Z. Xiao, and S.L. Diamond, *Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress*. Am J Physiol, 1995. **269**(2 Pt 2): p. H550-5.

210. Uematsu, M., et al., *Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 1): p. C1371-8.
211. Traub, O. and B.C. Berk, *Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(5): p. 677-85.
212. Ignarro, L.J., et al., *Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **34**(6): p. 879-86.
213. Calver, A., J. Collier, and P. Vallance, *Nitric oxide and cardiovascular control*. Exp Physiol, 1993. **78**(3): p. 303-26.
214. Moncada, S., *Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine*. J R Soc Med, 1999. **92**(4): p. 164-9.
215. Radegran, G. and B. Saltin, *Nitric oxide in the regulation of vasomotor tone in human skeletal muscle*. Am J Physiol, 1999. **276**(6 Pt 2): p. H1951-60.
216. Chien, S., S. Li, and Y.J. Shyy, *Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells*. Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 162-9.
217. Ziegler, T., et al., *Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces*. Hypertension, 1998. **32**(2): p. 351-5.
218. Laufs, U., et al., *Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription*. Circulation, 2000. **102**(25): p. 3104-10.
219. Abe, K., et al., *Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis*. Neurol Res, 1997. **19**(2): p. 124-8.
220. Fleming, I. and R. Busse, *Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **284**(1): p. R1-12.
221. Varin, R., et al., *Exercise improves flow-mediated vasodilatation of skeletal muscle arteries in rats with chronic heart failure. Role of nitric oxide, prostanoids, and oxidant stress*. Circulation, 1999. **99**(22): p. 2951-7.
222. Jeon, B.H., et al., *Effect of high blood flow on the expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rats with femoral arteriovenous shunts*. Endothelium, 2000. **7**(4): p. 243-52.
223. Laughlin, M.H., et al., *Training induces nonuniform increases in eNOS content along the coronary arterial tree*. J Appl Physiol, 2001. **90**(2): p. 501-10.

224. Miyauchi, T., et al., *Exercise causes a tissue-specific change of NO production in the kidney and lung*. J Appl Physiol, 2003. **94**(1): p. 60-8.
225. Sprague, R.S., et al., *Extracellular ATP signaling in the rabbit lung: erythrocytes as determinants of vascular resistance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H693-700.
226. Shiva, S., et al., *Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration*. Circ Res, 2007. **100**(5): p. 654-61.
227. Horiuchi, T., et al., *Analysis of purine- and pyrimidine-induced vascular responses in the isolated rat cerebral arteriole*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(2): p. H767-76.
228. Windscheif, U., et al., *Vasoconstrictor and vasodilator responses to various agonists in the rat perfused mesenteric arterial bed: selective inhibition by PPADS of contractions mediated via P2x-purinoreceptors*. Br J Pharmacol, 1994. **113**(3): p. 1015-21.
229. Kuchan, M.J. and J.A. Frangos, *Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells*. Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 1): p. C628-36.
230. Donato, A.J., L.A. Lesniewski, and M.D. Delp, *Ageing and exercise training alter adrenergic vasomotor responses of rat skeletal muscle arterioles*. J Physiol, 2007. **579**(Pt 1): p. 115-25.
231. Kim-Shapiro, D.B., et al., *How do red blood cells dilate blood vessels?--Reply*. Circ Res, 2004. **95**(3): p. e10.
232. Namgung, B., et al., *Effect of cell-free layer variation on arteriolar wall shear stress*. Ann Biomed Eng, 2011. **39**(1): p. 359-66.
233. Chen, K., R.N. Pittman, and A.S. Popel, *Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(7): p. 1185-98.
234. Chen, K., R.N. Pittman, and A.S. Popel, *Vascular smooth muscle NO exposure from intraerythrocytic SNOHb: a mathematical model*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(8): p. 1097-110.
235. Butler, A.R., I.L. Megson, and P.G. Wright, *Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1425**(1): p. 168-76.

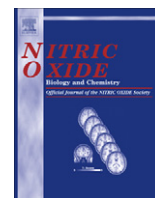
236. Thomas, D.D., et al., *The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 355-60.
237. Chen, K. and A.S. Popel, *Nitric oxide production pathways in erythrocytes and plasma*. Biorheology, 2009. **46**(2): p. 107-19.
238. Liu, X., et al., *Estimation of nitric oxide concentration in blood for different rates of generation. Evidence that intravascular nitric oxide levels are too low to exert physiological effects*. J Biol Chem, 2007. **282**(12): p. 8831-6.
239. Edmunds, N.J., S. Moncada, and J.M. Marshall, *Does nitric oxide allow endothelial cells to sense hypoxia and mediate hypoxic vasodilatation? In vivo and in vitro studies*. J Physiol, 2003. **546**(Pt 2): p. 521-7.
240. Marshall, J.M., *Adenosine and muscle vasodilatation in acute systemic hypoxia*. Acta Physiol Scand, 2000. **168**(4): p. 561-73.
241. Frisbee, J.C., et al., *Integration of hypoxic dilation signaling pathways for skeletal muscle resistance arteries*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **283**(2): p. R309-19.
242. Frisbee, J.C., et al., *Altered mechanisms underlying hypoxic dilation of skeletal muscle resistance arteries of hypertensive versus normotensive Dahl rats*. Microcirculation, 2001. **8**(2): p. 115-27.
243. Gow, A.J., et al., *The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9027-32.
244. Crawford, J.H., C.R. White, and R.P. Patel, *Vasoactivity of S-nitrosohemoglobin: role of oxygen, heme, and NO oxidation states*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4408-15.
245. Tsai, E.J. and D.A. Kass, *Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics*. Pharmacol Ther, 2009. **122**(3): p. 216-38.
246. Mingone, C.J., et al., *Hypoxia enhances a cGMP-independent nitric oxide relaxing mechanism in pulmonary arteries*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(2): p. L296-304.
247. Sipkema, P., et al., *Does the endothelium play a role in flow-dependent constriction? A study in the isolated rabbit femoral artery*. Blood Vessels, 1989. **26**(6): p. 368-76.
248. Bevan, J.A. and E.H. Joyce, *Saline infusion into lumen of resistance artery and small vein causes contraction*. Am J Physiol, 1990. **259**(1 Pt 2): p. H23-8.

249. Xie, H., I. Laher, and J.A. Bevan, *Intracellular Ca²⁺ release in flow-induced contraction of venous smooth muscle*. Hypertension, 1995. **26**(6 Pt 2): p. 1051-5.
250. Toth, P., et al., *Treatment with the cytochrome P450 omega-hydroxylase inhibitor HET0016 attenuates cerebrovascular inflammation, oxidative stress and improves vasomotor function in spontaneously hypertensive rats*. Br J Pharmacol, 2012.
251. Toth, P., et al., *Isolated human and rat cerebral arteries constrict to increases in flow: role of 20-HETE and TP receptors*. J Cereb Blood Flow Metab, 2011. **31**(10): p. 2096-105.
252. Civelek, M., et al., *Smooth muscle cells contract in response to fluid flow via a Ca²⁺-independent signaling mechanism*. J Appl Physiol, 2002. **93**(6): p. 1907-17.
253. Tada, S. and J.M. Tarbell, *Interstitial flow through the internal elastic lamina affects shear stress on arterial smooth muscle cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(5): p. H1589-97.
254. Rizzo, V., *Enhanced interstitial flow as a contributing factor in neointima formation: (shear) stressing vascular wall cell types other than the endothelium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(4): p. H1196-7.
255. Tarbell, J.M., *Mass transport in arteries and the localization of atherosclerosis*. Annu Rev Biomed Eng, 2003. **5**: p. 79-118.

ÖZGEÇMİŞ

04.09.1981 yılında Antalya’da dünyaya gelen Pınar ÜLKER KARADAMAR, ilk orta ve lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. 1999 yılında Karatay Lisesinden mezun oldu ve Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitime başladı. 2004 yılında lisans diplomasını alıp aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. 2007 yılında aynı bölümde doktora programına başladı. Ulaş KARADAMAR ile evli ve bir çocuk sahibi olan Pınar ÜLKER KARADAMAR, halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

EK



Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells

Pinar Ulker^a, Nazmi Yaras^b, Ozlem Yalcin^c, Ciler Celik-Ozenci^d, Paul C. Johnson^c, Herbert J. Meiselman^e, Oguz K. Baskurt^{f,*}

^a Department of Physiology, Akdeniz University, Faculty of Medicine, Antalya, Turkey

^b Department of Biophysics, Akdeniz University, Faculty of Medicine, Antalya, Turkey

^c Department of Bioengineering, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA

^d Department of Histology and Embryology, Akdeniz University, Faculty of Medicine, Antalya, Turkey

^e Department of Physiology and Biophysics, University of Southern California, Keck School of Medicine, Los Angeles, CA, USA

^f Koc University School of Medicine, Sariyer, Istanbul, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 November 2010

Revised 2 March 2011

Available online 17 March 2011

Keywords:

Nitric oxide synthase

Erythrocyte

Shear stress

Activation

Intracellular calcium

ABSTRACT

Red blood cells (RBC) play an important role in the balance between generation and scavenging of nitric oxide (NO) and hence its local bioavailability and influence on vasomotor control. Previous studies have reported increased NO levels in RBC suspensions subsequent to exposure to shear forces; the present study was designed to further investigate changes in intracellular NO concentration and possible mechanisms involved for RBC exposed to well-controlled shear forces. Attached human RBC were subjected to shear stresses up to 0.1 Pa in a parallel-plate flow channel; fluorescent methods were used to monitor changes in intracellular NO and calcium concentrations. Intracellular NO concentration, estimated by the fluorescence level of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM), increased sharply within 30 s following the application of shear stress between 0.013 and 0.1 Pa. This increase was only partially prevented by the absence of L-arginine and by the presence of L-N-acetyl-methyl-arginine (L-NAME), strongly suggesting that this response was in part related to the activation of NO-synthase (NOS) enzyme. The increase in intracellular NO concentration under shear stress was also inhibited by calcium chelation in the suspending medium, indicating the role of calcium entry for NOS activation. Increases of intracellular calcium concentrations under the same shearing conditions were demonstrated by monitoring Fluo-3/AM fluorescence in RBC exposed to shear stress. Serine 1177 phosphorylated NOS protein, the activated form of the enzyme determined by immunohistochemistry, was found to be significantly increased following the exposure of RBC to 0.1 Pa shear stress for 1 min. These data confirm that RBC possess a NOS enzyme that is actively synthesizing NO and activated by effective shear forces. The data also suggest that there may be additional (e.g., non-enzymatic) NO generating mechanisms in RBC that are also enhanced under shear stress.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

An important role has been attributed to red blood cells (RBC) in the critical balance between the generation and scavenging of nitric oxide (NO) which determines its local bioavailability and influences vasomotor control [1,2]. Earlier concepts were mainly based on the very potent NO scavenging ability of hemoglobin [1,3], while further reports introduced RBC as a source of NO [4–6]. Hemoglobin is thus central to mechanisms affecting NO release from RBC such as: (1) binding of NO to oxyhemoglobin in the form

of S-nitrosohemoglobin with NO released when hemoglobin is deoxygenated in tissues with lower oxygen partial pressure [4,7]; (2) reduction of nitrite by hemoglobin [8]. Additionally, enzymatic mechanisms actively synthesizing NO using L-arginine as substrate were found to exist in RBC [9].

Kleimborgard et al. studied the properties of RBC NO synthase (NOS) in detail and reported the following features [9]: (1) RBC NOS is immunoreactive with endothelial NOS (eNOS), but not with inducible (iNOS) or neuronal (nNOS) isoforms. RBC NOS is mainly located on the cytoplasmic leaflet of RBC membrane. (2) RBC NOS uses L-arginine as substrate to generate NO and L-citrullin with the activity dependent on the availability of L-arginine. (3) RBC NOS has a comparable activity to eNOS (0.3 versus 0.7 pmol/pg/min, respectively as determined by the rate of conversion of

* Corresponding author. Address: Koc University School of Medicine, Rumelifeneri yolu, Sariyer, Istanbul 34450, Turkey. Fax: +90 212 3381168.

E-mail address: obaskurt@ku.edu.tr (O.K. Baskurt).

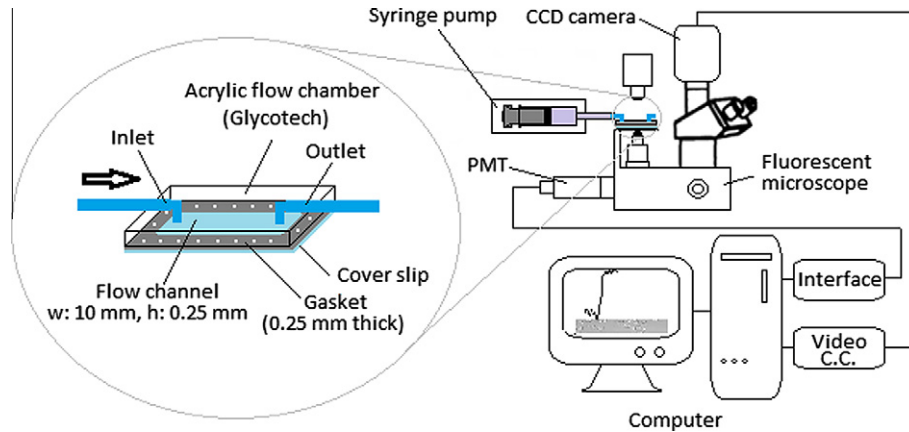


Fig. 1. Experimental setup.

L-arginine to L-citrullin in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). (4) RBC NOS activity is controlled by phosphorylation of the protein at various sites (e.g., phosphorylation of serine at the position 1177 enhances activity). (5) RBC NOS activity is inhibited by non-specific NOS inhibitors. (6) Extracellular calcium plays an important role in the regulation of RCB NOS activity. These features thus indicate a close similarity between RBC NOS and eNOS.

NO generation in RBC has been demonstrated to be influenced by various factors *ex vivo*, including insulin [9] and acetylcholine [10]. Based on the similarities to eNOS, RBC NOS was hypothesized to be regulated by shear forces affecting RBC [11,12]. Fischer et al. demonstrated that immunostaining specific to eNOS in RBC was enhanced in blood samples obtained following exposure to extracorporeal circulation during cardiac surgery [13]. Ulker et al. exposed RBC to 2 Pa shear stress by continuous pumping of suspensions through a 1.2 mm diameter glass tube [14]. Immunostaining specific to serine-1177 phosphorylated eNOS was significantly enhanced after 15 min of pumping, while non-phosphorylated eNOS immunostaining remained unchanged. NO concentrations measured by an electrochemical probe in RBC suspensions were also enhanced following the exposure of RBC to 2 Pa shear stress [14]. Increased NO concentration in RBC suspensions filtered through 5 μ m pores also provided evidence for role of shear forces in the regulation of NO-generating mechanisms of RBC [15].

The present study was designed to further evaluate the hypothesized role of shear forces in the regulation of RBC NO-synthesizing activity. RBC were exposed to well-defined shear stresses in a flow channel while intracellular NO and calcium concentrations were monitored using appropriate fluorescent probes.

Experimental procedures

Blood samples and preparation of red blood cell suspensions

Venous blood samples were obtained from healthy human male volunteers and anticoagulated with sodium heparin (15 IU/ml). Sampling protocols were approved by local ethical committees and performed following oral informed consent of the volunteers. Leukocytes were removed by centrifuging 4 ml of blood through 2 ml of polysucrose (60 g/l) and sodium diatrizoate (167 g/l) solution (Histopaque 1119, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in a 10 ml polypropylene tube at 700 g for 30 min. The RBC pellet was washed three times with calcium- and magnesium-free phosphate buffered saline (PBS, 290 mOsm/kg, pH = 7.4). All procedures were

conducted at room temperature (20 ± 2 °C), unless otherwise indicated.

RBC suspensions used for monitoring changes in intracellular NO concentration were prepared using washed RBC re-suspended in PBS at a hematocrit of 0.01 l/l. The suspensions were incubated at 37 °C with 4 μ M 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA) for 60 min, then washed three times with PBS following which they were re-suspended in PBS and incubated for 30 min to allow de-esterification of DAF-FM. L-arginine (1 mM) was added to the suspensions prior to the last incubation step (i.e., 30 min de-esterification) unless otherwise stated. For some experiments L-N-acetyl-methyl-arginine (L-NAME, 1 mM) was added to the L-arginine containing suspensions. Based upon the nature of the experimental protocol, calcium chloride (1 mM) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 4 mM) were also added to the PBS used for washing and re-suspending RBC.

RBC used for monitoring intracellular calcium changes in response to shear stress were washed with a HEPES buffer (125 mmol/l NaCl, 3 mmol/l KCl, 1 mmol/l $MgCl_2$, 2 mmol/l $CaCl_2$, 16 mmol/l HEPES, 1.2 mmol/l sodium phosphate, and 10 mmol/l glucose, pH 7.4) then re-suspended in this buffer at a hematocrit of 0.002%. Fluo-3/AM (F1241, Invitrogen, Carlsbad CA, USA) dissolved at 2 mM in dimethyl sulfoxide was added to the RBC suspensions to obtain 3 μ M and the suspensions incubated with mild shaking for 1 h at 37 °C. RBC were washed three times with PBS following the incubation period and then re-suspended in PBS at 0.01 l/l hematocrit.

Exposure of red blood cells to shear stress

RBC were exposed to various levels of shear stress in a rectangular flow chamber (Glycotech Co., Gaithersburg, MD, USA) having a 25×75 mm² cover slip as the bottom surface (Fig. 1). A 0.25 mm thick silicone rubber gasket separated the acrylic body of the chamber from the cover slip and a rectangular cutout area of the gasket formed the flow channel. The cover slip was firmly affixed by applying a continuous vacuum to special holes near the outer edges of the gasket. The dimensions of the formed flow channel were 60 mm (length) $\times$ 10 mm (width) $\times$ 0.25 mm (height).

In order to promote attachment of RBC to the cover slip they were pre-coated with poly-L-lysine by immersing them into a solution of 0.001% poly-L-lysine followed by drying at room temperature. RBC suspensions were introduced into the flow chamber very slowly and gently in order to prevent any activation by shear stress during the loading process. RBC were allowed to settle onto the pre-coated cover slip surface for 5 min following which

unattached RBC were gently washed out using PBS containing 4 mM EDTA or 1 mM calcium chloride.

Shear stress was applied to the RBC by pumping PBS through the flow channel at a volumetric flow rate Q calculated as

$$Q = \tau a^2 b / 6\mu \quad (1)$$

where τ is shear stress, a is the height of flow channel, b is channel width and μ is the viscosity of the flowing medium. A syringe pump (New Era Pump Systems, Wantagh, NY, USA) was used to generate the required volumetric flow rates. PBS with calcium (1 mM) or EDTA (4 mM) with no added calcium was used for perfusion of the flow chamber.

Monitoring changes in intracellular nitric oxide concentration

The flow chamber was placed on a fluorometric system consisting of an inverted fluorescent microscope (IX71, Olympus, Japan) equipped with a photomultiplier tube fluorometric system (Ionoptix Inc., USA) (Fig. 1). Fluorescent benzotriazole generated by the reaction of DAF-FM with nitrous anhydride [16] was excited with a xenon lamp centered at 490 nm and the emitted fluorescence was recorded at wavelengths of 510–550 nm. Emitted light was recorded from a given population of RBC in a selected microscopic field (~25–40 RBC per field) at a sampling rate of 1 Hz; alterations in the fluorescence intensity were considered to reflect changes in intracellular NO concentration.

Monitoring changes in intracellular calcium concentration

The flow chamber as described above was mounted on the stage of an intravital fluorescent microscope (Olympus-BX51WI, Olympus USA) equipped with an Olympus $\times 40$ (NA = 0.8) water immersion objective, a mercury arc lamp (100 W, Walker Instruments, Scottsdale, AZ) for epi-illumination and a rotatable turret with a filter (excitation: 450–490 nm; emission 515 nm) [17]. Fluorescent images were obtained with a Stanford Photonics video camera (XR/MEGA-10Z, Stanford Photonics Inc., Palo Alto, CA).

Individual RBC were selected on the basis of their clear visibility with an average of 4 RBC per slide used for analysis in each experimental condition. Fluorescent images of 4 separate slides with attached RBC were recorded for 30 s without applied shear stress and used to calculate the control (baseline) level. Subsequently, a shear stress of 0.1 Pa was applied to the slides for 60 s, followed by a 30 s period of video recording without stress. Fluorescence levels for each RBC were analyzed separately for alterations of fluorescence using 2.4.8 Piper Control Software (Stanford Photonics Inc., Palo Alto, CA). Results are expressed as the percentage change in the level of fluorescence following the shear stress relative to the pre-stress level. In order to correct for photobleaching, a total of 15 cells were illuminated without applied stress and the change in fluorescence monitored using the protocol described above; measurements of fluorescence following shear stress application were corrected using these results.

Immunofluorescence microscopy for serine-1177 phosphorylated eNOS

Cover slips with attached RBC were removed from the bottom of flow chambers following exposure to 0.1 Pa shear stress for 60 s as described above, air-dried for 30 min, then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature for an additional 30 min. After several washings in PBS, the cover slips were incubated for 1.5 h in PBS containing 3% bovine serum albumin to block nonspecific binding and 0.05% Tween 20 for permeabilization of RBC membranes. RBC were immuno-labeled with primary

polyclonal rabbit antibodies against serine-1177 phosphorylated eNOS, Ser1177P-eNOS (Cell Signaling, Boston, USA) at a 1:10 dilution for 3 h. The cover slips were then washed with PBS and incubated with an anti-rabbit FITC-conjugated secondary antibody for Ser1177P-eNOS (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) for 1 h. The slips were mounted in a fluorescent mounting medium (Vector Laboratories, Peterborough, Cambridgeshire, UK) and examined with a fluorescent microscope (Olympus AX70). Pictures were taken with a CCD camera and processed by Olympus DP controller program version 3.2.1.276 (Olympus USA).

In order to determine Ser1177P-eNOS cellular distribution on each slip the intensity of immunoreactivity was evaluated semi-quantitatively. RBC were grouped and counted according to the following categories of their staining: (a) none; (b) moderate; (c) intense. The percentage of RBC for each intensity level was determined by two investigators who were blinded to the identity of the cells and the average was used for data analysis.

Data presentation and statistics

The results are presented as mean $\pm$ standard error (SE). Student's t -test was used for comparisons between two experimental groups and one-way ANOVA followed by Dunnett's or Newman-Keuls post tests was used for comparisons between multiple groups.

Results

Change in intracellular NO concentration

Fig. 2 presents results from a typical experiment using RBC loaded with L-arginine and DAF-FM to monitor intracellular NO concentration; the suspending medium contained 1 mM calcium. Panel A represents the time course of fluorescence recorded from a cell population of ~50 RBC attached to the surface of cover slip; panels B and C show micrographs of the cells at rest and during application of 0.1 Pa shear stress. The fluorescence of the cells subjected to stress is expressed relative to the mean fluorescence intensity from the same cells when not exposed to shear stress. Application of 0.1 Pa shear stress resulted in elongation of RBC in the direction of flow (panel C) and a sharp increase in fluorescence level which reached about 4% within ~30 s after the start of flow. During continuation of flow there was a further but slower and less pronounced trend of fluorescence increase. Following the removal of shear stress the level of fluorescence began to decrease (panel A). It is important to note that when no shear stress was applied to a similar population of DAF-FM loaded RBC there were no significant alterations of fluorescence level during the 600 s period of observation (panel A, No SS).

In a series of 8 experiments, the mean increase in fluorescence at 60 s after the start of shear stress was $3.66 \pm 0.74\%$ and reached $4.91 \pm 0.81\%$ at 120 s, both increases being significant compared to the level prior to shear stress application ($p < 0.01$). If fluid flow was stopped after 120 s as shown in Fig. 2, fluorescence exhibited a slow decrease at a rate of $0.06 \pm 0.005\%/min$. However, if the shear stress of 0.1 Pa was maintained beyond 120 s the fluorescence level continued to increase (Fig. 3), reaching $15.3 \pm 1.9\%$ at 10 min ($p < 0.0001$; $n = 8$).

The magnitude of the applied shear stress was an important determinant of the change of RBC-NO related fluorescence. Fig. 4 presents increases of fluorescence when shear stress was varied over the range of 0.013–0.1 Pa and measured at 60 or 120 s following the start of flow. Fluorescence levels were found to be significantly enhanced over the entire range of applied shear stresses at either 60 or 120 s, although the differences became more obvious

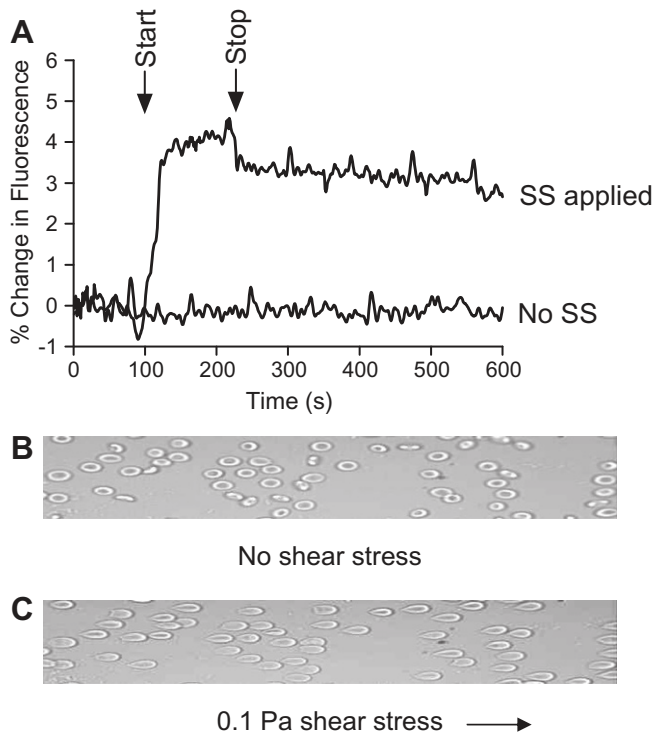


Fig. 2. Fluorescence level related to the reaction of DAF-FM with NO derivatives in RBC pre-loaded with L-arginine and exposed to 0.1 Pa shear stress (panel A, SS applied). The first vertical arrow marks the start of shear stress application (i.e., flow) and the second indicates flow stoppage. The lower panels are phase-contrast microscopic images of the RBC population from which fluorescence was recorded prior to the application of shear stress (B) and during application of shear stress (C). The horizontal arrow indicates the direction of flow. Panel A also shows the fluorescence level recorded from a similar RBC population without applying shear stress (No SS).

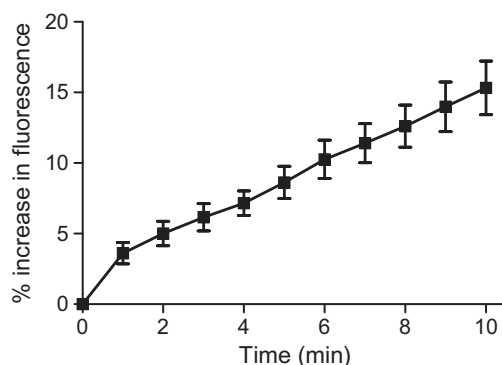


Fig. 3. Percentage increase of NO concentration-related fluorescence of RBC exposed to 0.1 Pa shear stress as a function of time. RBC were pre-incubated with 1 mM L-arginine and the suspensions contained 1 mM calcium. Data are presented as mean $\pm$ SE, $n = 8$. Changes in fluorescence were statistically significant starting at 60 s after the start of application of shear stress ($p < 0.01$).

at 120 s. Furthermore, the changes in fluorescence for various levels of shear stress were significantly different from each other when compared at 120 s, but at 60 s only 0.013 and 0.1 Pa differed significantly (Fig. 4).

The increase in fluorescence due to shear stress was found to be influenced by L-arginine. The change in fluorescence at 60 s under 0.1 Pa shear stress was $1.62 \pm 0.39\%$ if RBC were not pre-incubated with 1 mM L-arginine and thus significantly less than the $3.66 \pm 0.74\%$ when cells were pre-incubated with this agent

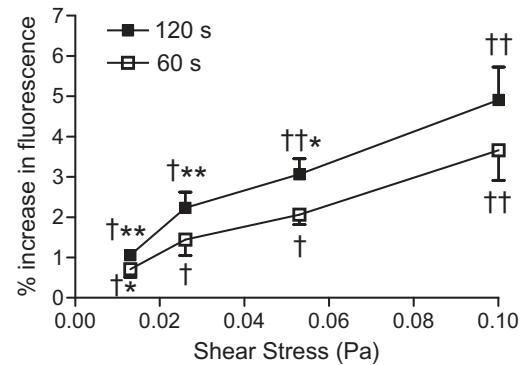


Fig. 4. Percentage increase of NO concentration-related fluorescence of RBC exposed to various levels of shear stress in the presence of 1 mM L-arginine and 1 mM calcium 60 and 120 s after the start of shear stress. †, ††: Difference from pre-stress (zero) level ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). *, **: Difference from experiments with 0.1 Pa shear stress ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively); $n = 4$ for all experiments.

(Fig. 5A, $p < 0.05$, $n = 6$). Including L-NAME in the RBC suspension during pre-incubation also blunted the change in fluorescence, reducing it to $1.46 \pm 0.32\%$ (Fig. 5B, $p < 0.05$, $n = 6$).

Role of calcium in increased intracellular nitric oxide generation

Experiments were repeated in the presence or absence of extracellular calcium (Fig. 6). Inclusion of 4 mM EDTA without added calcium in the suspending medium caused a marked decrease in fluorescence (i.e., $0.83 \pm 0.26\%$), nearly to one-fourth of that for cells suspended in 1 mM calcium (Fig. 6, $p < 0.01$). In Fig. 6 results for both types of experiments used cells loaded with L-arginine and DAF-FM, shear stress was 0.1 Pa and fluorescence was measured at 60 s. Further experiments designed to evaluate the effect of calcium entry into RBC under the same shearing conditions indicated that the fluorescence in Fluo-3 loaded RBC increased $23.6 \pm 2.5\%$ following 60 s exposure to 0.1 Pa shear stress, thereby indicating increased intracellular calcium concentration (Fig. 7). Inclusion of EDTA without added calcium totally inhibited this increase.

Phosphorylation of red blood cell NOS under shear stress

Fig. 8A–D present fluorescent microscopic images of RBC immunostained with serine 1177 phosphorylated eNOS antibodies, with a semiquantitative analysis of such images presented in Fig. 8E. Fig. 8A and B are the control experiments prior to the application of shear stress with the flow chamber filled with either calcium-containing PBS (A) or EDTA-containing, calcium free PBS (B). Fig. 8C shows RBC exposed to 0.1 Pa fluid shear stress for 60 s in a medium containing 1 mM calcium; under these conditions $44.3 \pm 5.3\%$ of the RBC were intensely immunostained while $53.0 \pm 3.1\%$ were moderately immunostained. Fig. 8D also shows RBC exposed to 0.1 Pa for 60 s but in a calcium-free medium containing EDTA: only $5.3 \pm 8.7\%$ of the RBC were intensely immunostained while $58.0 \pm 1.2\%$ remained unstained.

Discussion

Activation of RBC NOS by shear stress has been previously demonstrated by increased levels of serine 1177 phosphorylated eNOS (i.e., the activated form of the enzyme protein [18,19]), accompanied by increased extracellular NO concentrations measured electrochemically in RBC suspensions [14]. The present study provides further evidence for increased intracellular NO concentration in RBC subjected to fluid shear stress as monitored using the

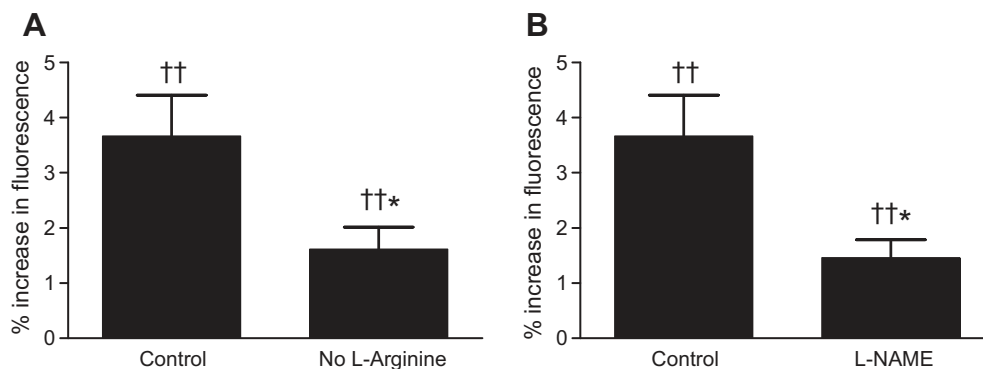


Fig. 5. Percentage increase in RBC NO concentration-related fluorescence at 60 s for cells exposed to 0.1 Pa. Panel A: Without added L-arginine, Panel B: in the presence of 1 mM L-NAME. In each panel the control column represents experiments on RBC pre-loaded with 1 mM L-arginine. RBC used in experiments with L-NAME were also pre-loaded with L-arginine. ††: Difference from pre-stress (zero) level ($p < 0.01$). *: Difference from control ($p < 0.05$). $n = 6$ for both types of experiments.

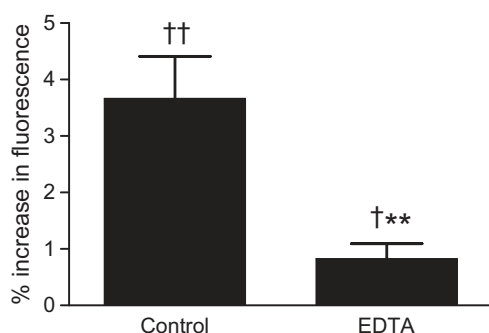


Fig. 6. Percentage increase in RBC NO concentration-related fluorescence at 60 s for cells exposed to 0.1 Pa in suspensions containing EDTA without calcium, compared to those containing 1 mM calcium, but no EDTA. †, ††: Difference from pre-stress (zero) level ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). **: Difference from control ($p < 0.01$). $n = 6$.

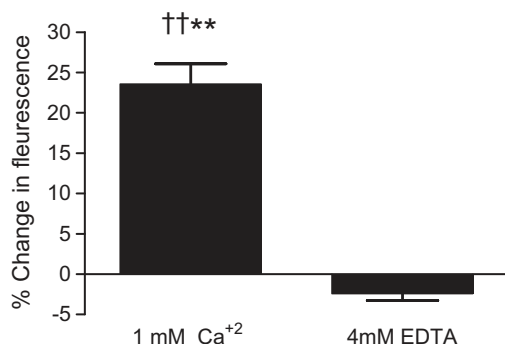


Fig. 7. Change in intracellular calcium concentration related fluorescence in Fluo-3 loaded RBC (0.1 Pa, 60 s) in the presence of 1 mM calcium or 4 mM EDTA in the suspending medium ($n = 15$). ††: Difference from pre-stress (zero) level ($p < 0.01$). **: Difference from EDTA containing suspension ($p < 0.01$). The presence of 4 mM EDTA totally inhibited the response.

NO-specific fluorescent probe DAF-FM [16,20]. Intracellular NO concentrations, as reflected by the level of DAF-FM related fluorescence, exhibited a rapid increase reaching a steady level within 30 s (Fig. 2); the fluorescence level continued to increase as long as shear stress was maintained (Fig. 3).

DAF-FM is one of the most successful probes for evaluating intracellular NO; the diacetate form (DAF-FM DA) is membrane

permeable and remains non-fluorescent until it is de-esterified and nitrosylated by oxidation products of NO [16,21]. However, these reactions are sensitive to the initial oxidation of DAF-FM to an aniliny radical (i.e., one-electron oxidation) in addition to NO oxidation, thus making the process susceptible to the oxidative status of the measurement environment (e.g., RBC cytosol) and hence making it difficult to obtain quantitative data using these probes [22]. Autooxidation of DAF-FM may be another potential artifact, with this process influenced by oxidants such as superoxide and peroxy radicals, yet such interference has not been considered a major obstacle in using DAF-FM as a probe specific to NO [21].

NO scavengers (e.g., reduced hemoglobin) have been used under various conditions to test the specificity of measured fluorescence to the presence of NO [23]. This approach was not applicable to the experimental model used herein since all measurements were conducted in the presence of a powerful NO scavenger (i.e., reduced hemoglobin in the cytoplasm of RBC). We thus accepted that the baseline level of fluorescence reflected the basal NO availability and that the subsequent alterations of fluorescence indicated changes of intracellular NO concentration. This assumption should be especially valid for monitoring fluorescence under our standardized conditions: the environment was unaltered during monitoring DAF-FM related fluorescence except for the application of SS which is expected to induce NO generation.

It should also be noted that the DAF-FM reaction with NO is not readily reversible [22], and therefore the fluorescence monitored throughout the experiment cannot reflect instantaneous changes in intracellular NO concentration. Accordingly, the continued increase of fluorescence during prolonged exposure (i.e., >60 s) to constant shear stress may not mean that NOS activity also gradually increases during this period, but rather may reflect an intracellular accumulation of fluorescent DAF derivatives together with continued NOS activity at an elevated but steady level. Similar patterns of DAF-related fluorescence with induced NOS activity have been reported for other cell types [23–25].

The level of fluorescence at a given time point is determined by the balance between the formation rate of fluorescent benzotriazole by DAF-FM reacting with NO or its derivatives versus the loss of fluorescence due to photobleaching [16]. However, prominent changes in fluorescence were not observed in RBC in the absence of shear stress (Fig. 2A, No SS), suggesting that no significant photobleaching occurs under “no flow” conditions. The decreased level of fluorescence following stoppage of flow (Fig. 2A) could thus reflect a combination of factors including de-activation of NOS enzyme due to the absence of shear stress, depletion of L-arginine supply in RBC due to enhanced NOS activity and photobleaching of the fluorescent products of DAF-FM; the latter possibility might

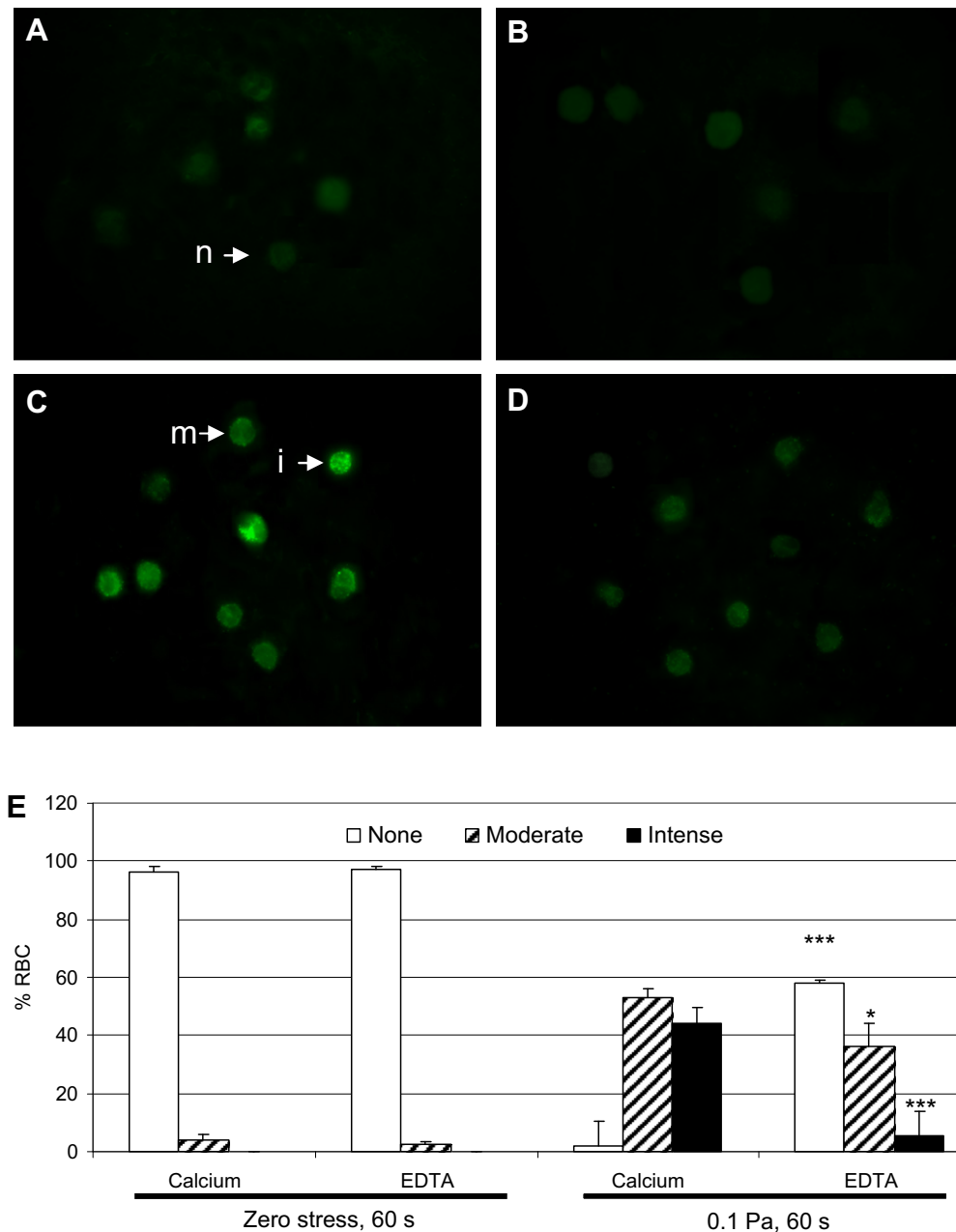


Fig. 8. Serine 1177 phosphorylated eNOS immunofluorescent staining. (A) RBC in PBS containing 1 mM calcium and not exposed to shear stress. (B) RBC in PBS containing 4 mM EDTA (i.e., no calcium) and not exposed to shear stress. (C) RBC exposed to 0.1 Pa shear stress in the presence of 1 mM calcium. (D) RBC exposed to shear stress in PBS containing 4 mM EDTA (i.e., no calcium). (E) semiquantitative evaluation of immunostaining of RBC. Immunostaining levels where *n* = none, *m* = moderate, *i* = intense. In panel E “Calcium” indicates the presence of 1 mM calcium and “EDTA” indicates the presence of 4 mM EDTA with no added calcium. Data are mean $\pm$ standard error of three experiments. *,***: Difference from corresponding bar for “Calcium” ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively).

occur more efficiently due to the enhanced formation of these products with shear stress. Due to the possible contribution of various factors to the fluorescence intensity at a given time point it is not possible to exactly determine the time course of RBC NOS activity based on the DAF-FM related fluorescence during prolonged exposure to stress. Therefore, fluorescence levels measured at 60 s after the application of shear stress were used as the primary indicator of NOS activity for the experiments presented in Figs. 5 and 6.

A relation between the observed increase in DAF-FM related fluorescence, intracellular NO concentration and the activation of NOS under shear stress is supported by the following findings: (1) The response to shear stress was significantly diminished if

RBC were not pre-loaded with L-arginine, although such RBC were still responsive to stress at a reduced level (Fig. 5A). This remaining activity might be due to the basal levels of L-arginine in RBC, or may suggest alternative mechanisms of generating NO that are stimulated by shear stress. (2) The response to stress was also significantly blunted in the presence of L-NAME which is an L-arginine analog and a competitive inhibitor of NOS, but again there was a remaining response to shear stress in terms of increased intracellular NO concentration (Fig. 5B). Although the concentration of L-NAME used in the experiments corresponds to that previously demonstrated to be maximally effective in RBC [26], the incomplete inhibition of the response to shear stress may reflect an insufficient L-NAME level due to enhanced NOS activity. (3) The

increase in intracellular NO concentration was accompanied by enhanced levels of serine 1177 phosphorylated eNOS levels in RBC exposed to stress.

Another finding of the present study supporting the NOS-related mechanism of increased intracellular NO concentration is the dependence of the response on calcium entry into the RBC under stress. Chelating extracellular calcium by EDTA significantly inhibited the response although it did not totally prevent the increase of intracellular NO (Fig. 6); the remaining degree of activation following the chelation of extracellular calcium may represent the non-calcium dependent pathway of NOS activation [12,19]. The residual response after the removal of extracellular calcium may also indicate alternative mechanisms (e.g., non-enzymatic generation of NO) by shear stress. This finding thus strongly suggests that the NO response is accompanied by calcium entry into RBC; calcium entry under the same experimental conditions has also been confirmed in a separate series of experiments (Fig. 7). Note that previous studies have shown that stress induces calcium influx into endothelial cells [27] and human red blood cells [28].

It has been well documented that enhancement of eNOS activity in endothelial cells depends on changes in intracellular calcium concentration [12,19]. Non-activated eNOS is bound to caveolin-1 on the cytoplasmic side of the membrane and calmodulin cannot bind to the enzyme protein at low intracellular calcium concentrations [29]. An increase in intracellular calcium induces the binding of the calcium-calmodulin complex to the eNOS protein leading to its detachment from caveola and activation [29]. However, it has been reported that the time course of the change in intracellular calcium concentration and eNOS activation may not always follow the same pattern, especially in the case of stimulation by shear stress [19]. This temporal discrepancy between the two physiological events is explained by alternative mechanisms including the phosphorylation of eNOS protein which leads to activation [19]. This activation pathway includes serine kinases (Akt and protein kinase A); their activation in turn is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase [19]. A similar mechanism of activation has been postulated to exist in RBC, although this has not yet been experimentally confirmed [12].

It should be noted that the shear stress regime utilized in this study differed from previous experiments in which relations between shear stress and RBC NOS activation were investigated [14,15]. In the present investigation a given stress level was continuously applied during an experiment, whereas previously stresses of 0.5–2 Pa could not be held constant due to the experimental system: RBC in suspension were exposed to stress only during passage through a glass tube for 18 s at 0.5 Pa, for 9 s at 1 Pa or for 4.5 s at 2 Pa [14]. In these prior studies application of 0.5 and 1 Pa SS did not increase NO concentration in the RBC suspensions whereas an increase was noted at 2 Pa. This difference suggests that exposure time, as well as stress level, are determinants of NOS activation. Interestingly, exposure of RBC to stress levels as high as 110 Pa for very short periods (i.e., several milliseconds) during filtration through 5 μ m diameter by 11 μ m long pores also resulted in enhancement of NO concentration in RBC suspensions [15]. Therefore, data obtained using different experimental systems suggest that activation of RBC NOS may be induced by a variety of shear stress magnitude-exposure time combinations. The experimental design of the current studies was not suitable to test a wide range of stress due to detachment of RBC from the bottom plate of the flow chamber at stresses above 0.1 Pa. Further experiments are therefore needed to clarify how the specific details of applied shear stress (e.g., flow pattern, strength, exposure time) influence RBC NOS activation.

The magnitude of stress used in the present study was about 10 times lower than wall shear stress levels reported for various parts of the circulatory system [30–33]. However, the reported range for

wall stress may not be relevant for all RBC within a flowing suspension since cells tend to move towards the axis of a tube or vessel and thus undergo inward radial migration [34]. Since the shear stress is smaller near the center of a tube, the magnitude of shear stress used in this study may represent a physiologically relevant level.

It has been argued that RBC have a dual role in tissue oxygenation: in addition to their well-known oxygen carrier function, RBC may contribute to the regulation of local blood flow with NO playing a central role in this process [35]. NO synthesized by RBC NOS activity has been hypothesized to contribute to the RBC-originated NO pool, although Chen et al. reported that the amount of NO generated by RBC NOS may not represent a physiologically important fraction of total NO bioavailability at vascular wall [36]. Experimental studies directly exploring the contribution of the enzymatic generation of NO by RBC to local vasomotor control do not yet exist. However, NO synthesis by RBC should still be considered an important factor contributing to local hemodynamics, since it has been shown that NO generated by RBC is a regulator of RBC deformability [9,26,36,37]. The relatively fast increase in intracellular NO concentration at physiological levels of shear stress would be expected to improve RBC deformability and blood flow accordingly, especially at the microcirculatory level.

Acknowledgments

The authors thank to Dr. Pedro Cabrales for his valuable contributions during experimental design. Supported by NIH Research Grants HL 015722, HL 070595 and HL 090511 (H.J.M.) and R01-HL 52684 (P.C.J.) and by the Akdeniz University Research Projects Unit (O.K.B.).

References

- [1] J.D. Imig, D. Gebremedhin, D.R. Harder, R.J. Roman, Modulation of vascular tone in renal microcirculation by erythrocytes – role of EDRF, *Am. J. Physiol.* 264 (1993) H190–H195.
- [2] J.C. Liao, T.W. Hein, M.W. Vaughn, K.T. Huang, L. Kuo, Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 8757–8761.
- [3] I. Azarov, K.T. Huang, S. Basu, M.T. Gladwin, N. Hogg, D.B. Kim-Shapiro, Nitric oxide scavenging by red blood cells as a function of hematocrit and oxygenation, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 39024–39032.
- [4] L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura, J.S. Stamler, S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control, *Nature* 380 (1996) 221–226.
- [5] J.R. Pawloski, D.T. Hess, J.S. Stamler, Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity, *Nature* 409 (2001) 622–626.
- [6] J.S. Stamler, L. Jia, J.P. Eu, T.J. McMahon, I.T. Demchenko, J. Bonaventura, K. Gernert, C.A. Piantadosi, Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient, *Science* 276 (1997) 2034–2037.
- [7] B.W. Allen, C.A. Piantadosi, How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO-hemoglobin paradigm, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291 (2006) H1507–H1512.
- [8] R. Grubina, Z. Huang, S. Shiva, M.S. Joshi, I. Azarov, S. Basu, L.A. Ringwood, A. Jiang, N. Hogg, D.B. Kim-Shapiro, M.T. Gladwin, Concerted nitric oxide formation and release from the simultaneous reactions of nitrite with deoxy- and oxyhemoglobin, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12916–12927.
- [9] P. Kleinbongard, R. Schutz, T. Rassaf, T. Lauer, A. Dejam, T. Jax, I. Kumara, P. Gharini, S. Kabanova, B. Ozuyaman, H.G. Schnurch, A. Godecke, A.A. Weber, M. Robenek, H. Robenek, W. Bloch, P. Rosen, M. Kelm, Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase, *Blood* 107 (2006) 2943–2951.
- [10] F.A. Carvalho, R. Mesquita, J. Martins-Silva, C. Saldanha, Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels, *J. Appl. Toxicol.* 24 (2004) 419–427.
- [11] N.N. Barvitenko, N.C. Adragna, R.E. Weber, Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance, *Cell. Physiol. Biochem.* 15 (2005) 1–18.
- [12] B. Ozuyaman, M. Grau, M. Kelm, M.W. Merx, P. Kleinbongard, RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects, *Trends Mol. Med.* 14 (2008) 314–322.
- [13] U.M. Fischer, R. Schindler, K. Brixius, U. Mehlhorn, W. Bloch, Extracorporeal circulation activates endothelial nitric oxide synthase in erythrocytes, *Ann. Thorac. Surg.* 84 (2007) 2000–2003.

- [14] P. Ulker, L. Sati, C. Celik-Ozenci, H.J. Meiselman, O.K. Baskurt, Mechanical stimulation of nitric oxide synthesizing mechanisms in erythrocytes, *Biorheology* 46 (2009) 121–132.
- [15] P. Ulker, H.J. Meiselman, O.K. Baskurt, Nitric oxide generation in red blood cells induced by mechanical stress, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 45 (2010) 169–175.
- [16] H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, T. Nagano, Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2446–2453.
- [17] L. Yang, D.A. Andrews, P.S. Low, Lypophosphatidic acid opens a Ca^{++} channel in human erythrocytes, *Blood* 95 (2000) 2420–2425.
- [18] S. Dimmeler, I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, A.M. Zeiher, Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation, *Nature* 399 (1999) 601.
- [19] I. Fleming, R. Busse, Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284 (2003) R1–12.
- [20] H. Kojima, Y. Urano, K. Kikuchi, et al., Fluorescent indicators for imaging NO production, *Angew. Chem. Int. Edit.* 38 (1999) 3209–3212.
- [21] A. Balcerczyk, M. Soszynski, G. Bartosz, On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide, *Free Radic. Biol. Med.* 39 (2005) 327–335.
- [22] P. Wardman, Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 995–1022.
- [23] P.G. Gunasekar, A.G. Kanthasamy, J.L. Borowitz, G.E. Isom, Monitoring intracellular nitric oxide formation by dichlorofluorescein in neuronal cells, *J. Neurosci. Methods* 61 (1995) 15–21.
- [24] A. Imrich, L. Kobzik, Fluorescence-based measurement of nitric oxide synthase activity in activated rat macrophages using dichlorofluorescein, *Nitric Oxide Biol. Chem.* 1 (1997) 359–369.
- [25] J.G. McGarry, P. Maguire, V.A. Campbell, B.C. O'Connell, P.J. Prendergast, S.P. Jarvis, Stimulation of nitric oxide mechanotransduction in single osteoblasts using atomic force microscopy, *J. Orthop. Res.* 26 (2008) 513–521.
- [26] M. Bor-Kucukatay, R.B. Wenby, H.J. Meiselman, O.K. Baskurt, Effects of nitric oxide on red blood cell deformability, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284 (2003) H1577–H1584.
- [27] J. Hoyer, R. Kohler, A. Distler, Mechanosensitive Ca^{2+} oscillations and STOC activation in endothelial cells, *FASEB J.* 12 (1988) 359–366.
- [28] F.L. Larsen, S. Katz, B.D. Roufogalis, D.E. Brooks, Physiological shear stresses enhance the Ca^{2+} permeability of human erythrocytes, *Nature* 294 (1981) 667–668.
- [29] O. Feron, F. Saldana, J.B. Michel, T. Michel, The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3125–3128.
- [30] J.M. Greve, A.S. Les, B.T. Tang, M.T. Draney Blomme, N.M. Wilson, R.L. Dalman, N.J. Pelc, C.A. Taylor, Allometric scaling of wall shear stress from mice to humans: quantification using cine phase-contrast MRI and computational fluid dynamics, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291 (2006) H1700–H1708.
- [31] T. Nagaoka, A. Yoshida, Noninvasive evaluation of wall shear stress on retinal microcirculation in humans, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (2006) 1113–1119.
- [32] R.S. Reneman, T. Arts, A.P.G. Hoeks, Wall shear stress - an important determinant of endothelial cell function and structure in the arterial system in vivo, *J. Vasc. Res.* 43 (2006) 251–269.
- [33] G.W. Schmid-Schonbein, Biomechanics of microcirculatory blood perfusion, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 1 (1999) 73–102.
- [34] H.L. Goldsmith, G.R. Cokelet, P. Gaetgens, Robin Fahraeus: evolution of his concepts in cardiovascular physiology, *Am. J. Physiol.* 257 (1989) H1005–H1015.
- [35] F.B. Jensen, The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: oxygen carriers and regulators of local blood flow, *J. Exp. Biol.* 212 (2009) 3387–3393.
- [36] K.J. Chen, R.N. Pittman, A.S. Popel, Hemorrhagic shock and nitric oxide release from erythrocytic nitric oxide synthase: a quantitative analysis, *Microvasc. Res.* 78 (2009) 107–118.
- [37] M. Bor-Kucukatay, O. Yalcin, O. Gokalp, D. Kipmen-Korgun, A. Yesilkaya, A. Baykal, M. Ispir, U.K. Senturk, I. Kaputlu, O.K. Baskurt, Red blood cell rheological alterations in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 22 (2000) 267–275.

Mechanical stimulation of nitric oxide synthesizing mechanisms in erythrocytes *

P. Ulker^a, L. Sati^b, C. Celik-Ozenci^b, H.J. Meiselman^c and O.K. Baskurt^{a,**}

^a *Department of Physiology, Akdeniz University Faculty of Medicine, Antalya, Turkey*

^b *Department of Histology and Embryology, Akdeniz University Faculty of Medicine, Antalya, Turkey*

^c *Department of Physiology and Biophysics, Keck School of Medicine, Los Angeles, CA, USA*

Received 1 December 2008

Accepted in revised form 30 March 2009

Abstract. It has been previously demonstrated that red blood cells (RBC) possess functional nitric oxide (NO) synthesizing mechanisms. RBC are also equipped with variety of intracellular control mechanisms, and respond to mechanical forces and to various biological stimuli by increased release of ATP. Nitric oxide has also been demonstrated to be released from RBC under certain circumstances, and it has been hypothesized that NO synthase (NOS), which is located in both the RBC membrane and cytoplasm, might be activated by mechanical factors. The present study aimed at investigating NOS activation and NO export induced by mechanical stress applied to RBC in suspension. Heparinized venous blood samples were obtained from healthy, adult volunteers and their hematocrit adjusted to 0.4 l/l. The RBC suspensions were equilibrated at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with either room air or made hypoxic (36 mmHg, $\sim 70\%$ saturation) using moisturized 100% nitrogen. The samples were then continuously pumped through a glass tube (diameter = 0.06 cm; length = 33 cm) for 30 min using a dual syringe pump to maintain a wall shear stress of 0.5–2 Pa with NO concentrations in the RBC suspensions measured electrochemically. NO concentration significantly increased under the influence of 2 Pa in hypoxic RBC suspensions: 105.0 ± 14.2 nM to 127.1 ± 12.0 nM as the peak value at 20 min of perfusion. No increase was observed at lower levels of shear stress. Plasma nitrite/nitrate concentrations were measured in samples obtained at five minute intervals. Application of fluid shear stress to hypoxic RBC suspensions resulted in a significant, time-dependent increase of plasma nitrite/nitrate levels, reaching to 14.7 ± 1.5 μM from a control value of 11.2 ± 1.3 μM . The presence of the non-specific NOS inhibitor L-NAME (10^{-3} M) prevented this increment. Additionally, both eNOS and serine 1177 phosphorylated eNOS immuno-fluorescence staining in RBC cytoplasm were shown to increase in response to applied shear stress. Our results support the hypothesis that RBC NO synthase is activated and that export of NO from RBC is enhanced by mechanical stress.

Keywords: Shear stress, red blood cell NOS, nitric oxide, L-NAME, NOS activation

1. Introduction

Nitric oxide (NO) is a very important biomolecule with a rapidly broadening spectrum of functions. One such function is signaling in the vascular system as a significant factor for vasomotor control. The

* This article is based on a paper given by Dr O.K. Baskurt in Symposium 29 at the 13th International Congress of Biorheology and the 6th International Conference of Clinical Hemorheology at the Pennsylvania State University, State College, PA, USA, July 9–14, 2008.

** Address for correspondence: Dr Oguz K. Baskurt, Department of Physiology, Akdeniz University, Faculty of Medicine, Antalya, Turkey. Tel.: +90 242 310 1560; Fax: +90 242 310 1561; E-mail: baskurt@akdeniz.edu.tr.

classical pathway for this function includes [19]: (1) Generation of NO in endothelial cells in response to mediators and shear forces; (2) Diffusion of NO to vascular smooth muscle; (3) Activation of guanylate cyclase and increasing cyclic GMP level, leading to relaxation of smooth muscle tonus.

NO generated in endothelium also diffuses to the blood vessel lumen and interacts with blood cells, including red blood cells (RBC). Hemoglobin is a potent scavenger of NO, and RBC are regarded as important regulators of NO bioavailability in the vasculature [20,25]. The effective level of NO in a vascular region is thus determined by the delicate balance between release and scavenging of this molecule. It has been clearly shown that endothelial cells are not the only source of NO in the vascular system, since it has been demonstrated that RBC may release NO under appropriate conditions; RBC therefore play a dual role in maintaining the balance that determines NO bioavailability.

The early concept of RBC as a source of NO is based on its binding with hemoglobin to form S-nitrosohemoglobin which can then be released and diffuse out of the cell to contribute to the local NO bioactivity [21,30]. However, recent studies have revealed that RBC also possess active NO generating mechanisms. These mechanisms include the non-enzymatic generation of NO by nitrite reduction by hemoglobin [16], and the enzymatic pathway using L-arginine which is the classical substrate of NO synthesizing enzymes in other tissues (e.g., endothelial cells) [23]. NO synthesized in RBC plays a role in maintaining the normal mechanical properties of these cells [7] and is also exported from RBC [23].

RBC NOS seems to have common properties with eNOS [29]: (1) Its activity strongly depends on L-arginine presence, and RBC are equipped with cationic amino acid transporter 1 (CAT 1) to carry L-arginine into cytoplasm; (2) The activity of RBC NOS also depends on intracellular calcium concentrations, being activated with increased levels; (3) Phosphorylation of NOS protein at the serine 1177 position is associated with activation; (4) RBC NOS has been proposed to be stimulated by acetylcholine based on experiments indicating increased NO metabolites and increased deformability under the influence of this mediator.

RBC NOS mainly remains bound to the cell membrane in close association with caveolin-1 and flottilin proteins and is inactive in this bound form [29]. Increased intracellular calcium concentration interferes with this association through calmodulin binding, and NOS becomes activated; its activity may also be affected by phosphorylation of NOS at various domains as regulated by phosphatidylinositol-3 kinase [10,23]. In calcium-containing media, exposure of RBC to mechanical shearing may increase their intracellular calcium concentration and trigger the above mentioned regulatory mechanisms. Therefore, the shear stress to which RBC are exposed has been hypothesized to be a control factor for RBC NOS activity [4]. Recently, Fischer et al., reported that eNOS immuno-staining in RBC was significantly increased following exposure to extracorporeal circulation in patients undergoing cardiac surgery [12]. This observation is most likely related to the activation mechanisms briefly discussed above. That is, when the NOS protein becomes detached from the membrane it becomes activated and immuno-stainable [23]. Therefore, these findings support the hypothesis regarding activation of the RBC NOS enzyme by subjecting cells to altered mechanical factors such as those occurring in extracorporeal circulation.

The present study was designed to investigate the following hypothesis under well controlled shearing conditions: (1) RBC NOS activity is enhanced with exposure to increased shear stress. (2) NO generated in RBC exposed to shear stress can be exported from the cell.

2. Materials and methods

2.1. Blood samples and preparation of RBC suspensions

Venous blood samples were obtained from healthy, human male volunteers, aged between 25 and 52 years, and anticoagulated with EDTA (1.5 mg/ml). Leukocytes were removed by centrifuging 20 ml of blood through 20 ml of polysucrose (60 g/l) and sodium diatrizoate (167 g/l) solution (Histopaque 1119; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in a 50 ml polypropylene tube at 700g for 30 min. The RBC pellet was washed three times with calcium- and magnesium-free phosphate buffered saline (PBS, 0.01 M mixed phosphate plus NaCl without glucose, 290 mOsm/kg, pH = 7.4) and re-suspended in the same medium at a hematocrit of 0.4 l/l. L-Arginine was added to all RBC suspensions at a concentration of 1 mM and incubated for 30 min at 37°C.

RBC suspensions were either oxygenated or made hypoxic by equilibration with ambient air or 100% nitrogen at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) using a microfiber array gas exchanger (Model OX, Living Systems, Inc., Burlington, OH, USA). During this process RBC suspensions were pumped through the gas exchanger for 15 min at a flow rate of 4.8 ml/min using a syringe pump (Model NE1000, New Era Pump Systems Inc., Wantagh, NY, USA) run in cycles of infusion-withdrawal during the 15 min period. Ambient air or 100% nitrogen was fed to the gas chamber of the exchanger, with ambient air pumped through a filter (Whatman GF, 25 mm) and nitrogen supplied from a gas cylinder. Both air and nitrogen were moisturized by bubbling through distilled water prior to entering the gas exchanger. The oxygen partial pressure ($p\text{O}_2$) of oxygenated and hypoxic RBC suspensions were 150.4 ± 1.8 mmHg ($\sim 99\%$ saturation) and 36.4 ± 1.2 mmHg ($\sim 70\%$ saturation) respectively; gas tensions were determined using a blood gas analyzer (Stat Profile[®] Critical Care Xpress, Nova Biomedical, USA). Following the 15 min period of equilibration with air or nitrogen the RBC suspensions were utilized for the shear stress studies. All experiments described below were completed within four hours after the sampling of blood.

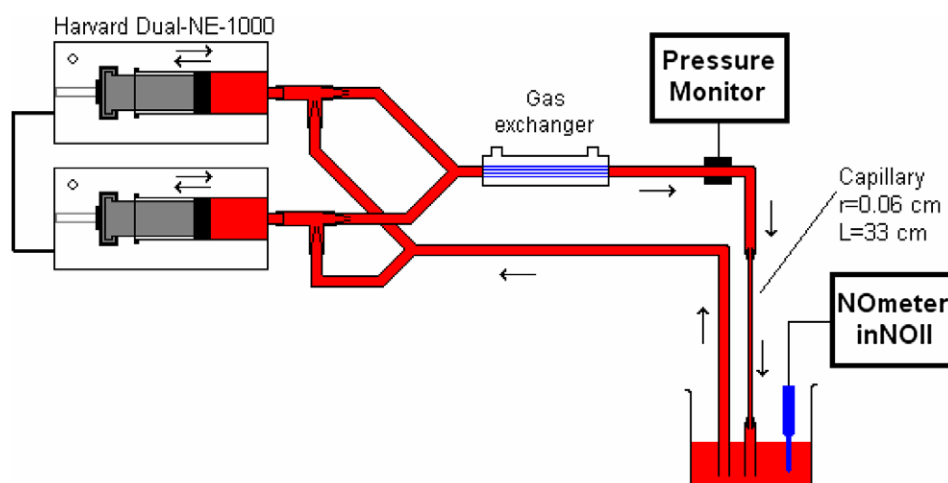


Fig. 1. Flow system.

2.2. Study design

RBC suspensions were exposed to mechanical stress (i.e., fluid shear stress) in a specially designed flow system (see below) at levels controlled by varying the flow rate through the tube. Three types of experiments were conducted.

2.2.1. Shear stress effects: oxygenated versus hypoxic RBC suspensions

In one series of experiments the flow rate was selected to generate a wall shear stress of 2.0 Pa and flow of the RBC suspension was continued for 30 min. NO concentration in the RBC suspension during flow was continuously monitored in the reservoir using a NO probe and recorded by a digital computer. The RBC suspension was also sampled at 5 min intervals (1 ml at each sampling) for measurements of nitrite/nitrate concentrations. These experiments were conducted in two separate series using oxygenated and hypoxic RBC suspensions. In these experiments, expressions of eNOS and serine 1177 phosphorylated eNOS (Ser1177P-eNOS) in RBC were investigated using immune-fluorescence microscopy as detailed below.

2.2.2. L-NAME effects

The effects of non-specific NOS inhibitor N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; N-5751, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) at a concentration of 10^{-3} M on RBC NO generation was tested in a separate series using hypoxic RBC suspensions.

2.2.3. Shear stress levels

Another series of experiments investigated the effects of various levels of wall shear stress between 0 and 1.0 Pa for hypoxic RBC suspensions.

2.3. Flow system

The flow system (Fig. 1) consisted of a cylindrical glass tube (radius = 0.06 cm, length = 33 cm), a pair of synchronized syringe pumps operating in a reciprocal manner, and a blood reservoir; the syringe pumps (Model DUAL-NE1000, New Era Pump Systems Inc. Wantagh, NY, USA) were arranged to generate continuous flow into the tube during pumping. A pressure transducer was used to monitor pressure at the upstream end of the capillary. A gas exchanger was placed in the circuit just prior to the capillary to maintain the oxygenated or hypoxic state of the RBC suspension. As employed for the initial equilibration of the suspensions, ambient air or 100% nitrogen was fed to the gas chamber of the exchanger, with ambient air pumped through a filter and nitrogen supplied from a gas cylinder; both air and nitrogen were moisturized by bubbling through distilled water prior to entering the gas exchanger.

Twenty ml of RBC suspension was used to fill the circuit and reservoir; the reservoir was covered with a plastic sheet and an appropriate gas flow of ambient air or 100% nitrogen into the reservoir was maintained through out an experiment. The reservoir contained a small stir bar and was placed on a magnetic stirrer for continuous, gentle mixing to avoid RBC sedimentation. The elements of the flow circuit were connected to each other with 2 mm ID plastic tubing and tube lengths were kept as short as possible. The glass capillary was mounted vertically and directly connected to the reservoir with a ~2 cm long section of the 2 mm tubing.

Flow rates calculated to yield nominal wall shear stress levels of 0.5, 1.0 and 2.0 Pa were employed. These shear stresses were calculated based upon the geometry of the tube, the measured viscosity of the 0.40 l/l hematocrit suspensions (4.0 ± 0.3 mPa s, mean $\pm$ SD at 750 s^{-1} determined using a cone-plate viscometer) and the wall shear stress equation [31]. Measured pressure differences were used to

confirm wall shear stress during perfusion of the glass capillary [22]. The measured pressure at the inlet of the glass tube during experiments using 2 Pa fluctuated between 15–18 mmHg and was thus slightly dependent on the phase of the pumping cycle; inlet pressures for lower shear stress exhibited similar percent variation about the mean. The glass tube was by-passed using a large bore plastic tube for “0 Pa” experiments; the pump was run at 1.25 ml/min and the measured pressure in the circuit was essentially zero. Hemolysis during 30 min of perfusion of the capillary did not exceed 1% in any of the experiments and was unaffected by the level of oxygenation (i.e., oxygenated or hypoxic).

The flow rates in the capillary ranged between 1.8 cm/s and 7.2 cm/s, corresponding to wall shear stresses of 0.5–2 Pa. The transit time of RBC through the capillary can be calculated as ~ 18 s to ~ 4.5 s respectively. It can thus be estimated that RBC reached the reservoir within 3 s after leaving the capillary.

A NO probe (amino-700; Innovative Instruments, Inc., Tampa, FL, USA) was inserted into the reservoir and connected to NOmeter (inNO-T-II, Innovative Instruments, Inc., Tampa, FL, USA) for continuous monitoring of NO concentrations. The NO measurement system was calibrated according to the manufacturer's specifications, using a standard nitrite solution added to an acidified solution containing iodide as reducing agent to generate a calculated amount of NO.

The entire system was enclosed in a temperature controlled box (dimensions: $0.7 \times 0.7 \times 0.7$ m) and maintained at 37°C throughout the experiments.

2.4. Nitrite/nitrate measurement

Nitrite/nitrate concentration was measured in the supernatant of RBC suspensions after centrifugation at 2,700 RPM for 6 min. The supernatant was passed through a filter with a 10 kDa cut-off by centrifugation at 14,000 RPM for 120 min. The filtrate was incubated with nitrate reductase and cofactor for 3 hours at room temperature to convert nitrate in the sample to nitrite. Total nitrite concentration, reflecting nitrate/nitrate concentration in the sample, was then calculated using absorbance measured at 540 nm after the reaction with Griess reagent. A commercial kit was used for nitrite/nitrate determination (780001, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA).

2.5. Immuno-fluorescence microscopy for eNOS and Ser1177P-eNOS

Cell smears were prepared using the RBC suspensions immediately after the experiments. After allowing them to air-dry for 30 min, RBC smears were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS at room temperature for 30 min. After several washing steps in PBS, the slides were incubated for 1.5 hours in PBS containing 3% bovine serum albumin (BSA) to block nonspecific binding and 0.05% Tween 20 for permeabilization of RBC membranes. RBC were immuno-labeled with primary polyclonal rabbit antibodies against eNOS (BD Transduction Labs, Lexington, KY) at a 1:100 dilution and against Ser1177P-eNOS (Cell Signaling, Boston, USA), which is a phosphorylated form of eNOS, at a 1:10 dilution for 3 hours. Cell smears were then washed with 0.1 M PBS and incubated with an anti-rabbit FITC-conjugated secondary antibody (Sigma Aldrich, Hamburg, Germany) for eNOS and for phosphorylated eNOS (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) for 1 hour. The slides were mounted in fluorescence mounting medium (Vector Laboratories, Peterborough, Cambridgeshire, UK) and examined with a fluorescence microscope (Olympus AX70); pictures were taken with a CCD camera and processed by an Olympus DP controller program version 3.2.1.276.

In order to evaluate eNOS and Ser1177P-eNOS distributions on each slide, the intensity of immuno-reactivity was evaluated semi-quantitatively: RBC were classified according to the following categories:

(a) no staining; (b) moderate staining; (c) intense staining. Percentage of RBC for each intensity level was determined by two investigators who were blinded to the identity of the slides and their average was used for data analysis.

2.6. Statistics

Data are presented as mean $\pm$ standard error. Statistical comparisons were made using one-way or two-way ANOVA for repeated measures followed by Dunnett or Bonferroni post tests, respectively.

3. Results

3.1. NO output from red blood cells in response to mechanical stress

NO concentrations measured electrochemically in RBC suspensions under control conditions without application of fluid shear stress were 105.0 ± 14.2 nM and 82.8 ± 12.5 nM in hypoxic and oxygenated RBC suspensions, respectively. Nitrite/nitrate concentrations in the suspending media were 11.2 ± 1.3 μ M and 9.5 ± 0.9 μ M in hypoxic and oxygenated suspensions, respectively. Figure 2 presents NO and nitrite/nitrate concentrations during the 30 min of flow through the system, at a calculated wall shear stress of 2.0 Pa, as the percentage of control values. When using hypoxic RBC suspensions, NO concentration was significantly increased after 15 min of shear stress compared to control (0 time) and remained at this level at 20 min (Fig. 2A). There was a subsequent decrease of NO concentration after 25 min and the values measured at 25 and 30 min were not significantly different from control. Nitrite/nitrate concentrations measured in the suspending medium were also found to be increased at and after 20 min of shear stress application and remained increased for the rest of the experiment (Fig. 2B). There were no significant alterations of NO or nitrite/nitrate concentrations with oxygenated RBC suspensions under the same conditions.

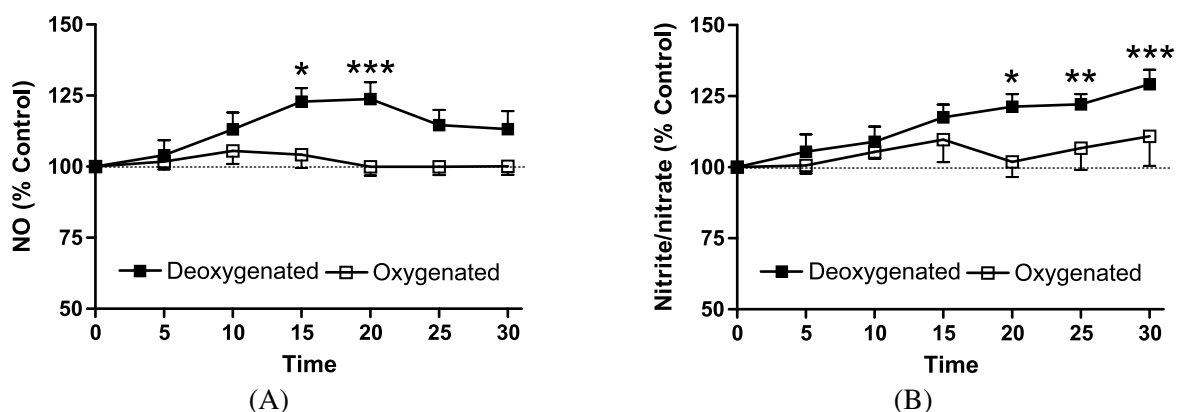


Fig. 2. Nitric oxide (NO) and nitrite/nitrate concentrations in RBC suspension medium during 30 min of flow at 2.0 Pa wall shear stress for hypoxic and oxygenated RBC suspensions; values are presented as percentage of control measured at the start of the experiment. (A) NO concentration in RBC suspensions. (B) Nitrite/nitrate concentration in the suspending medium. Data are presented as mean $\pm$ SE; $n = 5$ for both groups. Difference from Control (0 time): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2. Effect of NOS inhibition with L-NAME

Inclusion of L-NAME in non-sheared suspensions of hypoxic RBC significantly decreased the NO concentration to 39.5 ± 7.3 nM from the control level of 105.0 ± 14.2 nM. There was no further change in the NO concentration with time under shear in hypoxic L-NAME suspensions, unlike the findings under similar conditions without the presence of L-NAME (Fig. 3).

3.3. NO output at various levels of wall shear stress

There was no increase of NO concentration if the wall shear stresses were equal or less than 1.0 Pa (Fig. 4). Further, under zero shear stress conditions, NO concentrations were found to be decreased to about 80% of the starting value, with the change being significant after at 25 and 30 min.

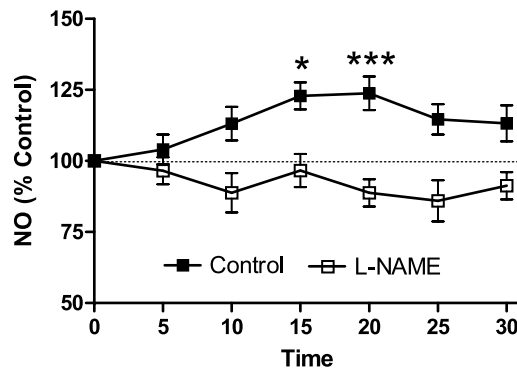


Fig. 3. Nitric oxide (NO) concentrations in hypoxic RBC suspensions during 30 min of flow at a shear stress of 2.0 Pa in the presence or absence of N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). The values are presented as percentage of control measured at the start of the experiment. Data are presented as mean $\pm$ SE; $n = 5$ for both groups. Difference from Control (0 time) value: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

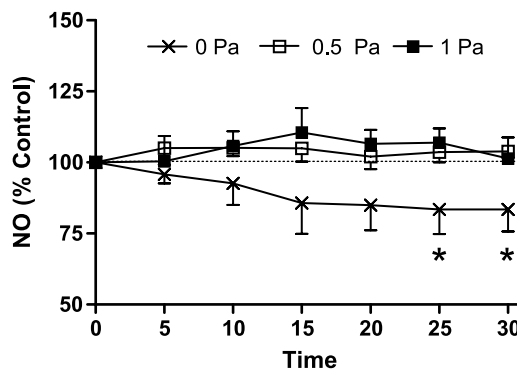


Fig. 4. Nitric oxide (NO) concentrations in hypoxic RBC suspensions during 30 min of flow at a wall shear stress of 0.5 or 1.0 Pa. The glass tube was bypassed by a large bore tube in the “zero Pa” experiment. Values are presented as percentage of control measured at the start of the experiment. Data are presented as mean $\pm$ SE; $n = 4$ for each experiment. Difference from Control (0 time): * $p < 0.05$.

3.4. eNOS and Ser1177P-eNOS expression in RBC

Under hypoxic conditions, immuno-fluorescence staining specific to eNOS and ser1177P-eNOS proteins were significantly enhanced after the exposure of RBC to 2.0 Pa wall shear stress. Figure 5 presents typical examples of eNOS and Ser1177P-eNOS staining; semi-quantitative analysis of immuno-fluorescent staining revealed significant increases both for eNOS (Fig. 6A) and for Ser1177P-eNOS (Fig. 6B) proteins.

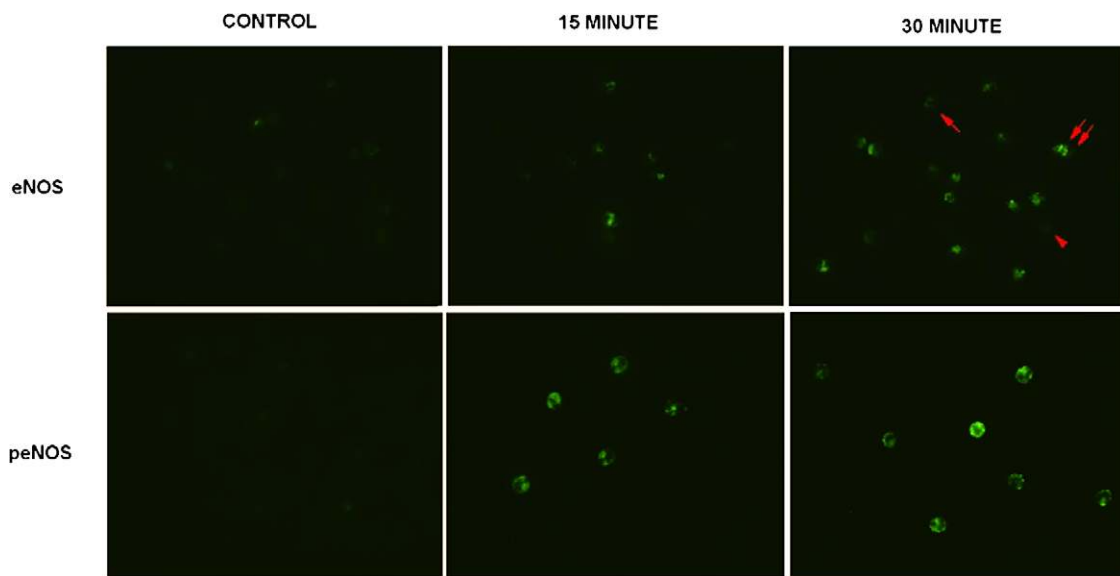


Fig. 5. Immuno-fluorescent staining of eNOS and ser1177P-eNOS (peNOS) proteins in RBC before (Control) and after being exposed to 2.0 Pa wall shear stress for 15 and 30 min, under hypoxic conditions. Arrowhead indicates no staining, whereas, arrow and double arrows indicate strength of the staining. (↑ – moderate staining; ↑↑ – intense staining). Data are presented as mean $\pm$ SE; $n = 5$ for both groups. Difference from Control (0 time): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

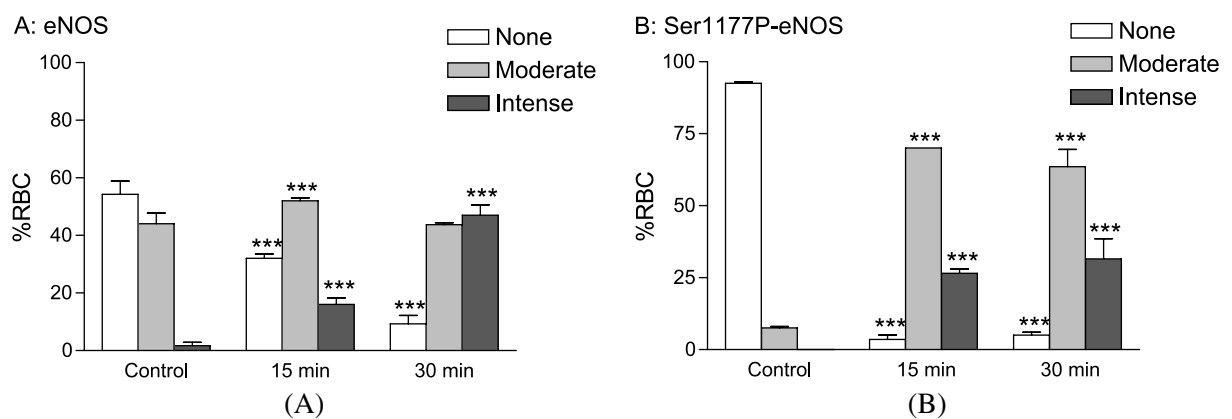


Fig. 6. Semi-quantitative analysis of eNOS and serine 1177 phosphorylated eNOS (Ser1177P-eNOS) immuno-fluorescent staining. Percentage of unstained, moderately stained and intensely stained red blood cells (RBC). Data are presented as mean $\pm$ SE; $n = 5$ for both groups. Difference from Control (0 time): ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4. Discussion

The results of this study demonstrate that eNOS and Ser1177P-eNOS immunostaining of RBC exposed to a fluid shear stress of 2.0 Pa for 15 min is increased compared to samples prior to this exposure, with a further increment during the following 15 min of flow. Increased immuno-staining in RBC of eNOS protein following the application of shear stress suggests the translocation of membrane-bound eNOS to the cytoplasm, which is known to be related to activation mediated by a calcium-calmodulin complex. Phosphorylation of eNOS at Serine 1177 position is also known to be associated with increased activity of this enzyme [10,23]. This increased activity of eNOS was accompanied by enhanced release of NO from the RBC as indicated by increased NO concentration in the RBC suspensions and increased nitrite/nitrate concentration in the suspending medium. The increase in NO export from RBC was inhibited in the presence of an L-arginine analog L-NAME, a non-specific competitive inhibitor of NOS.

Our findings confirm the observations of Kleinbongard et al. related to RBC eNOS activity and provide further evidence for the control of activity by mechanical stress [23]. They also confirm the report by Fischer et al., demonstrating a time-dependant increase in immuno-histochemical staining of eNOS in RBC exposed to extracorporeal circulation, with the increase related to its translocation and consequent activation [12]. Note that hemolysis in both the oxygenated and hypoxic RBC suspensions was negligible, consistent with the fact that the levels of shear stress utilized herein are far below the hemolytic threshold [5]. Thus, given the low and equal release of intracellular hemoglobin, it is appropriate to assume that increased NO and nitrite/nitrate concentrations relate to the export of NO from RBC.

The effect of shear stress on the expression and activity of eNOS is well documented [13,14,26,34]. This force acting parallel to the surface can be sensed by molecules on the endothelial cell surface and a variety of biomolecules have been identified as playing a role in this mechanotransduction [9, 27]. These biomolecules include receptor tyrosine kinase, G protein-coupled receptor and integrins [8], although other proteins (e.g., ion channels, intracellular junction proteins), membrane lipids and the glycocalyx have also been mentioned [9]. While the RBC intracellular control mechanisms which couple mechanical sensing and eNOS activity are not clearly known, RBC NOS has been demonstrated to have common features with endothelial NOS [29].

Interestingly, immunogold cryosections and freeze-fracture electron microscopy data indicate that eNOS is mainly expressed on the inner surface of the RBC membrane [23]. Calcium is accepted to play an important role in the activation of RBC NOS [29]. Intracellular calcium is normally maintained below 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ due to the activity of the calcium pump, with membrane-bound calcium about an order of magnitude higher than intracellular concentrations [28]. An increased calcium level is assumed to trigger calmodulin binding to NOS, leading to detachment from the membrane and activation [29]. Note that the experiments presented herein were conducted using RBC suspended in calcium-free phosphate buffered saline, and thus shear-modulated entry of extracellular calcium is not relevant; this situation thus leads to questioning the role of calcium entry in shear stress-induced activation of RBC NOS. However, other activation mechanisms of NOS are also likely, including serine-1177 phosphorylation mediated by PI3K which might occur independently from intracellular calcium increment [29]. Obviously, further investigation of the role of calcium in shear stress induced RBC NOS activation is important and should contribute to a more complete understanding of this mechanism.

The level of shear stress to which RBC were exposed was a critical factor for the activation of eNOS and increased export of NO. Lower levels of shear forces corresponding to 0.5 and 1.0 Pa did not induce any detectable alterations in NO export (Fig. 4), yet export is increased under shear forces of 2.0 Pa.

However, Fig. 4 also demonstrates that there was a gradual decrement in NO concentration in RBC suspensions under zero shear stress. This decreased concentration of NO during the 30 min period at zero shear stress might be related to a time-dependent decrease in L-arginine concentration. Thus any activation of eNOS at low stress (e.g., 0.5 or 1 Pa) may function only to maintain NO export at initial levels without a subsequent increase (Fig. 4). Conversely, at high shear the greater degree of activation of RBC NOS seems sufficient to offset the effect of decreased L-arginine, thereby yielding increased NO levels. It has also been demonstrated that the magnitude of shear stress applied to endothelial cells affects the level of the resulting alterations (e.g., activation of eNOS) [24]. Note that the shear stress levels used in this study are calculated for the tube wall and thus do not reflect the magnitude of shear forces to which each individual RBC was exposed during their flow history. Nevertheless, it can be reasonably argued that shear forces experienced by individual RBC should correlate with the applied wall shear stress.

An important finding of this study is that the shear stress-induced increment in NO export from RBC was only observed in the experiments with hypoxic suspensions and not in those fully-oxygenated. This finding might be initially surprising as it is well documented that eNOS synthesis of NO from L-arginine occurs via an oxygen-consuming pathway [1,33]. However, it should be noted that the pO_2 in hypoxic RBC suspensions used herein was ~ 36 mmHg ($\sim 70\%$ oxygen saturation), and thus the experiments with these suspensions do not correspond to anoxic conditions [1,33]. Furthermore, Vanin et al. have demonstrated that eNOS enzymatically converts nitrite to NO under anoxia [33]. However, a contribution of this mechanism to NO export during our experiments is unlikely as pO_2 was clearly not in anoxic range.

Alternatively, it has been demonstrated that eNOS activity might be enhanced under hypoxic conditions and, in endothelial cells, is related to increased cytosolic calcium [6,17]. The role of oxygen partial pressure observed herein might also be explained by the greater NO scavenging effect for oxyhemoglobin [3,15], and there is evidence that export of NO from RBC may be influenced by hemoglobin oxygenation through a mechanism mediated by band 3 [4,29]. Therefore, oxygenation of RBC may interfere with the availability of NO and its export from RBC rather than NO generation by eNOS. In addition, it is possible that activation of eNOS itself may be influenced by the oxygenation status of hemoglobin. Barvitenko et al. reviewed the role of hemoglobin oxygenation in a wide-variety of RBC functions including signal transduction pathways [4], but a specific role for oxygen in the transduction of mechanical stress has not been identified to date. Further experiments related to shear stress – eNOS activation relationships as a function of RBC oxygenation are warranted. Unfortunately, current literature information and our data do not allow a more comprehensive description of the relationship between oxygenation status, intracellular calcium concentrations and NOS activity in RBC.

In conclusion, this study provides direct evidence for shear stress-induced activation of RBC NOS and increased NO export from RBC. Although the experimental conditions in this study did not replicate the normal physiological state, our observations should have important implications. That is, RBC are a source of NO [2] in addition to being a sink for it [18], and this source makes an important contribution to the NO pool and plays a role in the critical balance determining the NO bioactivity, especially at the microcirculatory level. Therefore, activation of RBC NOS at the microcirculatory level to generate and export NO might represent a critical involvement of RBC in vasomotor control. Such a function has been hypothesized based on ATP release from RBC under the influence of mechanical forces [32], and the current study lends support for the role of RBC NOS as regulators of vascular tonus [11]. This function of RBC could be especially important under pathophysiological conditions involving increased mechanical forces on RBC (e.g., hypertension), with possible contributions to microcirculatory vasomotor control.

Further, NO originating from RBC may play an important role in vasculature with impaired endothelial functions (i.e., atherosclerotic regions) by an enhanced contribution to the local NO pool. If validated, these suggestions may open new areas for research such as novel therapeutic approaches [29].

Acknowledgement

This study was supported by NIH Research Grants HL15722, HL 70595 and HL 090511 and by the Akdeniz University Research Projects Unit.

References

- [1] H.M. Abu-Soud, K. Ichimori, A. Presta and D.J. Stuehr, Electron transfer, oxygen binding, and nitric oxide feedback inhibition in endothelial nitric-oxide synthase, *J. Biol. Chem.* **275** (2000), 17349–17357.
- [2] B.W. Allen and C.A. Piantadosi, How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO-hemoglobin paradigm, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291** (2006), H1507–H1512.
- [3] I. Azarov, K.T. Huang, S. Basu, M.T. Gladwin, N. Hogg and D.B. Kim-Shapiro, Nitric oxide scavenging by red blood cells as a function of hematocrit and oxygenation, *J. Biol. Chem.* **280** (2005), 39024–39032.
- [4] N.N. Barvitenko, N.C. Adragna and R.E. Weber, Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance, *Cell. Physiol. Biochem.* **15** (2005), 1–18.
- [5] O.K. Baskurt, M. Uyuklu and H.J. Meiselman, Protection of erythrocytes from sub-hemolytic mechanical damage by nitric oxide mediated inhibition of potassium leakage, *Biorheology* **41** (2004), 79–89.
- [6] B.B. Beleslin-Cokic, V.P. Cokic, X.B. Yu, B.B. Weksler, A.N. Schechter and C.T. Noguchi, Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells, *Blood* **104** (2004), 2073–2080.
- [7] M. Bor-Kucukatay, R.B. Wenby, H.J. Meiselman and O.K. Baskurt, Effects of nitric oxide on red blood cell deformability, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284** (2003), H1577–H1584.
- [8] S. Chien, Molecular basis of rheological modulation of endothelial functions: Importance of stress direction, *Biorheology* **43** (2006), 95–116.
- [9] S. Chien, Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: The wisdom of the cell, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292** (2007), H1209–H1224.
- [10] S. Dimmeler, I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann et al., Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation, *Nature* **399** (1999), 601.
- [11] M.L. Ellsworth, T. Forrester, C.G. Ellis and H.H. Dietrich, The erythrocyte as a regulator of vascular tone, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **269** (1995), H2155–H2161.
- [12] U.M. Fischer, R. Schindler, K. Brixius, U. Mehlhorn and W. Bloch, Extracorporeal circulation activates endothelial nitric oxide synthase in erythrocytes, *Ann. Thorac. Surg.* **84** (2007), 2000–2003.
- [13] B. Fisslthaler, S. Dimmeler, C. Hermann, R. Busse and I. Fleming, Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress, *Acta Physiol. Scand.* **168** (2000), 81–88.
- [14] I. Fleming and R. Busse, Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **284** (2003), R1–R12.
- [15] A.J. Gow, B.P. Luchsinger, J.R. Pawloski, D.J. Singel and J.S. Stamler, The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide, *PNAS USA* **96** (1999), 9027–9032.
- [16] R. Grubina, Z. Huang, S. Shiva, M.S. Joshi et al., Concerted nitric oxide formation and release from the simultaneous reactions of nitrite with deoxy- and oxyhemoglobin, *J. Biol. Chem.* **282** (2007), 12916–12927.
- [17] V. Hampl, D.N. Cornfield, N.J. Cowan and S.L. Archer, Hypoxia potentiates nitric-oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary-artery endothelial-cells, *Eur. Respir. J.* **8** (1995), 515–522.
- [18] K.-T. Huang, T.E. Han, D.R. Hyduke, M.W. Vaughn et al., Modulation of nitric oxide bioavailability by erythrocytes, *PNAS USA* **98** (2001), 11771–11776.
- [19] L.J. Ignarro, G. Cirino, A. Casini and C. Napoli, Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: An overview, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **34** (1999), 879–886.
- [20] J.D. Imig, D. Gebremedhin, D.R. Harder and R.J. Roman, Modulation of vascular tone in renal microcirculation by erythrocytes – Role of EDRF, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **264** (1993), H190–H195.
- [21] L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura and J.S. Stamler, S-nitrosohaemoglobin: A dynamic activity of blood involved in vascular control, *Nature* **380** (1996), 221–226.

- [22] D. Katritsis, L. Kaiktsis, A. Chaniotis, J. Pantos et al., Wall shear stress: Theoretical considerations and methods of measurements, *Prog. Cardiovasc. Dis.* **49** (2007), 307–329.
- [23] P. Kleinbongard, R. Schutz, T. Rassaf, T. Lauer et al., Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase, *Blood* **107** (2006), 2943–2951.
- [24] M.J. Kuchan and J.A. Frangos, Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **266** (1994), C628–C636.
- [25] J.C. Liao, T.W. Hein, M.W. Vaughn, K.T. Huang and L. Kuo, Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide, *PNAS USA* **96** (1999), 8757–8761.
- [26] P.F. Mount, B.E. Kemp and D.A. Power, Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **42** (2007), 271–279.
- [27] S. Muller, V. Labrador, N. Da Isla, D. Dumas, R. Sun, X. Wang, L. Wei, S. Fawzi-Grancher, W. Yang, M. Traore, C. Boura, D. Bensoussan, A. Elfaafari and J.-F. Stoltz, From hemorheology to vascular mechanobiology: An overview, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **30** (2004), 185–200.
- [28] S.N. Orlov, A.S. Shevchenko and Y.V. Postnov, Role of membrane-bound calcium in changes in Atpase activity, permeability, and structural state of the human erythrocyte-membrane, *Bull. Exp. Biol. Med.* **85** (1978), 745–748.
- [29] B. Ozuyaman, M. Grau, M. Kelm, M.W. Merx and P. Kleinbongard, RBC NOS: Regulatory mechanisms and therapeutic aspects, *Trends Mol. Med.* **14** (2008), 314–322.
- [30] J.R. Pawloski, D.T. Hess and J.S. Stamler, Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity, *Nature* **409** (2001), 622–626.
- [31] T.W. Secomb and A.R. Pries, Basic principles of hemodynamics, in: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, O.K. Baskurt, M.R. Hardeman, M.W. Rampling and H.J. Meiselman, eds, IOS Press, Amsterdam, 2007, pp. 289–306.
- [32] R.S. Sprague, M.L. Ellsworth, A.H. Stephenson, M.E. Kleinhenz and A.J. Lonigro, Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **275** (1998), H1726–H1732.
- [33] A.F. Vanin, L.M. Bevers, A. Slama-Schwok and E.E. van Faassen, Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia, *Cell. Mol. Life Sci.* **64** (2007), 96–102.
- [34] T. Ziegler, P. Silacci, V.J. Harrison and D. Hayoz, Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces, *Hypertension* **32** (1998), 351–355.