

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**SIÇAN İZOLE TORASİK AORTA PREPARATLARINDA
ASİTRETİNİN DAMAR GEVŞETİCİ ETKİ MEKANİZMASININ
ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

Oğuzhan Ekin EFE

DOKTORA TEZİ

ANKARA - 2020

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**SIÇAN İZOLE TORASİK AORTA PREPARATLARINDA
ASİTRETİNİN DAMAR GEVŞETİCİ ETKİ MEKANİZMASININ
ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

Oğuzhan Ekin EFE

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Tolga Reşat AYDOS

ANKARA - 2020

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Farmakoloji Anabilim Dalı Farmakoloji Doktora Programı çerçevesinde Oğuzhan Ekin Efe tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14 / 08 / 2020

Tez Adı: Sıçan İzole Torasik Aorta Preparatlarında Asitretinin Damar Gevşetici Etki Mekanizmasının Araştırılması

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Meral TUNCER, Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet MELLİ, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Alper B. İSKİT, Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Ş. Remzi ERDEM, Başkent Üniversitesi

Doç. Dr. Tolga R. AYDOS, Başkent Üniversitesi

ONAY

Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tarih:

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 24 / 07 / 2020

Öğrencinin Adı, Soyadı: Oğuzhan Ekin EFE

Öğrencinin Numarası: 21110108

Anabilim Dalı: Farmakoloji Anabilim Dalı

Programı: Farmakoloji Doktora Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Doç. Dr. Tolga Reşat AYDOS

Tez Başlığı: Sıçan izole torasik aorta preparatlarında asitretinin damar gevşetici etki mekanizmasının araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 48 sayfalık kısmına ilişkin, 24 / 07 / 2020 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 13'dür. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

Tarih: 24 / 07 / 2020

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

Doç. Dr. Tolga Reşat AYDOS

TEŞEKKÜR

Öncelikle gerek tez çalışmalarım gerekse tüm doktora eğitimim boyunca değerli bilgileriyle yoluma ışık tutan, bana farmakolojiyi sevdiren Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Meral Tuncer'e, çalışmalarım süresince beni destekleyen, uzun yıllardır eğitimci olarak desteğini aldığım ve bilgilerini benimle daima paylaşan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Tolga Reşat Aydos'a ve tez çalışmam süresince öneri ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Ş. Remzi Erdem'e, Prof. Dr. Alper B. İskit'e, Prof. Dr. Mehmet Melli'ye, Dr. Öğr. Üyesi Dr. Selda Emre Aydingöz'e, sevgili arkadaşım Araş. Gör. Dr. Karl Micheal Lux'a, laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı sevgili arkadaşım biyolog Seda Sevensan'a çok teşekkür ederim.

Deneylerin gerçekleştirilmesi aşamasında teknik destek sağlayan Lab. Vet. Teknik. Adem Kurtçuoğlu ve Lab. Vet. Teknik. Sezai Kölcük'e teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, daima desteklerini hissettiğim ve uzun yıllardır benimle yol arkadaşlığı yapan sevgili dostlarım, meslektaşım Elvan Hortaç İftar ve Mete İftar'a çok teşekkür ederim.

Desteğini esirgemeyen, uzun yıllardır aynı kurumda çalıştığım sevgili arkadaşım ve meslektaşım Pınar Ayran Fidan'a ve uzakta da olsa hep varlığını hissettiğim, kıdemlim ve sevgili meslektaşım Ulya Keskin'e çok teşekkür ederim.

İlk günden beri beni hep destekleyen, daima yanımda olmalarını istediğim, bana ikinci bir aile sıcaklığını veren sevgili A.Kadri Ergin ve Mihriban Ergin'e ve sevgili ablam ve abim Deniz-Ejder Çakmur'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Herşeyden önemlisi varlık sebebim olan, hayatta en değerli şeyin okumak ve sorumluluk taşımak olduğunu öğreten, her zaman desteklerini aldığım, insan sevgisini öğrendiğim ve doktorluk mesleğini seçmemde emeği olan, sevgilerini daima hissettiğim, onlarsız bir hayatı düşünemeyeceğim sevgili annem Ferda Efe, sevgili babam Osman Attila Efe ve anneannem (Ada'm) başta olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Biricik eşim EKİN'e.....

ÖZET

EFE OE. Sıçan İzole Torasik Aorta Preparatlarında Asitretinin Damar Gevşetici Etki Mekanizmasının Araştırılması. Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Doktora Programı, Ankara, 2020.

Vitamin A türevi retinoidlerin bir üyesi olan asitretin, epidermal hücrelerde proliferasyonu ve farklılaşmayı sağlar. Ayrıca immün sistemi düzenleyici, anti-inflamatuvar etkilere de sahiptir. Bu etkileri sayesinde klinikte psoriyazis tedavisinde kullanılır. Etkilerini esas olarak nükleer yerleşim gösteren retinoik asit reseptörü (RAR) ve retinoid X reseptörü (RXR) üzerinden gösterir. Asitretin kullananlarda gözlenen ereksiyon problemlerine ait vaka raporlarından yola çıkarak asitretinin düz kas üzerine olası etkilerini (sıçan korpus kavernozum, torasik aorta, mide fundus, ileum preparatları) araştırmak için gerçekleştirdiğimiz ön çalışmada sadece aorta preparatlarında gevşetici etki tespit edildi. Ön çalışma sonuçlarımız ışığında asitretinin damar düz kas dokusu üzerindeki gevşetici etkisini ve bu etkinin mekanizmasını ortaya koymak amacıyla planlanan tez çalışmamızda alfa-1 adrenoseptörler, RAR ve RXR, nitrik oksit (NO), adenilat / guanilat siklaz enzimleri ve potasyum kanallarının rolleri incelendi. Erkek Sprague Dawley sıçanlardan izole edilen ve *Krebs Henseleit* fizyolojik solüsyonu içeren organ banyolarına asılan endoteli uzaklaştırılmış torasik aorta halka preparatlarında fenilefrin ön-kasılmasını takiben artan konsantrasyonlarda uygulanan asitretin gevşeme yanıtı meydana getirdi. Bu etkinin çözücüsü olan DMSO'dan bağımsız olduğu saptandı. Asitretin ile elde edilen damar düz kası gevşeme yanıtları üzerinde alfa-1 adrenoseptörlerinin ve RAR antagonisti (AGN193109, 10^{-5} M, 2 saat) ile inkübasyonun bir etkisi olmadığı görüldü. RXR antagonisti (HX531, 10^{-5} M, 2 saat) ile inkübasyon endotel (-) preparatlarda asitretinin gevşetici etkisini artırdı. Nitrik oksit sentaz inhibitörü (L-NAME, 10^{-4} M, 30 dakika), adenilat siklaz inhibitörü (SQ2253, 10^{-5} M, 30 dakika), guanilat siklaz inhibitörü (ODQ, 10^{-6} M, 30 dakika) ve non-spesifik K^{+} kanal blokörü (Tetraetilamonyum - TEA, 10^{-2} M, 30 dakika) ile inkübasyon ise asitretin ile elde edilen gevşeme yanıtlarını ortadan kaldırdı. Tüm bu bulgular ışığında, asitretinin endotel (-) sıçan torasik aorta preparatlarında meydana getirdiği gevşeme yanıtlarında nitrik oksit, siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfat (cGMP)-bağımlı kinazlar ve potasyum kanallarının rolü olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Retinoidler, asitrein, damar düz kası, aorta, gevşeme, DMSO

Bu  alı ma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (proje no: DA 18/27) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklendi (Proje Onay Tarihi: 17.09.2018).



ABSTRACT

EFE OE. Investigation of the Mechanism of Vascular Relaxing Effect of Acitretin in Isolated Rat Thoracic Aorta Preparations. Baskent University, Health Sciences Institute, Department of Medical Pharmacology, Pharmacology PhD Program, Ankara, 2020.

Acitretin, a member of vitamin A-derived retinoids, provides proliferation and differentiation in epidermal cells. It also has immune-regulating, anti-inflammatory effects. Due to these effects, it can be used in the treatment of psoriasis. It shows its effects mainly via the nuclear localized retinoic acid receptor (RAR) and the retinoid X receptor (RXR). Based on the case reports of erection problems observed in acitretin users, relaxation was detected only in aorta preparations in a preliminary study which was conducted by us in order to investigate the possible effects of acitretin on smooth muscle (rat corpus cavernosum, thoracic aorta, stomach fundus, ileum preparations). In our thesis study, which was planned in the light of our preliminary study, we aimed to reveal the relaxing effect of acitretin on vascular smooth muscle tissue and the mechanism of this effect. The roles of alpha-1 adrenoceptors, RAR and RXR, nitric oxide (NO), adenylate / guanylate cyclase enzymes and potassium channels were investigated. In thoracic aorta ring preparations, isolated from male Sprague Dawley rats and suspended in organ baths containing *Krebs Henseleit* physiological solution; acitretin that was administered in increasing concentrations produced a relaxation response after phenylephrine pre-contraction. This effect was found to be independent of the solvent DMSO. Alpha-1 adrenoceptors and incubation with the RAR antagonist (AGN193109, 10^{-5} M, 2 hours) were found to have no effect on vascular smooth muscle relaxation responses obtained with acitretin. Incubation with the RXR antagonist (HX531, 10^{-5} M, 2 hours) increased the relaxant effect of acitretin in endothelium (-) preparations. Incubation with nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME, 10^{-4} M, 30 minutes), adenylate cyclase inhibitor (SQ2253, 10^{-5} M, 30 minutes), guanylate cyclase inhibitor (ODQ, 10^{-6} M, 30 minutes) and non-specific K^{+} channel blocker (Tetraethylammonium - TEA, 10^{-2} M, 30 minutes) eliminated the relaxation responses obtained with acitretin. In the light of all these findings, It was concluded that nitric oxide, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP)-dependent kinases and K^{+} channels may play a role in the relaxation responses of acitretin in endothelium (-) rat thoracic

aorta preparations.

Keywords: Retinoids, acitretin, vascular smooth muscle, aorta, relaxation, DMSO

This study was approved by Başkent University Animal Experiments Local Ethics Committee (project no: DA 18/27) and supported by Başkent University Research Fund (Project Approval Date: 17.09.2018).



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Retinoidler ve Sınıflandırılması	3
2.1.1. Retinoidlerin etki mekanizması ve reseptörleri	4
2.2. Asitretinin Genel Özellikleri	6
2.2.1. Farmakokinetik özellikler	7
2.3. Düz Kas Gevşeme Mekanizmaları.....	8
2.3.1. Vasküler düz kas gevşemesi.....	12
3. GEREÇ ve YÖNTEM	15
3.1. Deney Hayvanları.....	15
3.2. İzole Organ Banyosu Deneyleri	15
3.2.1. Torasik aorta halka preparatının hazırlanması	15
3.2.2. İzometrik gerim değişikliklerinin kayıt edilmesi	16
3.2.3. Endotel (+) / endotel (-) aorta halkalarında fenilefrin ile oluşturulan kasılma yanıtları üzerine asitretinin etkisinin gösterildiği çalışmalar.....	17
3.2.4. Asitretin ile inkübasyonun fenilefrin kasılma yanıtlarına etkisinin gösterildiği çalışmalar	17
3.2.5. Asitretinin damar gevşetici etkisinde retinoik asit reseptörlerinin rolünün gösterildiği çalışmalar.....	17
3.2.6. Asitretinin damar gevşetici etkisinde nitrik oksidin rolünün gösterildiği çalışmalar	18
3.2.7. Asitretinin damar gevşetici etkisinde adenilat siklaz ve guanilat siklazın rolünün gösterildiği çalışmalar.....	18
3.2.8. Asitretinin damar gevşetici etkisinde potasyum kanallarının rolünün gösterildiği çalışmalar	18

3.2.9. İzole organ banyosunda kullanılan test maddeleri.....	19
3.2.10. İstatistiksel analiz.....	19
4. BULGULAR	20
4.1 Endoteli Korunmuş ve Uzaklaştırılmış Aorta Halkalarında Fenilefrin İle Oluşturulan Kasilma Yanıtları Üzerine Asitretinin Etkisi	20
4.2. Asitretinin Damar Gevşetici Etkisinde Alfa-1 Adrenoseptörlerin bloke edilmesinin rolü	23
4.3. Asitretinin Damar Gevşetici Etkisinde Retinoik Asit Reseptörlerinin Rolü .	24
4.3.1. Asitretinin damar gevşetici etkisinde RAR'ın rolü	24
4.3.2. Asitretinin damar gevşetici etkisinde RXR'ın rolü.....	26
4.3.3. Asitretin çözücüsü DMSO'nun damar gevşetici etkisinde RAR'ın rolü	28
4.3.4. Asitretin çözücüsü DMSO'nun damar gevşetici etkisinde RXR'ın rolü	30
4.4. Asitretinin Damar Gevşetici Etkisinde Nitrik Oksidin Rolü	32
4.5. Asitretinin Damar Gevşetici Etkisinde Adenilat Siklaz / Guanilat Siklaz Enzimlerinin Rolü	34
4.6. Asitretinin Damar Gevşetici Etkisinde Potasyum Kanallarının Rolü	38
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR.....	49

EKLER

EK 1: Etik Kurul Onayı

TABLÖLAR LİSTESİ

sayfa

Tablo 2.1. Retinoidlerin üç jenerasyonunun sınıflandırılması	4
--	---



ŞEKİLLER LİSTESİ

sayfa

Şekil 2.1. Retinol (A vitamini) ve onunla ilişkili bileşiklerin kimyasal yapıları (11).....	3
Şekil 2.2. Retinoid aktivasyonunun hücresel mekanizması. Retinol, RBP'ye bağlanarak hücre içine taşınır ve hücre içinde CRBP'ye bağlanır. Retinol bir dizi işlem ile retinoik asite metabolize olur ve retinoik asit, nükleer reseptörleri olan RAR ve RXR aracılı olarak ilgili genlerin transkripsiyonunu sağlar (RBP: retinol bağlayıcı protein, CRBP: retinoik asit bağlayıcı protein, RALDH: retinaldehid dehidrojenaz, Rh: retinal aldehid, RA: retinoik asit, CRABP: retinoik asit bağlayıcı protein, RXR: retinoid X reseptörü, RAR: retinoik asit reseptörü, RARE: retinoik asit tepki elemanı) (23 numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır).....	5
Şekil 2.3. Düz kas gevşeme mekanizması (MHZK: miyozin hafif zincir kinaz, MHZP: miyozin hafif zincir fosfataz, ATP: adenzin trifosfat, ADP: adenzin difosfat, p-S19: fosforilaz serin 19) (79 numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır)	10
Şekil 2.4. Düz kaslarda agonistin uzaklaştırılması sonucunda kas gevşemesi (MHC: miyozin hafif zincir) (78 numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır)	11
Şekil 2.5. Düz kasta sarkoplazmik retikulum aracılı kalsiyum seviyesinin kontrolü ile kas kasılma mekanizması (CaM: kalmodulin, MHZK: miyozin hafif zincir kinaz, ATP: adenzin trifosfat, ADP: adenzin difosfat) (86 numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır).....	12
Şekil 2.6. Damar düz kasının endotel etkisi ile gevşemesi (ADP: adenzin difosfat, EDHF: endotel-kökenli hiperpolarize edici faktör, PGI ₂ : prostasiklin, VEGF: vasküler endotelial büyüme faktörü, O ₂ : oksijen molekülü, NO: nitrik oksit, eNOS: endotel kökenli nitrik oksit sentaz, Ca ²⁺ : kalsiyum, ATP: adenzin trifosfat, cAMP: siklik adenzin monofosfat, cGMP: siklik guanozin monofosfat, GTP: guanozin trifosfat, PKG: protein kinaz G, PKA: fosfokinaz A, K ⁺ : potasyum) (95).....	13

Şekil 3.1. İzole organ banyosuna asılmış bir sıçan izole torasik aorta halka preparatı. Çözelti, deney boyunca sürekli olarak %95 O₂ ve %5 CO₂ karışımı ile gazlandırıldı.....16

Şekil 4.1 Endotel (+) ve endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılma cevabı üzerine artan konsantrasyonlarda (10⁻¹²-10⁻⁴ M) uygulanan asitretinin etkisi (n=10). *p<0,05; anlamlı olarak endotel (-) gruptan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....20

Şekil 4.2. Endotel (+) ve endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılma cevabı üzerine artan miktarlarda uygulanan (10⁻¹²- 10⁻⁴ M asitretin konsantrasyonuna karşılık gelen) DMSO'nun etkisi (n=10). *p<0,05; anlamlı olarak endotel (-) gruptan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....21

Şekil 4.3. Endotel (+) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine uygulanan asitretin ve DMSO'nun artan konsantrasyonlarda etkisi (n=10). *p<0.05, anlamlı olarak DMSO'dan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....22

Şekil 4.4. Endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine uygulanan asitretin ve DMSO'nun artan konsantrasyonlarda etkisi (n=10). *p<0.05, anlamlı olarak DMSO'dan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....23

Şekil 4.5. AGN193109 (RAR antagonisti, 10⁻⁵ M) ile 2 saat inkübe edilen (n=3) ve edilmeyen (n=10) endotel (+) sıçan izole torasik halka aorta preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan konsantrasyonlarda uygulanan asitretinin etkisi. *p<0,05; anlamlı olarak “AGN193109 ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.24

Şekil 4.6. AGN193109 (RAR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=3) ve edilmeyen (n=10) endotel (-) sıçan izole torasik halka aorta preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan konsantrasyonlarda uygulanan asitretinin etkisi. Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....25

Şekil 4.7. HX531 (RXR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (+) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan konsantrasyonlarda uygulanan asitretinin etkisi. * $p<0,01$; anlamlı olarak “HX531 ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....26

Şekil 4.8. HX531 (RXR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan konsantrasyonlarda uygulanan asitretinin etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “HX531 ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.27

Şekil 4.9. AGN193109 (RAR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=3) ve edilmeyen (n=10) endotel (+) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan miktarlarda uygulanan DMSO'nun etkisi. Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....28

Şekil 4.10. Submaksimal fenilefrin ile ön-kasılmış endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında AGN193109 (RAR antagonisti, 10^{-5} M) varlığında (n=3) ve yokluğunda (n=10) artan konsantrasyonlarda uygulanan DMSO ile elde edilen izometrik gerim değişikliği yanıtı eğrileri. * $p<0,05$; anlamlı olarak “AGN193109 ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....29

Şekil 4.11. HX531 (RXR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (+) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan miktarlarda uygulanan DMSO'nun etkisi. Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....30

Şekil 4.12. HX531 (RXR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (-) sıçan izole torasik aorta haşka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan miktarlarda uygulanan DMSO'nun etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “HX531 ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....31

Şekil 4.13. L-NAME (NOS inhibitörü, 10^{-4} M) ile 30 dakika inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan konsantrasyonlarda uygulanan asitretinin etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “L-NAME ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....32

Şekil 4.14. L-NAME (NOS inhibitörü, 10^{-4} M) ile 30 dakika inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan miktarlarda uygulanan DMSO'nun etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “L-NAME ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....33

Şekil 4.15. SQ22536 (adenilat siklaz inhibitörü, 10^{-5} M) ile 30 dakika inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine uygulanan asitretinin artan konsantrasyonlarda etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “SQ22536 inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....34

Şekil 4.16. SQ22536 (adenilat siklaz inhibitörü, 10^{-5} M) ile 30 dakika inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan miktarlarda uygulanan DMSO etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “SQ22536 ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....35

Şekil 4.17. ODQ (guanilat siklaz inhibitörü, 10^{-5} M) ile 30 dakika inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine uygulanan asitretinin artan konsantrasyonlarda etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “ODQ inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.36

Şekil 4.18. Fenilefrin ile ön-kasılma gerçekleştirilmiş endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında DMSO’nun artan miktarlarının oluşturduğu cevap üzerine guanilat siklaz inhibisyonunun etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “ODQ ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.37

Şekil 4.19. Fenilefrin ile ön-kasılma gerçekleştirilmiş endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında asitretinin artan konsantrasyonlarının oluşturduğu cevap üzerine non-spesifik potasyum kanal blokajının etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “TEA ile inkübasyon (10^{-2} M) (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.....38

Şekil 4.20. Fenilefrin ile ön-kasılma gerçekleştirilmiş endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında DMSO’nun artan miktarlarının oluşturduğu cevap üzerine non-spesifik potasyum kanal blokajının etkisi. Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.39

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABD-NIH	Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Örgütü
ACh	asetilkolin
ADMA	asimetrik dimetilarjinin
ADP	adenozin difosfat
AGN193109	pan-retinoik asit reseptör antagonisti
ATP	adenozin trifosfat
ATRA	all-trans retinoik asit
Ca ⁺²	kalsiyum iyonu
CaCl ₂	kalsiyum klorür
CaM	kalsiyum kalmodulin
CALR	kalretikülin
cAMP	siklik adenzin monofosfat
cGMP	siklik guanozin monofosfat
CO ₂	karbondioksit
CRABP	hücresele retinoik asit bağlayıcı protein
CRBP	hücresele retinol bağlayıcı protein
DMSO	dimetilsülfoksit
DNA	deoksiribonükleik asit
EDHF	endotel kökenli hiperpolarize edici faktör
EDRF	endotel-kaynaklı gevşetici faktör
E _{maks}	maksimum etki
eNOS	endotelyal nitrik oksit sentaz
FDA	Amerika Birleşik Devletleri gıda ve ilaç dairesi
FE	fenilefrin
FXR	farnesoid X reseptörü
GTP	guanozin trifosfat
HX-531	retinoid X reseptör antagonisti
IL-6	interlökin-6
IUB	uluslararası biyokimya birliği
IUPAC	uluslararası temel ve uygulamalı kimya birliği

iNOS	indüklenebilir nitrik oksit sentaz
JAK-STAT	janus kinaz-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
K ⁺	potasyum iyonu
KCl	potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	potasyum fosfat monobazik
L-NAME	N ω -Nitro-L-arjinin-metil-ester-hidroklörür
LDH	laktat dehidrogenaz
LXR	karaciğer X reseptörleri
M	molarite
Mg.SO.7H ₂ O	magnezyum sülfat heptahidrat
MHZK	miyozin hafif zincir kinaz
MHZE	miyozin hafif zincir fosfataz
NaCl	sodyum klorür
NaHCO ₃	sodyum hidrojen karbonat
nNOS	nöronal nitrik oksit sentaz
NO	nitrik oksit
O ₂	oksijen molekülü
p-S 19	fosforilaz serin 19
PGE	prostaglandin E
PGI ₂	prostasiklin
PI3K	fosfotidil-3-kinaz
PKA	protein kinaz A
PKG	siklik guanozin monofosfat-bağımlı protein kinaz
PPAR	peroksizom proliferatörü ile aktive edilmiş reseptör
RA	retinoik asit
RALDH	retinaldehit dehidrogenaz
RAR	retinoik asit reseptörü
RARE	retinoik asit tepki elemanı
RBP	retinol bağlayıcı protein
RoDH	retinol dehidrogenaz
RXR	retinoid X reseptör
SQ-22536	adenilat siklaz inhibitörü

TEA	tetraetilamonyum
TR	tiroid hormon reseptörü
VDR	D vitamini reseptörü
VEGF	vasküler endotelyal büyüme faktörü



1. GİRİŞ

Asitretin, vitamin A türevleri ya da onlarla kimyasal olarak ilişkili bileşikler içeren ilaç sınıfı olan retinoid grubu bir moleküldür (1). Retinoidlerin; birinci (retinol, retinal, tretinoin [retinoik asit], isotretinoin); ikinci (etretinat ve asitretin) ve üçüncü (adapalen, aratinoid ve tazaroten) olmak üzere üç jenerasyonu bulunur (1) (2). Asitretin, etretinatın aktif metabolitidir ve ilaç olarak kullanılan asitretin (Neotigason[®], TEVA, Türkiye) sentetik bir retinoid türevi olarak ikinci jenerasyon retinoid sınıfına dahildir. Asitretin, epitel hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını düzenleyici, immünomodülatör ve antiinflamatuvar etkilere sahip bir moleküldür (3).

Retinoidler, genel etki mekanizması olarak hücrede nükleer reseptörleri aktive ederek ve gen transkripsiyonunu düzenleyerek etki gösterir. Nükleer reseptörler grubunda yer alan retinoid reseptörlerinin yapısal ve farmakolojik olarak farklı iki ailesi bulunmaktadır. Bunlar; retinoik asit reseptörü (RAR) ailesi ve retinoid X reseptörü (RXR) ailesidir. Reseptör-ligand etkileşiminde önemli olan bu reseptör ailelerinin her ikisi de farklı genler tarafından kodlanır ve alfa, beta, gamma (RAR- α , - β , - γ ve RXR- α , - β , - γ) şeklinde ifade edilen 3 farklı alt-tipe sahiptirler (1, 4). Asitretinin, bu iki aile üyesinden biri olan RAR'ın her üç alt tipini de aktive ettiği gösterilmiştir (1, 5). RAR'lar, D₃ vitamini reseptörleri, tiroid hormonu T₃ reseptörleri ve diğer çeşitli nükleer reseptörler ile heterodimer oluşturabilirler. Bunun yanı sıra RAR ve RXR'lar arasında da heterodimer yapı oluşabilir. Hem RAR ile RXR hem de RAR veya RXR ile diğer reseptör aileleri arasında ortaya çıkan bu heterodimer yapı, sinyal yollarındaki *cross-talk* mekanizmada rol oynar (1, 4, 5).

Esas olarak sedef hastalığı (psoriyazis) tedavisinde kullanılan asitretin, hem yağ dokusunda daha az sekestre olması hem de hızlı eliminasyonu ile etretinata tercih edilmesi sebebiyle son yıllarda ön plana çıkmıştır. Oral yoldan kullanılan asitretine bağlı olarak çok farklı yan etkiler bildirilmiştir. Asitretinin en sık görülen yan etkileri arasında; keilitis (en sık), cilt soyulması, alopesi, kuru cilt ve rinit bulunur. Karaciğer enzim düzeylerinde artışa sebep olabilir. Asitretin ile tedavi edilen hastalarda LDH ve trigliserit düzeylerinde yükselme de bildirilmiştir. En ciddi yan etki teratojenitedir (3, 6). Nadiren psödotümör serebri izlenmiştir (6). Ayrıca erektil disfonksiyon görüldüğüne dair vaka raporları ve bu konuda çalışmalar da mevcuttur (7-10). Asitretin kullanımına bağlı erektil disfonksiyon izlenen vaka raporlarından yola çıkarak planladığımız ön çalışmada; asitretinin sıçan

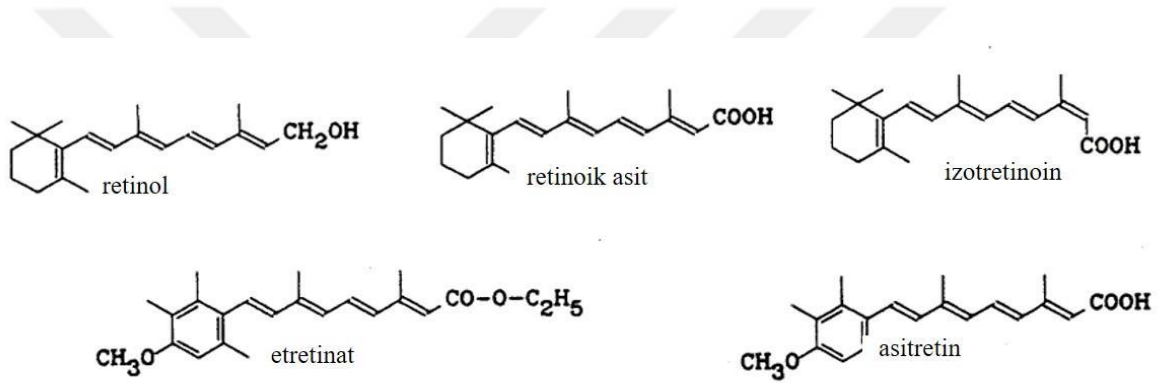
korpus kavernozumunu üzerindeki etkilerini ortaya koymak üzere izole organ banyosu deneyleri gerçekleştirildi ve sıçan korpus kavernozumunun yanı sıra sıçan torasik aorta, mide fundus ve ileum gibi düz kas içeren diğer yapılar üzerindeki etkileri de araştırıldı. Asitretin ile ilişkili bir erektil disfonksiyon yan tesirinden söz edebilmek için asitretinin korpus kavernozumda düz kas kasıcı bir etki meydana getirmesi beklenirken; ön çalışmamızda asitretinin korpus kavernozum üzerinde etkisi izlenmedi. Düz kas içeren diğer dokularda da (mide fundus, ileum) asitretinin kasıcı/gevşetici bir etki meydana getirmediği gözlemlendi. Öte yandan izole izole torasik aorta preparatlarında asitretinin gevşetici etkiye sahip olduğu görüldü. Ön çalışmada aorta preparatında elde ettiğimiz bu gevşetici etkiyi rasyonel olarak kabul ederek tez çalışmamızın hipotez ve amacını belirledik.

Asitretinin bu damar gevşetici etkisinin net bir şekilde ortaya konması ile vasküler kaynaklı hastalıkların tedavisinde bir alternatif olarak kullanılabilmesinin mümkün olabileceği düşüncesinden hareketle, bu tez çalışmasında sıçan izole torasik aorta preparatında asitretin uygulanması ile gözlemlenen gevşeme etkisi ve bu etkinin mekanizmasının araştırılması amaçlandı. Çalışmamızın hipotezi ise "Asitretin damar düz kasındaki gevşetici etkisini nitrerjik sistem aracılığıyla meydana getirir" olarak belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Retinoidler ve Sınıflandırılması

Retinoidler A vitamini (retinol) türevleridir (Şekil 2.1) (11). Kemik büyümesini ve epitel farklılaşmasını uyarır, retina ve üreme sisteminde fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Bununla birlikte, retinoidlerin psoriyazis ve diğer hiperkeratotik bozuklukları olan hastalarda hiperproliferasyonu uyarması da söz konusudur (12). 1970'den sonra daha uygun bir terapötik indekse sahip olan sentetik tretinoin türevleri geliştirilmiştir. Bunların arasında yer alan etretinat ve onun aktif metaboliti olan asitretin; psoriyazisin ve diğer keratinizasyon bozukluklarının tedavisinde sistemik yoldan kullanılabilir (13, 14).



Şekil 2.1. Retinol (A vitamini) ve onunla ilişkili bileşiklerin kimyasal yapıları (11).

İlk olarak 1976 yılında ortaya konan "retinoid" terimi (15), Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) ve Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından 1982 yılında hem doğal olarak oluşan A vitamini formlarını hem de retinolün biyolojik aktiviteye sahip olan veya olmayan birçok sentetik analogunu içerecek şekilde tanımlanmıştır. 1985 yılında ise retinoidlerin “belirli bir reseptöre veya reseptör setine bağlanarak ve bunları aktive ederek belirli biyolojik tepkileri ortaya çıkarabilecek bir madde” olarak tanımlanması önerilmiştir (16). Pratikte, günümüzde çoğu araştırmacı retinoidleri sadece biyoetkin olan veya olmayan retinol analoglarından oluşan bir grup olarak değil, aynı zamanda retinol ile yakından ilişkili olmayan; ancak biyolojik olarak A vitamini veya retinoid aktivitesi ortaya çıkaran birkaç bileşenden oluşan bir grup olarak kabul etmektedir (17). Sistemik retinoidler üç jenerasyon olarak sınıflandırılabilir (Tablo 2.1) (18).

Birinci jenerasyon retinoidler, A vitamini polien yan zinciri ve polar uç grubu değiştirilerek oluşturulur. Bu retinoidler, dermatoloji ve onkoloji alanında büyük değere sahiptir.

İkinci jenerasyon retinoidler, A vitamininin siklik uç grubunun halka yapısıyla değiştirilmesi sonucunda oluşturulur ve terapötik değeri büyüktür.

Üçüncü jenerasyon retinoidler, polien yan zincirinin siklizasyonu yoluyla oluşturulur. Bunlar önceki nesilden daha güçlü olmalarına rağmen toksik etkileri nedeniyle daha az öneme sahiptirler (18).

Tablo 2.1. Retinoidlerin üç jenerasyonunun sınıflandırılması

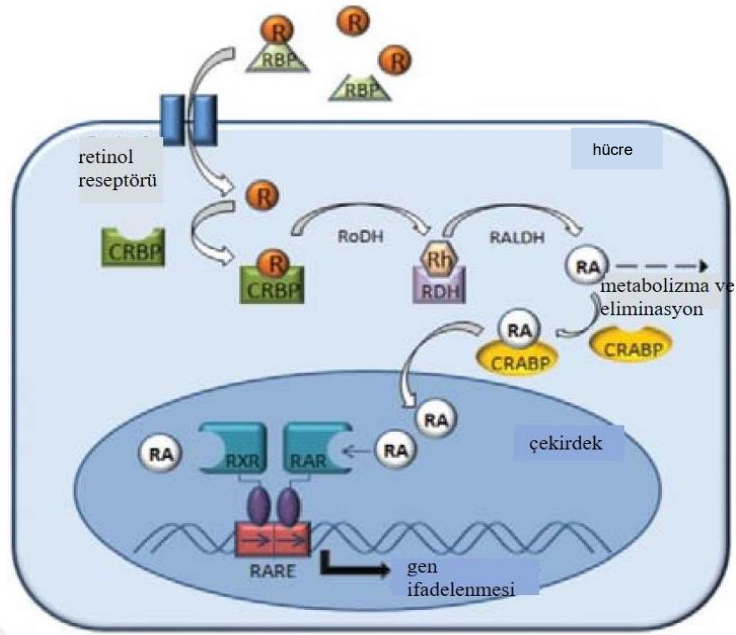
Birinci Jenerasyon	İkinci Jenerasyon	Üçüncü Jenerasyon
İzotretinoin Tretinoin	Etretinat Asitretin	Beksaroten Alitretinoin

Üç jenerasyon retinoid arasında, tretinoin en kısa yarılanma ömrüne sahiptir, ardından beksaroten ve bunun sonrasında da izotretinoin ile asitretin gelir; etretinat ise hepsinden daha uzun yarılanma ömrüne sahiptir (18)

2.1.1. Retinoidlerin etki mekanizması ve reseptörleri

Bir hormon olan retinoid, etkisini nükleer reseptörleri aktive ederek gösterir. Retinoidler, interstisyel aralıkta yer alan ve retinol bağlayıcı protein (RBP) adı verilen spesifik bir protein ile bağlanarak hücre membranında bulunan retinol reseptörüne taşınır. Burada retinol bağlayıcı proteinden ayrılan serbest retinoidler retinol reseptörü vasıtasıyla hücre içerisine taşınır. Hücre içerisine geçen serbest retinoidler hücresel retinol bağlayıcı proteine (CRBP) bağlanarak retinol hidrojenaz enzimi ile retinal aldehit (Rh) metabolize olur ve sonrasında retinaldehit dehidrojenaz (RALDH) enzimi tarafından retinoik asit molekülüne (RA) dönüştürülür. Oluşan RA, hücresel retinoik asit bağlayıcı protein (CRABP) ile bağlanır ya da ileri metabolizma ve eliminasyon adımlarına geçerek hücre dışına uzaklaştırılabilir (19,20).

Transkripsiyon için görev alacak RA, CRABP ile bağlanır ve burada RAR veya RXR ile etkileşime girerek transkripsiyon için reseptörlerin dimerizasyonunu sağlar. Dimer yapısını kazanan bu reseptörler, RARE (retinoik asit tepki elemanı) DNA sekansına bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonu aktive olur (Şekil 2.2) (4, 18, 21, 22).



Şekil 2.2. Retinoid aktivasyonunun hücresel mekanizması. Retinol, RBP'ye bağlanarak hücre içine taşınır ve hücre içinde CRBP'ye bağlanır. Retinol bir dizi işlem ile retinoik asite metabolize olur ve retinoik asit nükleer reseptörleri olan RAR ve RXR aracılı olarak ilgili genlerin transkripsiyonunu sağlar (RBP: retinol bağlayıcı protein, CRBP: retinoik asit bağlayıcı protein, RALDH: retinaldehid dehidrojenaz, Rh: retinal aldehid, RA: retinoik asit, CRABP: retinoik asit bağlayıcı protein, RXR: retinoid X reseptörü, RAR: retinoik asit reseptörü, RARE: retinoik asit tepki elemanı) (23 numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır)

RAR ile RXR arasında ve RAR veya RXR ile diğer reseptör aileleri arasında ortaya çıkan heterodimerler hedef gen transkripsiyonunun ligand-bağımlı düzenlenmesine aracılık eder (24-28). RXR'lar, sadece RAR'larla değil, aynı zamanda, peroksizom proliferatörü ile aktive edilmiş reseptörler (PPAR'lar), karaciğer X reseptörleri (LXR'ler), D vitamini reseptörleri (VDR'ler), farnesoid X reseptörü (FXR) ve tiroid hormonu reseptörleri (TR'ler) ile de heterodimer yapı oluşturarak aktivitelerini gösterirler. Bu nedenle, retinoidlerin, hormona duyarlı daha geniş bir gen grubunun transkripsiyonunu etkileyebileceği açıktır. Bu da *cross-talk* ligand aktivasyonu ve farklı sinyal yollarının birbirleri ile etkileşmesi anlamına gelir (29, 30).

Mevcut kanıtlar RA'nın, hücreler üzerinde çoklu etkileri olduğunu düşündürmektedir. Bu olası etkilere dair bilgiler kesin ve tamamlanmış halde değildir. Etki mekanizmasının çözülmesi, RA'nın etkilerinin konsantrasyona bağlı olması nedeniyle karmaşıktır. Yüksek konsantrasyonlar toksik etkiler yaratırken, düşük konsantrasyonlar fizyolojik olarak etkilidir (31).

2.2. Asitretinin Genel Özellikleri

Asitretin, ön ilaç etretinatın ana aktif metabolitidir. Asitretin, epitel dokusunda hücre farklılaşmasını ve çoğalmasını kontrol eden A vitamini analogu olan ikinci nesil bir retinoiddir (20).

Etretinat, 1986'da şiddetli psoriyazis tedavisi için onaylanan ilk oral sistemik retinoiddir. Psoriyazis ve diğer keratinizasyon bozukluklarının tedavisinde etretinatın (Tegison®, Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ) klinik etkililiği net olarak ortaya konmuştur (32). 1980'lerin sonlarında etretinatın aktif metaboliti olan asitretin (Soriatane®, Roche, Nutley, NJ), klinik kullanım için önerilmiş ve böylece psoriyazis tedavisinde etretinata alternatif olarak asitretin kullanımına ilgi artmıştır (33). Haziran 1997'de asitretinin psoriyazis tedavisinde klinik kullanımı ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (34). Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da sistemik kullanım için mevcut tek anti-psoriyatik retinoid asitretindir (35). Uygun klinik durumda asitretin, jeneralize püstüler psoriyazis, palmoplantar püstüloz, ekzfoliyatif eritrodermik psoriyazis ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) varlığında ortaya çıkan psoriyazis için önemli bir terapötik seçenektir (36).

Oral uygulamadan sonra etretinat maksimum plazma konsantrasyonuna 2 ila 4 saat sonra ulaşır (37, 38). Etretinat plazma-proteinlerine yaklaşık %99 oranında bağlanır. Etretinat; ester hidrolizi, konjügasyon, tetraen yan zincirinin p-oksitatif dekarboksilasyonu ve / veya O-de-metilasyonu ile metabolize olur ve % 60'ı dışkı ile değişmeden atılırken metabolitlerinin atımı safra ve idrar yoluyla gerçekleşir (39, 40). Etretinat, kronik tedavi sırasında yağ dokusunda yüksek oranda depolanır ve bu da etretinatın yavaş eliminasyonuna neden olur. Böylece etretinat aylar sonra bile plazmada saptanabilir (41-46).

Asitretin, etretinattan 50 kat daha az lipofiliktir ve bu nedenle vücuttan çok daha hızlı bir şekilde elimine edilir (33, 47). Yağ dokusunda daha az depolanması nedeniyle etretinata göre belirgin biçimde daha kısa yarılanma süresine sahip olan asitretin; bu farmakokinetik özelliği sebebiyle etretinatın yerini almış ve psoriyazis tedavisinde tercih edilen bir seçenek haline gelmiştir (48). Asitretin etretinata benzer oranda plazma proteinlerine bağlanır (49). Metabolizmasında; izomerizasyon, yan zincirin β -oksitasyonu ve konjügasyonu rol oynar. Asitretinin eliminasyon yarılanma ömrünün 50 saat olduğu tahmin edilmektedir. Başlıca metabolit olan izo-asitretin, yaklaşık 65-90 saat gibi daha uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir (3, 48, 50).

Asitretinin kesin etki mekanizması bilinmemekle birlikte, proliferasyonu ve farklılaşmayı modüle ettiği; immünomodülatör ve anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir (51). Sentetik RA türevi olan asitretin de diğer retinoidler gibi hücre üzerindeki etkisini, RAR ve RXR aracılığıyla gösterir.

Asitretinin epidermal hücresel farklılaşmayı modüle ettiği, bunun da psoriyatik plakların eritem yoğunluğu ve kalınlığının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (52). Asitretinin epidermis üzerindeki etkileri; epidermal hücre proliferasyonunu azaltma ve keratinosit farklılaşmasını uyarma şeklindedir (1, 53, 54). Bu özellikleri ile asitretin psoriyazis tedavisinde kullanılmaktadır. Yardımcı T hücrelerinin (Th-17) interlökin-6 (IL-6) aracılı olarak uyarılmasını inhibe eder ve düzenleyici T hücrelerinin farklılaşmasını uyarır (55). Psoriyazis hastalığında rol oynayan sitokinlerin çoğu transkripsiyon aktivatörü (JAK-STAT) sinyal yolağı ile düzenlenir. Asitretin, bu yolda görevli olan STAT1 ve STAT3'ün ifadenmesini azaltır (56). Bunun sonucunda keratinosit proliferasyonu ve çoğu sitokin ifadenmesi inhibe olur (56-58). Ayrıca asitretin, keratinositlerden vasküler endotelial büyüme faktörü salıverilmesini ve nötrofil migrasyonunu da inhibe eder (59,60). Asitretinin anti-neoplastik etkisi klinik çalışmalarda ortaya konmamış olsa da; deneysel çalışmalarda bu tür bir etkisinin olduğu gösterilmiştir (20).

Asitretin, hücre içinde RA gibi CRABP üzerinden etki göstermesinin yanı sıra; bazı protein kinazların aktivitelerini de etkiler. Siklik adenosin monofosfat (cAMP) bağımlı iki farklı protein kinaz formu tanımlanmıştır: Bunlar, RI ve RII'dir. RI'in hücre çoğalmasında rol oynadığı düşünülürken, RII hücre farklılaşmasında ve hücre büyümesinin inhibisyonunda rol oynar (61, 62). Normal hücrelere kıyasla psoriyatik fibroblastlarda cAMP'nin büyümeyi inhibe edici etkisi azalır (63).

Asitretinin, insan psoriyatik fibroblastlarında eksik oldukları bilinen cAMP'ye bağlı protein kinazların seviyesini ve aktivitesini artırdığı; ancak normal fibroblastlar üzerinde hiçbir etki oluşturmadığı bildirilmiştir (63). İnsan promiyelosit lösemi ve miyeloblast hücre hatlarında ise asitretin, cAMP-bağımlı protein kinazın aktivitesini ve fosfolipaz-sensitif kalsiyum-bağımlı protein kinaz ve protein kinazın aktivitesini artırmıştır (64).

2.2.1. Farmakokinetik özellikler

Asitretinin farmakokinetik profiline ilişkin kapsamlı çalışmaların yanısıra (38, 40, 49, 65, 66); asitretinin metabolit olarak tartışıldığı ve ana ilaç olarak etretinat kullanılan çalışmalar da mevcuttur (67). Asitretinin ana ilaç ve metabolit olarak farmakokinetiğinin

karşılaştırıldığı çalışmalarda; asitretin ana ilaç olarak kullanıldığı zaman tüm emilim ve eliminasyon süreçlerinin etretinatın metaboliti olarak üretilen asitretininkine kıyasla daha hızlı olduğu bulunmuştur (38, 65). Asitretin ile ilgili farmakokinetik özellikleri absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon başlıkları altında inceleyebiliriz:

Absorpsiyon

Asitretin klinikte oral yoldan kullanılır. Oral yoldan alındığında emilimi değişkendir ve mutlak biyoyararlanımının yaklaşık % 60 olduğu (%36-95 aralığı) ve gıda ile birlikte alındığında artış gösterdiği bildirilmiştir (48, 49, 68).

Dağılım

Asitretinin plazma proteinlerine, özellikle albümine yoğun olarak bağlandığı gösterilmiştir (40, 49, 69). Ayrıca CRABP için yüksek bir afinite gösterir (20, 38). Daha az lipofilik olması sebebiyle asitretin, etretinata göre daha düşük bir dağılım hacmine sahiptir (45, 49). Etretinatın aksine asitretinin vücutta herhangi bir bölgede depolandığına dair bulgu yoktur (40, 46, 50).

Metabolizma ve Eliminasyon

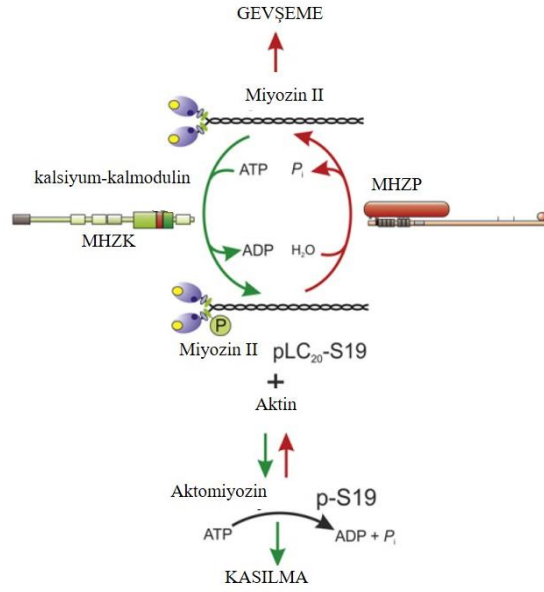
Asitretin ve metaboliti olan izo-asitretin hepatik ve renal yol ile uzaklaştırılır (70, 71, 72, 73). Asitretinin biyoyararlanımı üzerine hepatik ilk-geçiş eliminasyonunun etkisi yoktur (49, 74, 75).

2.3. Düz Kas Gevşeme Mekanizmaları

Düz kas gevşemesi, kasılma uyarınının uzaklaştırılmasının sonucu olarak veya kasılma mekanizmasının inhibisyonuna yol açan bir maddenin doğrudan etkisiyle ortaya çıkar. Hangi yolla olursa olsun gevşeme için hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun azalması ve miyozin hafif zincir (MHZ) fosfataz aktivitesinin artması gereklidir (76, 77). Sitozolik kalsiyumun ortamdan uzaklaştırılması için sarkoplazmik retikulum içerisine alınması ya da plazma membranı üzerinden hücre dışına atılması gerekir. Sarkoplazmik retikulumun kalsiyum alımı ATP hidrolizine bağlıdır. Ca^{2+} -ATPaz, fosforile olduğunda sarkoplazmik retikulumun lümenal tarafına taşınmak üzere iki Ca^{2+} iyonunu bağlar (78). Enzimin aktivitesi ve reaksiyona aracılık etmek için ATPaz'ın katalitik bölgesine Mg^{+} bağlanır. Sarkoplazmik retiküler Ca^{2+} -bağlayıcı proteinler ayrıca hücre içi Ca^{2+} seviyelerinin azalmasına katkıda bulunur. Son çalışmalarda, düz kasta

kalsekuestrin ve kalretikülin (CALR) sarkoplazmik retiküler Ca^{2+} -bağlayıcı proteinler olarak tanımlanmıştır. Ek olarak, plazma zarında da Ca^{2+} -ATPaz bulunur. Bunlar hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun azaltılmasına katkıda bulunurlar. Bu enzim sarkoplazmik retikulumda bulunandan farklıdır, çünkü kalmodulin ile bağlanabilen bir otoinhibitör alanı vardır. Böylece kalmodulin daha fazla Ca^{2+} bağlayarak hücre dışına normale göre 10 kat daha fazla Ca^{2+} çıkışının olmasını sağlar. $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ pompası da plazma membranı üzerinde bulunur ve hücre içi kalsiyumunun azaltılmasına yardımcı olur. Plazma zarında bulunan reseptörle çalışan ve voltajla çalışan Ca^{2+} kanalları, daha önce belirtildiği gibi Ca^{2+} influksu (içe-giriş) ve düz kas kasılmasında önemlidir. Bu kanalların inhibisyonu da gevşemeyi sağlayabilir (78).

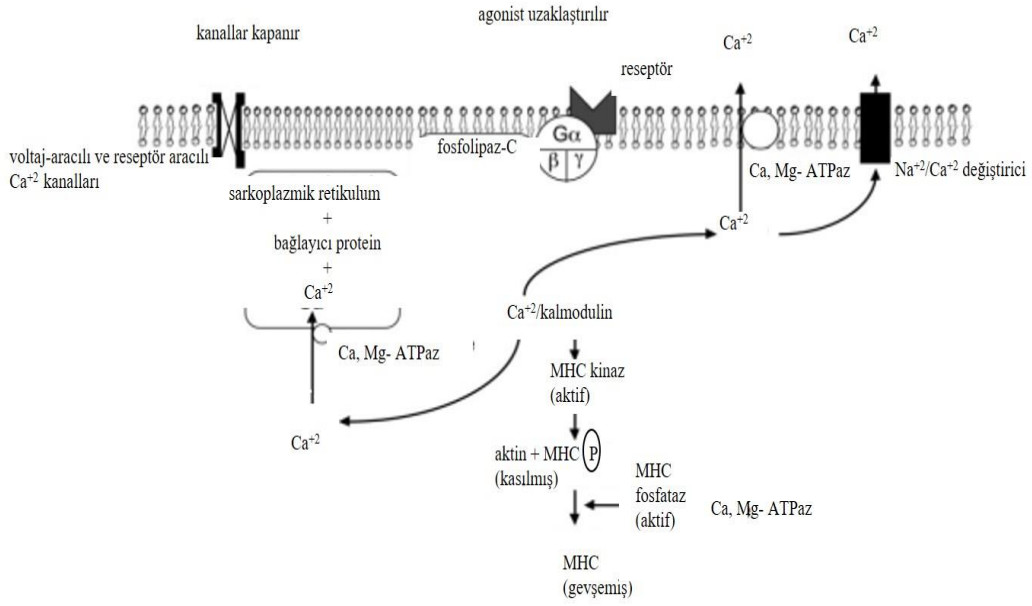
Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun azalmasının sonucu olarak, kasılmayı sağlayan kalsiyum-kalmodulin-bağımlı süreçler ters yönde etki eder ve gevşeme başlar. Burada miyozin baş kısmındaki hafif zincirin fosforilasyonu birinci adımdır (Şekil 2.3) (79). Hafif zincirin fosforilasyonu iki enzim tarafından kontrol edilir. Bunlardan biri, kalsiyum-kalmodulin kompleksi tarafından aktive edildiğinde, hafif zinciri fosforile eden MHZ kinazdır. İkinci enzim ise MHZ fosfatazdır ve hafif zincirdeki fosfat grubunu çıkarır ve böylece miyozin ve aktin arasındaki etkileşimi engeller. Hücrede kasılma aktivasyonunun başlamasıyla birlikte, kalsiyum-kalmodulin komplekslerinin oluşumu miyozin hafif zincir fosforilasyon-defosforilasyonun dengesini fosforilasyon lehine değiştirir ve kasılma gerçekleşir. Bununla birlikte, hücrede kasılma aktivasyonu sona erdiğinde, ortaya çıkan kalsiyum akışı azalır ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonu MHZP defosforilasyonunu ve gevşemesini destekler (80-82).



Şekil 2.3. Düz kas gevşeme mekanizması (MHZK: miyozin hafif zincir kinaz, MHZP: miyozin hafif zincir fosfataz, ATP: adenozin trifosfat, ADP: adenozin difosfat, p-S19: fosforilaz serin 19) (79 numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır)

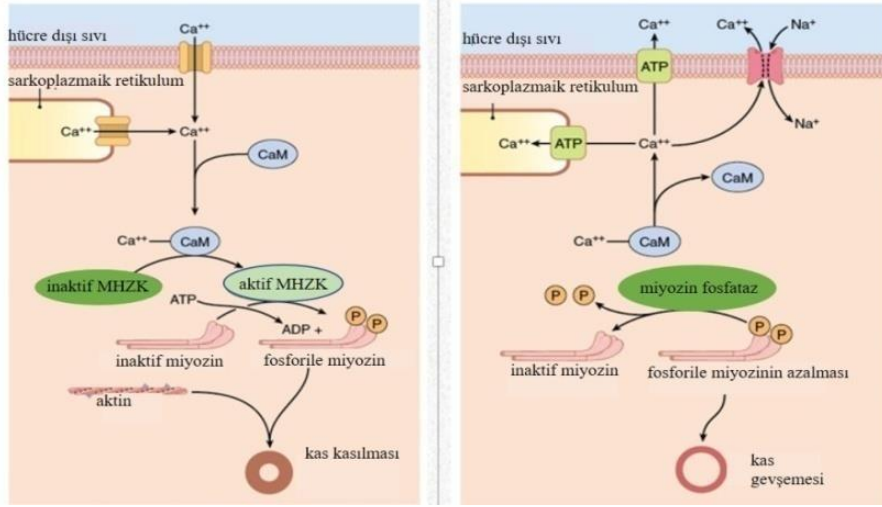
Hücre içi kalsiyum seviyesini azaltmanın ve böylece düz kas gevşemesi sağlamanın üç yolu vardır:

Birinci yol, hücre içi kalsiyum seviyesinin yükselmesinden sorumlu uyarıcı ortadan kaldırmaktır. Kasılma için uyarıcı, hücre dışı potasyum seviyesi gibi membran depolarizasyonu (Şekil 2.4) oluşturan bir agonist ise, agonistin uzaklaştırılması membran repolarizasyonunun gerçekleşmesine izin verecektir. Bu repolarizasyon voltaj-duyarlı kalsiyum kanalının (*voltage-operated channel*, VOC) kapanmasına neden olacak ve hücre dışı kalsiyum akışı kesilecektir. Bununla birlikte, uyarıcı belirli bir membran reseptörüne bağlanan bir agonist ise (Şekil 2.4) o zaman agonistin reseptörden ayrılması, hücre içi kalsiyum seviyesinin yükselmesinden sorumlu ikinci haberci moleküllerin üretimini durduracaktır (örn., inozitol monofosfat (IP) ve diaçilgliserol).



Şekil 2.4. Düz kaslarda agonistin uzaklaştırılması sonucunda kas gevşemesi (MHC: miyozin hafif zincir) (78 numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır)

Gevşemenin sağlanabileceği ikinci bir yol, hücre içi kalsiyumun uzaklaştırılmasıdır. Düz kas hücrelerinin, hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunu kontrol eden çeşitli mekanizmaları vardır. ATP'ye bağımlı kalsiyum pompaları da bu mekanizmalarda rol oynar. Hücre zarında bulunan bu pompalar kalsiyumun hücre dışına taşınmasını sağlar (Şekil 2.5). Bu kalsiyum hareketi konsantrasyon farkına (*gradient*) karşı olduğu için enerji gereklidir. Bu enerji ATPaz aktivitesine sahip pompa tarafından sağlanır. Sarkoplazmik retikulumun membranında bulunan benzer kalsiyum pompaları, kalsiyumu tekrar serbest bırakılıncaya kadar depolandığı organelle döndürür. Hücreden kalsiyumu çıkarabilen ikinci bir membran sistemi sodyum-kalsiyum pompasıdır (Şekil 2.5). Bu sistem, hücreye giren iki sodyum iyonu karşılığında bir kalsiyum iyonunu hücre dışına taşır. Bu değişim hücrenin zar potansiyelini değiştirmediğinden enerji gerektirmez (83-85).



Şekil 2.5. Düz kasta sarkoplazmik retikulum aracılı kalsiyum seviyesinin kontrolü ile kas kasılma mekanizması (CaM: Kalmodulin, MHZK: miyozin hafif zincir kinaz, ATP: adenozin trifosfat, ADP: adenozin difosfat) (86 numaralı kaynaktan Türkçeye uyarlanmıştır)

Düz kas gevşemesinin ortaya çıkabileceği üçüncü bir yol ise, düz kas hücresi içindeki cAMP veya cGMP (siklik guanozin monofosfat) seviyelerinin yükselmesidir. Adrenerjik agonistler (epinefrin, izoproterenol), dopamin ve bazı prostaglandinler (PGE ve PGI₂) dahil olmak üzere çeşitli agonistler spesifik reseptörlerine bağlanarak adenilat siklaz enzimini aktive eder.

Aktivasyonda, adenilat siklaz ATP'yi cAMP'ye dönüştürür, bu da daha sonra cAMP'ye bağımlı protein kinazı aktive eder. Bu kinaz, sırasıyla;

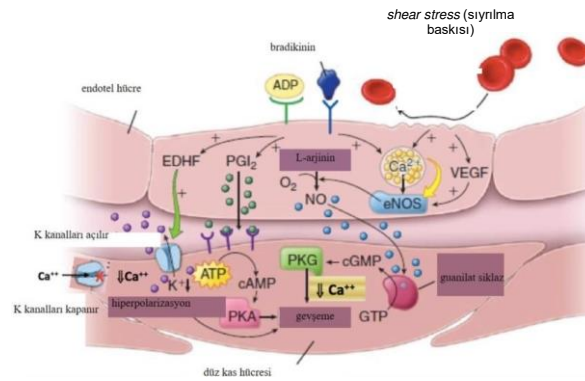
- (1) kinazın kalsiyum-kalmodulin kompleksi için afinitesini azaltan miyozin hafif zincir kinaz fosforilasyonunu,
- (2) hücre membranı ve sarkoplazmik retikulumdaki kalsiyum pompalarının aktivasyonunu,
- (3) potasyumun hücre dışına çıkmasını sağlayan potasyum kanallarının açılmasını sağlar (78).

2.3.1. Vasküler düz kas gevşemesi

Vasküler düz kas gevşemesinde de önemli olan nokta hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun düşmesidir. Vasküler düz kas kasılma/gevşemesini düzenleyen ve endotelden salıverilen çeşitli faktörler de bulunur. Bazı durumlarda endotel-kaynaklı prostasiklin, adenilat siklazı uyararak ve cAMP seviyesini yükselterek vasküler düz kas

hücrelerinin endotel-bağımlı gevşemesine sebep olabilir (87-89). Prostatiklin (PGI_2) kısa yarılanma ömrüne sahip bir prostaglandin tipidir ve lokal etki yaparak platelet aktivasyonunu inhibe eder ve vazodilatasyonu uyarır. Bu vazodilatasyon, PGI_2 'nin düz kas hücreindeki spesifik reseptörlerine bağlanması ile sağlanır. PGI_2 , reseptörüne bağlanıp aktive ettikten sonra adenilat siklaz enzimi aktive olur ve bu enzimin etkisi ile cAMP oluşumu artar (90, 91). Guanilat siklaz, guanozin trifosfatı (GTP) cGMP'ye dönüştürür ve bu da sonrasında cGMP-bağımlı protein kinazı (PKG) aktive eder (Şekil 2.6).

Endotel; otonom ve duysal sinirlerden salıverilen nörotransmitterler (örn., asetilkolin, norepinefrin), dolaşımdaki hormonlar (örn., vazopressin, anjiotensin), trombositler ve koagülasyon sisteminden kaynaklanan maddeler (örn., serotonin, ADP) veya endotel hücrelerinin kendisi ya da damar duvarından salıverilen mediyatörler (örn., bradikinin, ADP/ATP, histamin) ile uyarıldığında damar düz kasında gevşeme sağlayabilir (Şekil 2.6) (92). Kan akışı kendi doğal seyrinde kardiyovasküler sistemde endotel hücrelerini belirli bir stres altında bırakarak vazodilatasyona sebep olur. Bu durum kan akışının endotel hücrelerde yarattığı fiziksel etkisidir ve sıyrılma baskısı (*shear stress*) olarak adlandırılır. Sıyrılma baskısı, endotel hücrelerinden vazodilatörlerin salıverilmesini ve kan basıncının sürdürülmesini sağlar. Özellikle vazodilatörler olan nitrik osit (NO), endotel kökenli hiperpolarize edici faktör (EDHF) ve PGI_2 salıverilmesi sıyrılma baskısı etkisiyle olur ve damar düz kas gevşemesi gerçekleşir (93, 94).



Şekil 2.6. Damar düz kasının endotel hücresi etkisi ile gevşemesi (ADP: adenosin difosfat, EDHF: endotel-kökenli hiperpolarize edici faktör, PGI_2 : prostatiklin, VEGF: vasküler endotelyal büyüme faktörü, O_2 : oksijen molekülü, NO: nitrik oksit, eNOS: endotel kökenli nitrik oksit sentaz, Ca^{2+} : kalsiyum, ATP: adenosin trifosfat, cAMP: siklik adenosin monofosfat, cGMP: siklik guanozin monofosfat, GTP: guanozin trifosfat, PKG: protein kinaz G, PKA: protein kinaz A, K^+ : potasyum) (95)

Bu endotel-kaynaklı yanıtların primer aracısı olarak 1980'de Furchgott ve Zawadzki tarafından endotel-kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) tanımlanmış (96) ve daha sonra

serbest radikal nitrik oksit olarak isimlendirilmiştir (96-98).

NO düz kaslarda gevşeme mekanizması açısından oldukça yoğun çalışılan aracı bir moleküldür. Nitrik oksit esas olarak L-arjininden üç enzimin etkisiyle sentezlenir. Bu üç izo-enzim; nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS - NOS-1), indüklenebilir NOS (iNOS - NOS-2) ve endotelial (non-spesifik) NOS (eNOS - NOS-3)'dur. Bu sentez işlemi için ayrıca birçok kofaktöre de ihtiyaç duyulur. Bunlar arasında flavin-adenin dinükleotidi, flavin mononükleotidi ve tetrahidrobiopiterin (BH₄) sayılabilir (99, 100). NOS-1 esas olarak beyin dokusunda eksprese edilirken buna ek olarak çoğu organın epitel hücrelerinde ve vasküler düz kas hücrelerinde de eksprese edildiği gösterilmiştir. NOS-3'ün esas kaynağı endoteldir ve onun dışında kardiyak miyositler, insan plasenta dokusu ve böbrek tübüler epitel hücrelerinde de varlığı gösterilmiştir. NOS-1 ve NOS-3 aktivitesinin düzenlenmesinde kalsiyumla aktive olan kalmodulin önemli rol oynar. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artışına bağlı olarak her iki enzimin aktivitesi de artar. NOS-2'nin ise esas olarak makrofajlarda eksprese olduğu gösterilmiş olsa da herhangi bir hücre veya dokuda bakteriyel lipopolisakkaritler, sitokinler gibi uyarıların varlığında da eksprese olabilir (99-105). Endotelden NO salıverilmesi kalsiyum akışı ile ilişkilidir (106, 107); ancak NO salıverilmesi aynı zamanda hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunda bir artış olmaksızın da gerçekleşebilir (107). NO gibi nitrovazodilatörler (nitrogliserin, nitroprussiyat) guanilat siklazı aktive ederek gevşeme sağlar. Bu enzim, GTP'yi cGMP'ye dönüştürür, bu daha sonra cGMP'ye bağımlı protein kinazı aktive eder. Bu kinaz, sırasıyla;

1. sarkoplazmik retikulum içinde kalsiyumun sekestrasyonunun uyarılması
2. kalsiyumun hücre dışına aktif atılımının uyarılması,
3. hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesinin engellenmesi,
4. reseptör-aracılı kalsiyum kanallarından kalsiyum akışının içe girişinin azaltılması yollarıyla arteriyel gevşemeyi sağlar (82, 90, 91).

Bu bilgiler ve ön-deney sonuçları ışığında "Asitretin damar düz kasındaki gevşetici etkisini nitrejik sistem aracılığıyla meydana getirir" hipotezi ile yola çıktığımız tez çalışmamızın amacı asitretinin sıçan izole torasik aorta preparatında düz kas gevşetici etkisini ve bu etkinin mekanizmasını ortaya koymaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (EK-1, proje no: DA18/27) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklendi (Proje Onay Tarihi: 17.09.2018). Hayvan deneyleri çalışmaları Helsinki Deklarasyonu ve Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü (USA-NIH) tarafından yayınlanan Laboratuvar Hayvanlarının Kullanımına ve Bakımına İlişkin Rehber'e uygun olarak gerçekleştirildi.

Bu çalışmada, 355 ± 15 g ağırlığında 34 adet erkek Sprague Dawley sıçan kullanıldı. Sıçanlar Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Ortama alışmalarını sağlamak için deneylerin başlamasından 7 gün önce Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Araştırma Ünitesine getirilen sıçanlar, sıcaklığı ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) ve bağıl nemi ($\%32 \pm 7$) sabit, vantilatör ile havalandırılan, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsü uygulanan bir odada, 8'erli gruplar halinde, standart sıçan kafeslerinde barındırıldı. Tüm gruplara standart sıçan yemi ve musluk suyu verildi (*ad libitum*).

3.2. İzole Organ Banyosu Deneyleri

3.2.1. Torasik aorta halka preparatının hazırlanması

Sıçanlarda ketamin ve ksilazin anestezisi altında (100 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin, i.p) orta hat abdominal insizyon yapıldıktan sonra, sternumun her iki yanındaki kıkırdakların kesilmesi ile toraks boşluğuna ulaşıldı. Kalbin sol ventrikülünden 6-8 ml kan alınarak sıçan sakrifiye edildi. Torasik aorta, aortik arkten itibaren diseke edilerek çıkartıldı, 1 cm'lik proksimal bölümü, içinde soğuk *Krebs-Henseleit* fizyolojik solüsyonu bulunan petri kabı içerisine alındı. Etrafındaki yağ ve bağ dokuları dikkatlice temizlendikten sonra ~3 mm uzunluğunda halka şeklinde 2 adet aorta preparatı hazırlandı. Damar halkalarının birinde, lümeninden geçirilen bir cam çubuğun kendi ekseninde her iki yöne 20'şer kez çevrilmesi suretiyle endotel uzaklaştırıldı. Endoteli korunmak istenen diğer aorta halkasında, endotelin zedelenmemesi için işlemler dikkatle gerçekleştirildi.

3.2.2. İzometrik gerim değişikliklerinin kayıt edilmesi

İzole edilen torasik aorta halka preparatları içinden geçirilen üçgen şeklindeki iki adet çelik tel aracılığıyla, *Krebs-Henseleit* çözeltisi ([mM]: NaCl, 118.2; KCl, 4.7; MgSO.7H₂O, 1.2; CaCl₂, 2.5; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; glukoz, 11.1) içeren, 10 ml'lik çift ceketli cam organ banyolarında, bir ucu izometrik kuvvet-yer değiştirme transdüsörüne (BioPac, FDT 05, MAY, Türkiye) bağlı, diğeri ucu ise organ askısına sabitlenmiş şekilde asıldı ve termostatik kontrollü bir su sirkülatörü (WBC3044V3, MAY, Türkiye) aracılığıyla 37°C sabit sıcaklıkta tutuldu (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. İzole organ banyosuna asılmış bir sıçan izole torasik aorta halka preparatı. Çözelti, deney boyunca sürekli olarak %95 O₂ ve %5 CO₂ karışımı ile gazlandırıldı.

İzole organ banyoları içine eklenerek uygulanan test maddelerine yanıt olarak düz kas preparatlarında oluşan izometrik gerim değişiklikleri, bilgisayar aracılı bir fizyolojik veri toplama ve kaydetme sistemi (BIOPAC MP100, MAY, Türkiye) kullanılarak kaydedildi. Tüm preparatlar 1 g gerim altında 60 dakika boyunca dinlenme sürecine bırakıldı. Bu süreçte preparatlar her 15 dakikada bir taze çözelti ile yıkandı.

İzole organ banyosu düzeneğinde 0,01 mM asetilkolinin (ACh) oluşturduğu gevşeme yanıtlarının fenilefrin ön-kasılmasının %20'sinden fazla olduğu preparatlarda endotelin korunduğu (endotel+) kabul edilirken; gevşeme gerçekleşmeyen preparatlar endotel (-) olarak kabul edildi (108).

3.2.3. Endotel (+) / endotel (-) aorta halkalarında fenilefrin ile oluşturulan kasılma yanıtları üzerine asitretinin etkisinin gösterildiği çalışmalar

Ardışık olarak artan konsantrasyonlarda (10^{-12} – 10^{-4} M) fenilefrin (α_1 -adrenerjik agonist) kullanılarak konsantrasyon-kasılma cevabı eğrisi elde edildi. Ardından, maksimum kasılma cevabının %60-80'ini oluşturan konsantrasyon submaksimal fenilefrin konsantrasyonu olarak kabul edildi (109). Preparatlarda endotelin uzaklaştırılması submaksimal konsantrasyonda fenilefrin ile kasılan preparata ACh (10^{-5} M) uygulanarak gevşeme cevabı oluşup-oluşmaması yoluyla test edildi. Sonrasında, endotel (+) ve endotel (-) preparatlarda submaksimal konsantrasyonda fenilefrin ile kasılma yanıtlarını takiben artan konsantrasyonlarda asitretin (10^{-12} – 10^{-4} M) ile gevşeme yanıtları elde edildi.

3.2.4. Asitretin ile inkübasyonun fenilefrin kasılma yanıtlarına etkisinin gösterildiği çalışmalar

Asitretinin, fenilefrinin alfa-1 adrenerjik reseptöre bağlanması üzerine etkisini incelemek için üç farklı konsantrasyonda (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M) asitretin ile 20 dakikalık inkübasyondan sonra artan konsantrasyonlarda (10^{-12} – 10^{-4} M) fenilefrin kullanılarak konsantrasyon-kasılma cevabı eğrisi elde edildi ve asitretinin alfa-1 adrenerjik reseptör antagonistik etkisinin olup olmadığını ortaya koymak üzere eğriler karşılaştırıldı.

3.2.5. Asitretinin damar gevşetici etkisinde retinoik asit reseptörlerinin rolünün gösterildiği çalışmalar

Asitretinin retinoik asit reseptörleri üzerinden meydana gelebilecek olası etkilerini incelemek için retinoik asit reseptörlerinin (RAR ve RXR) antagonistleri (sırasıyla AGN 193109 [10^{-5} M] ve HX-531 [10^{-5} M]) ile 120 dakikalık inkübasyon periyodundan sonra submaksimal konsantrasyonda fenilefrin kullanılarak kasılma cevabı alındı ve ardından asitretin (10^{-12} – 10^{-4} M) ile elde edilen gevşeme cevaplarındaki değişiklikler incelendi. Protokolde kullanılan RAR ve RXR konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri hücre kültürü çalışmalarını içeren mevcut literatüre göre belirlendi (110).

3.2.6. Asitretinin damar gevşetici etkisinde nitrik oksidin rolünün gösterildiği çalışmalar

Asitretinin damar düz kasını gevşetici etkisinde nitrik oksitin olası rolünü ortaya koymak için eNOS inhibitörü [L-NAME (10^{-4} M)] ile 30 dakika inkübasyon (110) sonrasında submaksimal konsantrasyonda fenilefrin ile kasılma yanıtı alındı ve ardından asitretinin artan konsantrasyonlarında (10^{-12} - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları incelendi.

3.2.7 Asitretinin damar gevşetici etkisinde adenilat siklaz ve guanilat siklazın rolünün gösterildiği çalışmalar

Damar düz kas gevşeme mekanizmasında rolü olan adenilat siklaz ve guanilat siklaz enzimlerinin inhibe edilmesinin asitretinin meydana getirdiği gevşeme yanıtlarına etkisini incelemek amacıyla adenilat siklaz inhibitörü (SQ22536; 10^{-5} M) (111) ve guanilat siklaz inhibitörü (*oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one*; ODQ; 10^{-6} M) (112) ile 30 dakikalık inkübasyondan sonra submaksimal konsantrasyonda fenilefrine bağlı kasılma yanıtları alındı ve ardından artan konsantrasyonda asitretin ile (10^{-12} - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları elde edildi.

3.2.8. Asitretinin damar gevşetici etkisinde potasyum kanallarının rolünün gösterildiği çalışmalar

Damar düz kas gevşeme mekanizmasında rolü olan potasyum kanallarının inhibe edilmesinin asitretinin meydana getirdiği gevşeme yanıtlarına etkisini incelemek amacıyla non-spesifik potasyum kanal blokörü (tetraetilamonyum - TEA; 10^{-2} M) (113) ile 30 dakikalık inkübasyondan sonra submaksimal konsantrasyonda fenilefrine bağlı kasılma yanıtları alındı ve ardından artan konsantrasyonda asitretin ile (10^{-12} - 10^{-4} M) elde edilen gevşeme yanıtları kaydedildi.

Asitretinin çözücüsü olan dimetilsülfoksit (DMSO) (10^{-12} - 10^{-4} M konsantrasyon aralığında uygulanacak olan asitretini çözmek için kullanılan miktarlarda) ile tüm deney protokolleri tekrarlandı.

3.2.9. İzole organ banyosunda kullanılan test maddeleri

Asitretin (Retinoik asit türevi, Sigma, Almanya)

Fenilefrin hidroklorür (FE; α_1 -adrenoseptör agonisti, Sigma, Almanya)

Asetilkolin klorür (ACh; seçici olmayan kolinerjik agonist, Sigma, İsviçre)

AGN 193109 (AGN; pan-retinoik asit reseptör antagonisti, Sigma, Almanya)

HX-531 (retinoid X reseptör antagonisti, Sigma, Almanya)

N ω -Nitro-L-arginin-metil-ester-hidroklorür (L-NAME; endotelial NO sentaz inhibitörü, Sigma, Almanya)

SQ 2256 (adenilat siklaz inhibitörü, Sigma, Almanya)

Oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ; çözünebilir guanilat siklaz inhibitörü, Sigma, Almanya)

TEA (tetraetilamonyum, non-spesifik potasyum kanal blokörü, Sigma, Almanya)

DMSO (dimetilsülfoksit, çözücü, Sigma, Almanya)

ODQ, AGN193109, HX-531 ve SQ22536, dimetilsülfoksit (DMSO, %100 saflıkta) içinde çözüldü. Ayrıca başka bir çözücüsünün olmadığı literatür bilgileri ile desteklenerek asitretin için de çözücü olarak DMSO kullanıldı. Kullanılan test maddeleri stok çözeltilerden seyreltilerek her deney gününde taze olarak hazırlandı. Kullanılan tüm test maddelerinin konsantrasyonları organ banyosundaki son konsantrasyon olacak şekilde hesaplandı. İzometrik gerim değişikliği cevapları miligram olarak kaydedildi. Asitretin gevşeme yanıtları, submaksimal konsantrasyonda fenilefrin ile elde edilen kasılma yanıtlarının yüzdesi (%) olarak ifade edildi.

3.2.10. İstatistiksel analiz

Çalışmada gruplar arasında zamana göre doz karşılaştırmalarını incelemek için tekrarlı ölçümlerde iki-yönlü ANOVA testi sonrasında *post-hoc* Bonferroni testi kullanıldı. Analizler sonucunda elde edilen bulgular ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ($\bar{x} \pm S.E.M$) olarak ifade edildi, sonuçların yorumlanmasında istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Verilerin değerlendirilmesinde SPSS sürüm 25.0 programı kullanıldı.

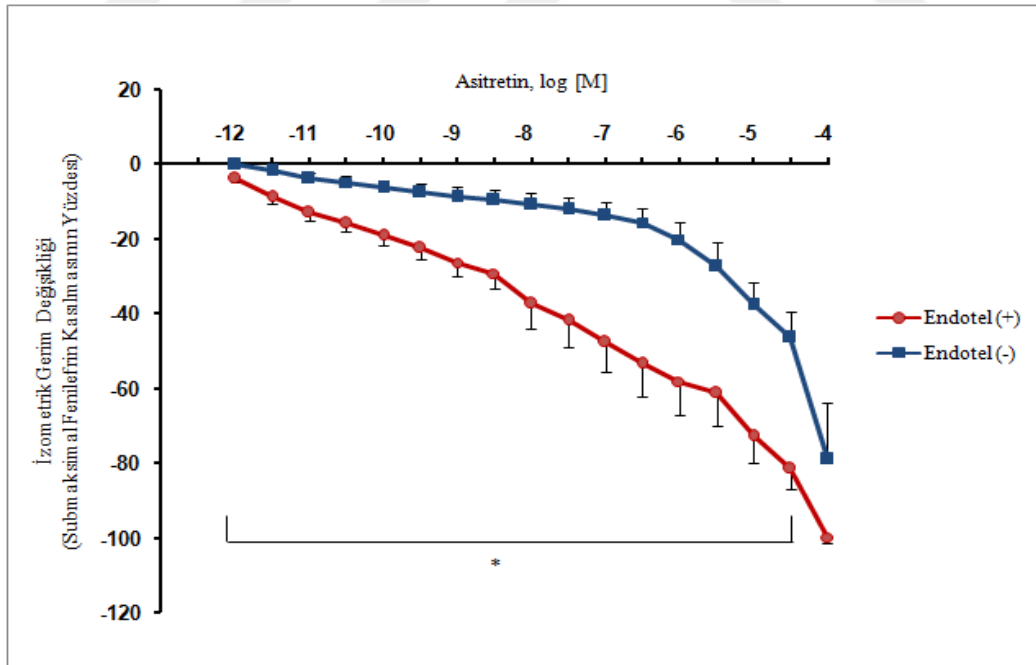
Çalışma ilacı asitretinin temininde yaşanan sorunlar nedeniyle E_{maks} ve EC_{50} değerlerinin hesaplanması ve analizi gerçekleştirilememiş; beklenen şekilde sigmoid yapıya sahip konsantrasyon-yanıt eğrilerinin elde edilmesi de mümkün olmamıştır.

4. BULGULAR

4.1 Endoteli Korunmuş ve Uzaklaştırılmış Aorta Halkalarında Fenilefrin İle Oluşturulan Kasılma Yanıtları Üzerine Asitretinin Etkisi

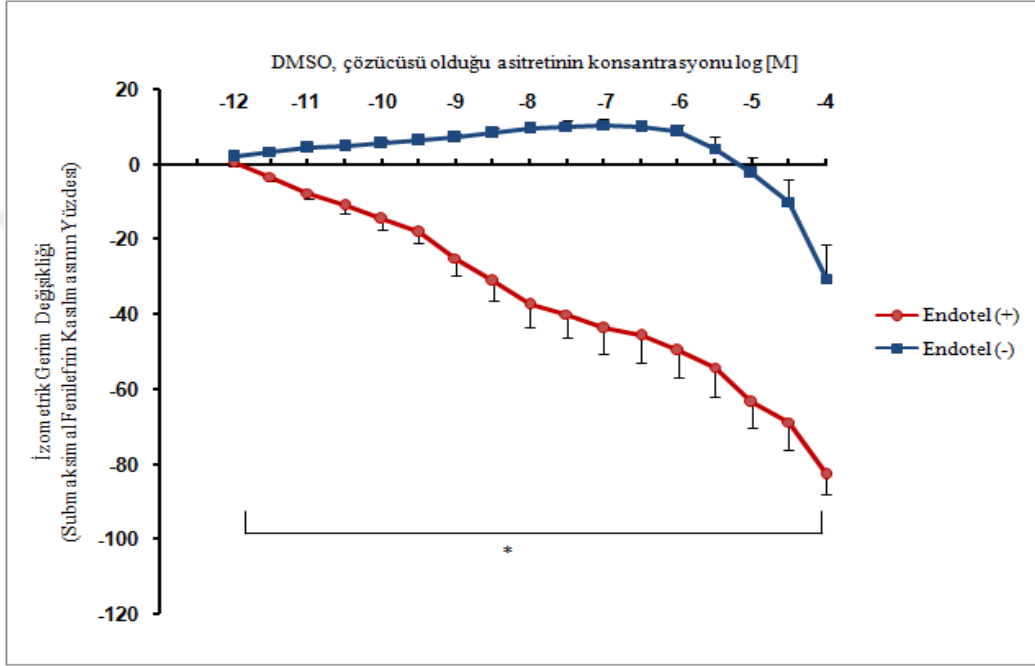
Alfa₁-adrenoseptör agonisti fenilefrin ile submaksimal ön-kasılma cevabı elde edilen aorta preparatlarının bulunduğu banyo ortamına kümülatif artan konsantrasyonlarda (10^{-12} – 10^{-4} M) eklenen asitretin, hem endoteli korunmuş (endotel +) hem de endoteli uzaklaştırılmış (endotel -) aorta halkalarında gevşeme yanıtına neden oldu. 10^{-12} – 3×10^{-5} M konsantrasyon aralığında asitretinin meydana getirdiği gevşeme cevabı, endotel (+) preparatlarda endotel (-) olanlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazlaydı ($p < 0,05$; Şekil 4.1).

Asitretin ile izlenen bu gevşeme etkisinin konsantrasyona bağımlı olarak arttığı görüldü. Önceden belirtildiği üzere maksimum etkinin izlenebileceği konsantrasyonlarda asitretinin uygulanması mümkün olmadığı için E_{maks} değeri elde edilemedi. Yine bu durumun bir sonucu olarak elde edilen eğriler sigmoid yapıya sahip değildi.



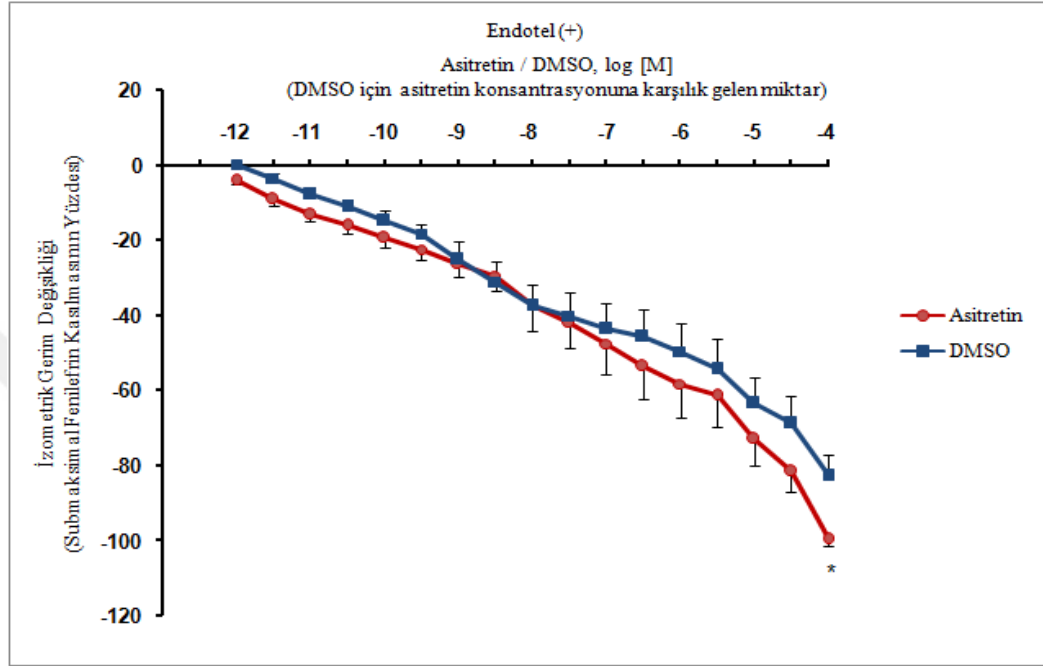
Şekil 4.1. Endotel (+) ve endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılma cevabı üzerine artan konsantrasyonlarda (10^{-12} – 10^{-4} M) uygulanan asitretinin etkisi (n=10). * $p < 0,05$; anlamlı olarak endotel (-) gruptan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Benzer şekilde asitretinin çözücüsü DMSO'nun artan miktarları (10^{-12} – 10^{-4} M asitretin konsantrasyonuna karşılık gelen) ile deney tekrarlandığında; endotel (-) preparatlarda 10^{-12} - 10^{-7} M konsantrasyon aralığında kasılma yanıtı izlendi ve daha yüksek konsantrasyonlarda ise kasılmayı gevşeme yanıtı takip etti. Endotel (+) preparatlarda ise tüm konsantrasyonlarda (10^{-12} - 10^{-4} M) belirgin bir gevşeme yanıtı meydana geldiği görüldü ($p<0,05$; Şekil 4.2).



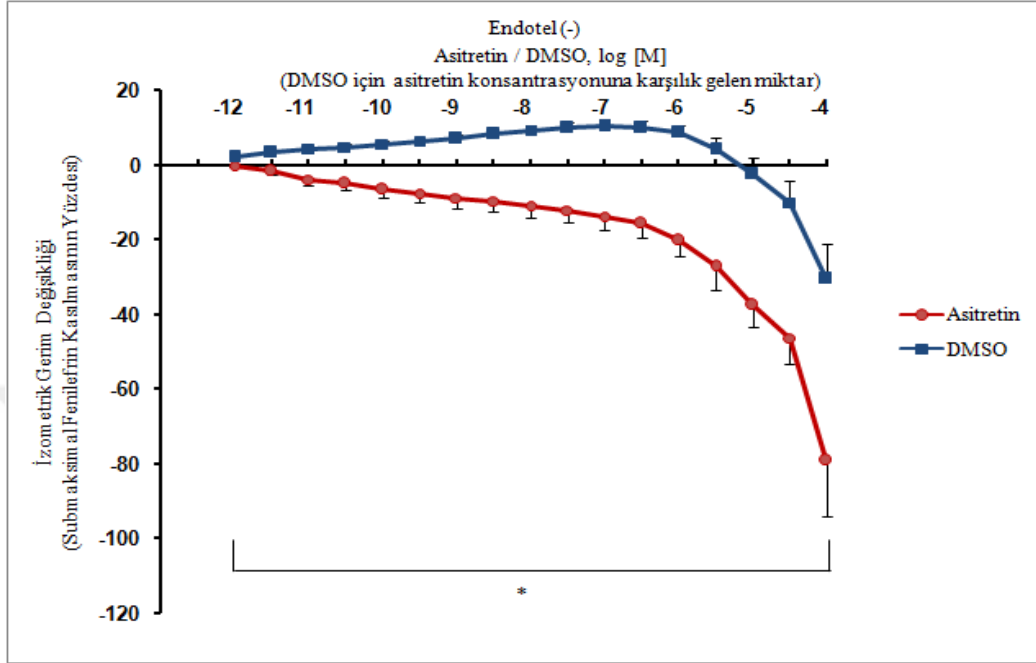
Şekil 4.2. Endotel (+) ve endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılma cevabı üzerine artan miktarlarda uygulanan 10^{-12} - 10^{-4} M asitretin konsantrasyonuna karşılık gelen DMSO'nun etkisi (n=10). * $p<0,05$; anlamlı olarak endotel (-) gruptan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Endotel (+) preparatlarda asitretin ve çözücüsü olan DMSO'nun submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine gevşetici etkileri karşılaştırıldığında; asitretin ve DMSO konsantrasyon-cevap eğrileri arasında sadece 10^{-4} M konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0,05$; Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Endotel (+) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön- kasılması üzerine uygulanan asitretin ve DMSO'nun artan konsantrasyonlarda etkisi (n=10). * $p<0.05$, anlamlı olarak DMSO'dan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Endotel (-) preparatlarda benzer karşılaştırma yapıldığında ise; 10^{-12} – 10^{-4} M konsantrasyon aralığında asitretinin DMSO yanıtlarından farklı olarak belirgin gevşeme yanıtı meydana getirdiği gözlemlendi ($p<0,05$; Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön- kasılması üzerine uygulanan asitretin ve DMSO'nun artan konsantrasyonlarda etkisi (n=10). * $p<0,05$, anlamlı olarak DMSO'dan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

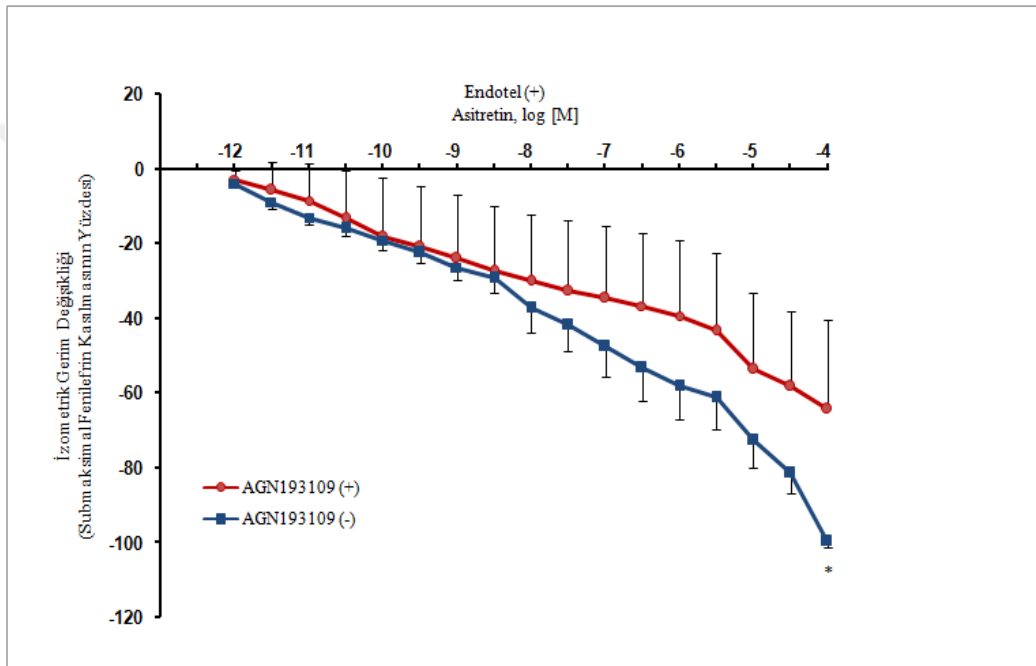
4.2. Asitretinin Damar Gevşetici Etkisinde Alfa-1 Adrenoseptörlerin bloke edilmesinin rolü

Asitretinin damar düz kası gevşetici etkisinde alfa-1 adrenerjik reseptörlerin rolünün araştırıldığı deneylerde, asitretin yokluğunda ve asitretinin üç farklı konsantrasyonu ile (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) (n=6) 20 dakika inkübasyon sonrası alfa-1 adrenerjik reseptör agonisti fenilefrinin artan konsantrasyonları uygulanarak (10^{-10} – 3×10^{-4} M) endotel (+) ve (-) torasik aorta preparatlarında konsantrasyon-kasılma cevabı eğrileri elde edildi ve eğriler arasındaki fark araştırıldı. Eğriler karşılaştırıldığında asitretinin gevşetici etkisinde fenilefrin kasılmalarına aracılık eden α_1 -adrenerjik reseptörlerin bloke edilmesinin rolü olabileceğini destekleyecek bir fark saptanmadı (veri gösterilmedi).

4.3. Asitretinin Damar Gevşetici Etkisinde Retinoik Asit Reseptörlerinin Rolü

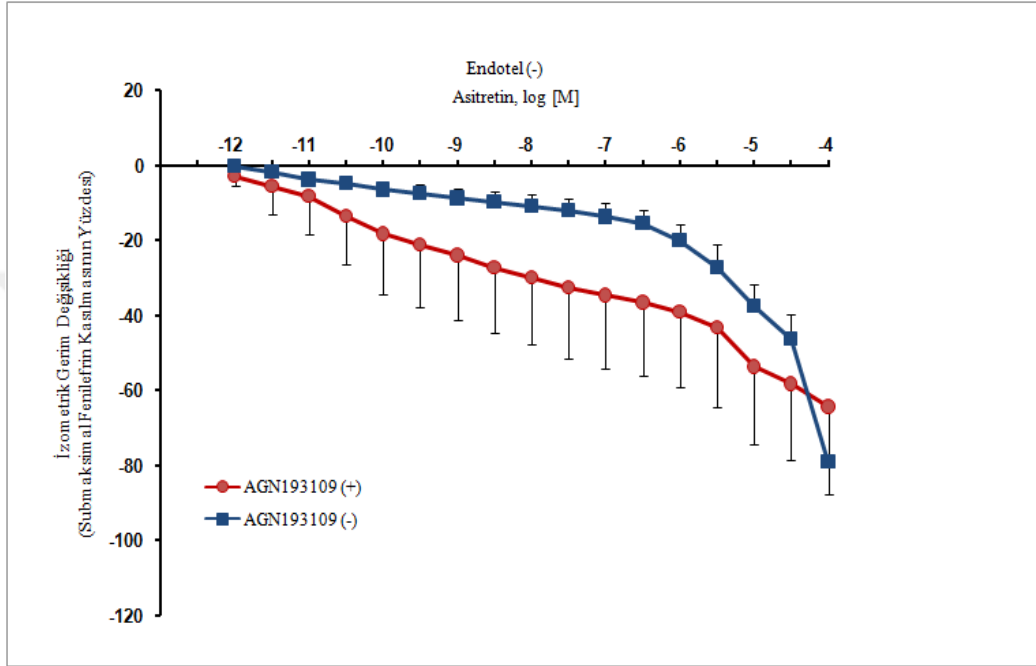
4.3.1. Asitretinin damar gevşetici etkisinde RAR'ın rolü

Endotel (+) aorta preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması sonrası asitretinin artan konsantrasyonları (10^{-12} – 10^{-4} M) ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine RAR antagonisti AGN193109'un (10^{-5} M; 2 saat inkübasyon) etkisinin araştırıldığı deneylerde sadece asitretinin kullanılan en yüksek konsantrasyonu olan 10^{-4} M konsantrasyonda anlamlı bir fark saptandı ($p<0,05$; Şekil 4.5).



Şekil 4.5. AGN193109 (RAR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=3) ve edilmeyen (n=10) endotel (+) sıçan izole torasik halka aorta preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan konsantrasyonlarda uygulanan asitretinin etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “AGN193109 ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

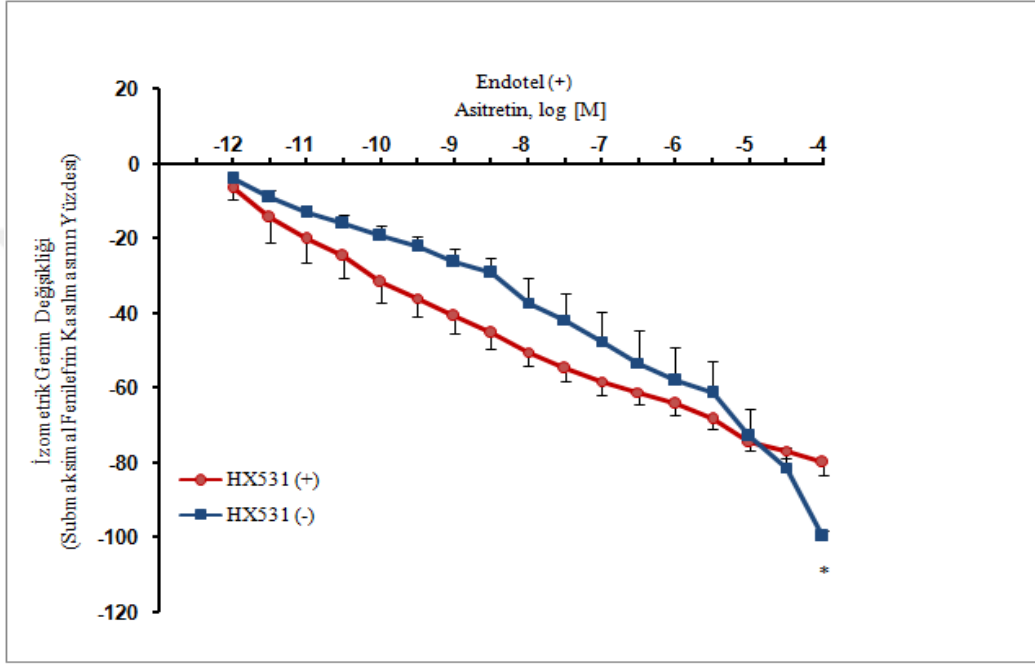
Endotel (-) sıçan aorta preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması sonrası asitretinin artan konsantrasyonları (10^{-12} – 10^{-4} M) ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine RAR antagonisti AGN193109'un (10^{-5} M; 2 saat inkübasyon) etkisinin araştırıldığı deneylerde ise asitretinin meydana getirdiği gevşeme yanıtlarında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$; Şekil 4.6).



Şekil 4.6. AGN193109 (RAR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=3) ve edilmeyen (n=10) endotel (-) sıçan izole torasik halka aorta preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan konsantrasyonlarda uygulanan asitretinin etkisi. Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

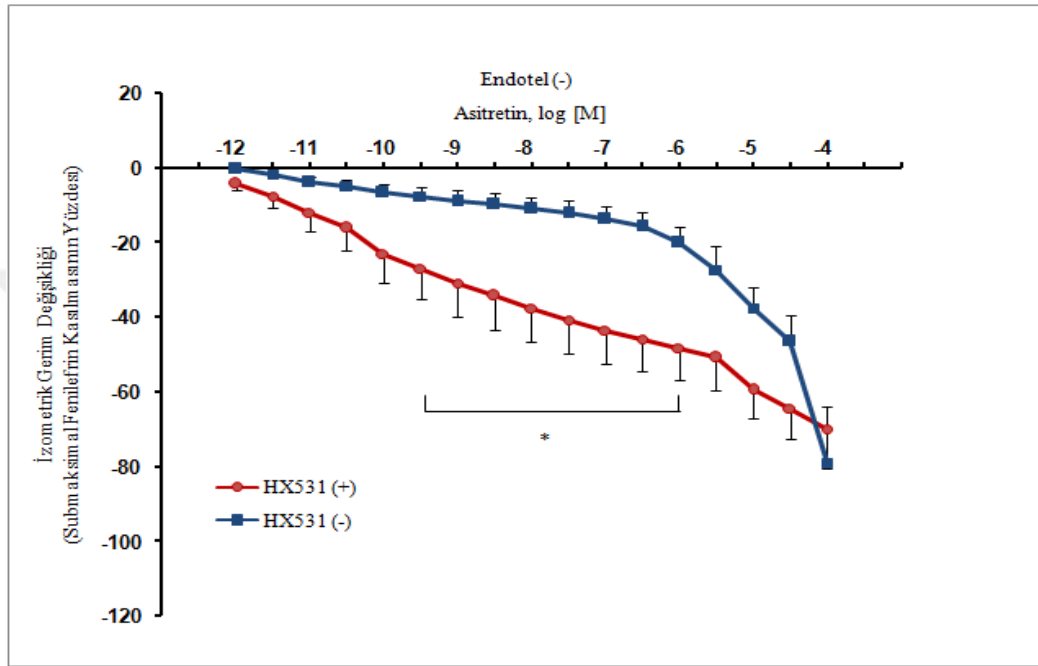
4.3.2. Asitretinin damar gevşetici etkisinde RXR'ın rolü

Endotel (+) sıçan torasik aorta preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması sonrası asitretinin artan konsantrasyonları (10^{-12} – 10^{-4} M) ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine RXR antagonisti HX531'in (10^{-5} M; 2 saat inkübasyon) etkisinin araştırıldığı deneylerde sadece 10^{-4} M konsantrasyonda anlamlı bir fark saptandı ($p<0,01$; Şekil 4.7).



Şekil 4.7. HX531 (RXR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (+) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan konsantrasyonlarda uygulanan asitretinin etkisi. * $p<0,01$; anlamlı olarak “HX531 ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

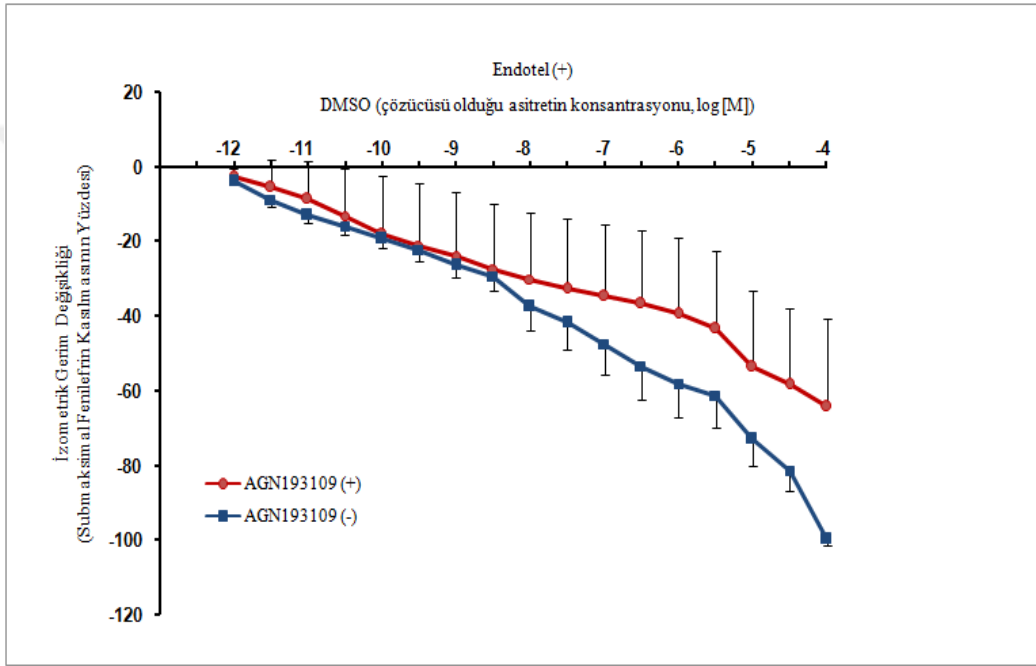
Endotel (-) sıçan aorta preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması sonrası asitretinin artan konsantrasyonları (10^{-12} – 10^{-4} M) ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine RXR antagonisti HX531'in (10^{-5} M; 2 saat inkübasyon) etkisinin araştırıldığı deneylerde ise asitretinin meydana getirdiği gevşeme yanıtının 3×10^{-9} – 10^{-6} M konsantrasyon aralığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı saptandı ($p < 0,05$; Şekil 4.8).



Şekil 4.8. HX531 (RXR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan konsantrasyonlarda uygulanan asitretinin etkisi. * $p < 0,05$; anlamlı olarak “HX531 ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

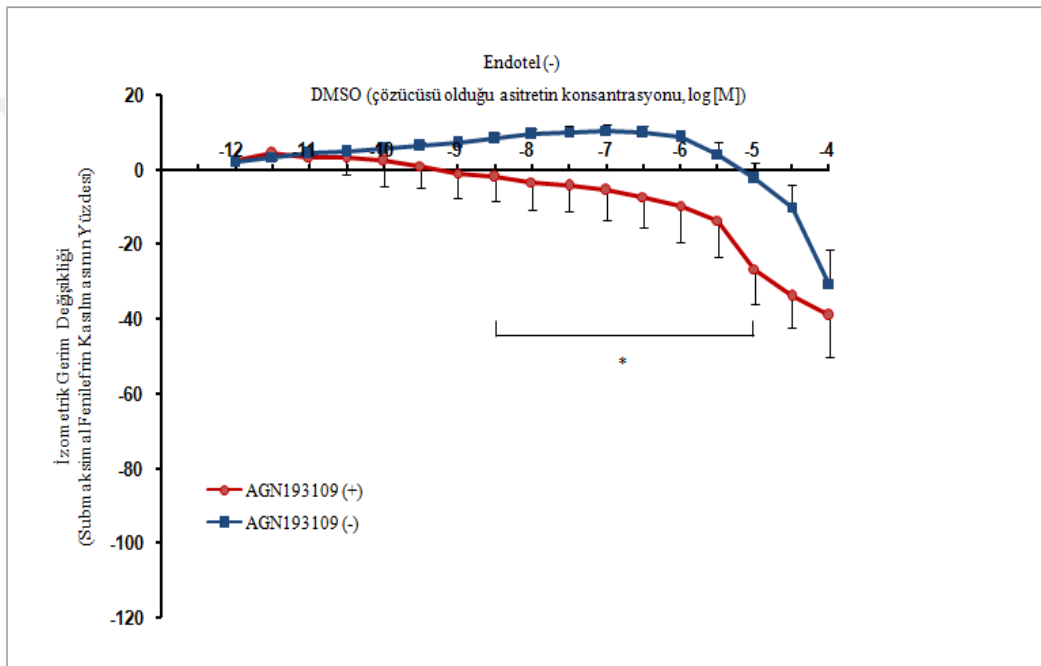
4.3.3. Asitretin çözücüsü DMSO'nun damar gevşetici etkisinde RAR'ın rolü

Endotel (+) sıçan torasik aorta preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması sonrası asitretinin çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun artan miktarda (10^{-12} – 10^{-4} M asitretin konsantrasyonuna karşılık gelen) banyo ortamına eklenmesi ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine RAR antagonisti AGN193109'un (10^{-5} M; 2 saat inkübasyon) etkisinin araştırıldığı deneylerde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$; Şekil 4.9).



Şekil 4.9. AGN193109 (RAR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=3) ve edilmeyen (n=10) endotel (+) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan miktarlarda uygulanan DMSO'nun etkisi. Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

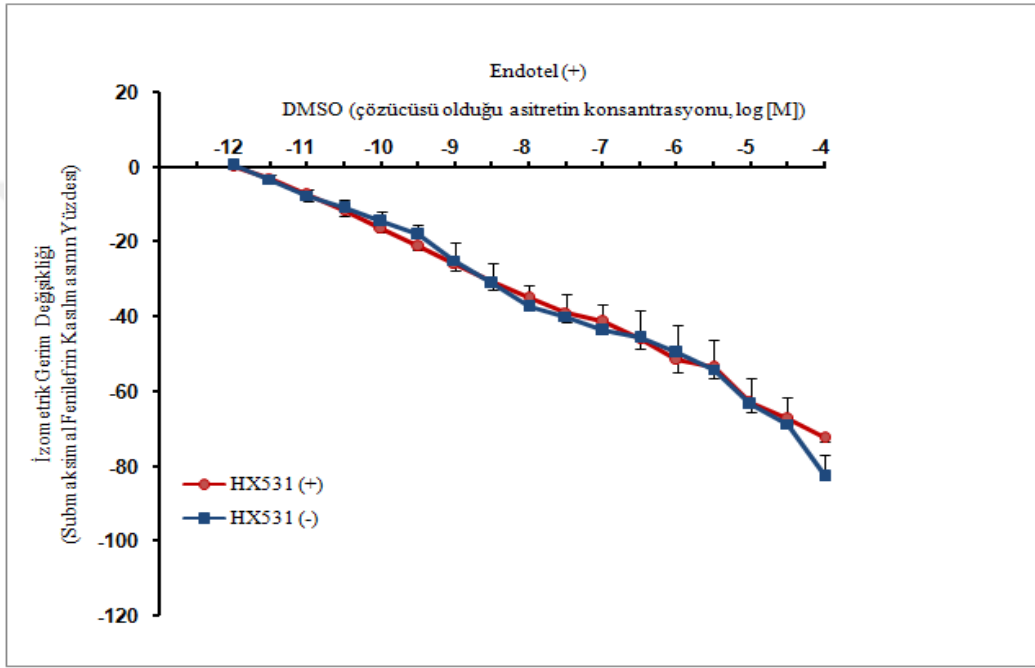
Benzer protokol endotel (-) preparatlarda uygulandığı zaman; AGN193109 inkübasyonu yapılmayan grupta DMSO ile düşük konsantrasyonlarda (10^{-12} – 10^{-7} M) kasılma ve yüksek konsantrasyonlarda (3×10^{-6} – 10^{-4} M) gevşeme yanıtı izlendi. Bu sonucun aksine AGN193109 inkübasyonu sonrasında DMSO'nun artan miktarda (10^{-12} – 10^{-4} M asitretin konsantrasyonuna karşılık gelen) eklenmesi ile 3×10^{-11} M konsantrasyondan itibaren gevşeme yanıtları elde edildi. AGN193109 varlığında veya yokluğunda elde edilen yanıtlar arasında 3×10^{-8} – 10^{-5} M konsantrasyon aralığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$; Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Submaksimal fenilefrin ile ön-kasılmış endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında AGN193109 (RAR antagonisti, 10^{-5} M) varlığında ($n=3$) ve yokluğunda ($n=10$) artan konsantrasyonlarda uygulanan DMSO ile elde edilen izometrik gerim değişikliği yanıtı eğrileri. * $p < 0,05$; anlamlı olarak “AGN193109 ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

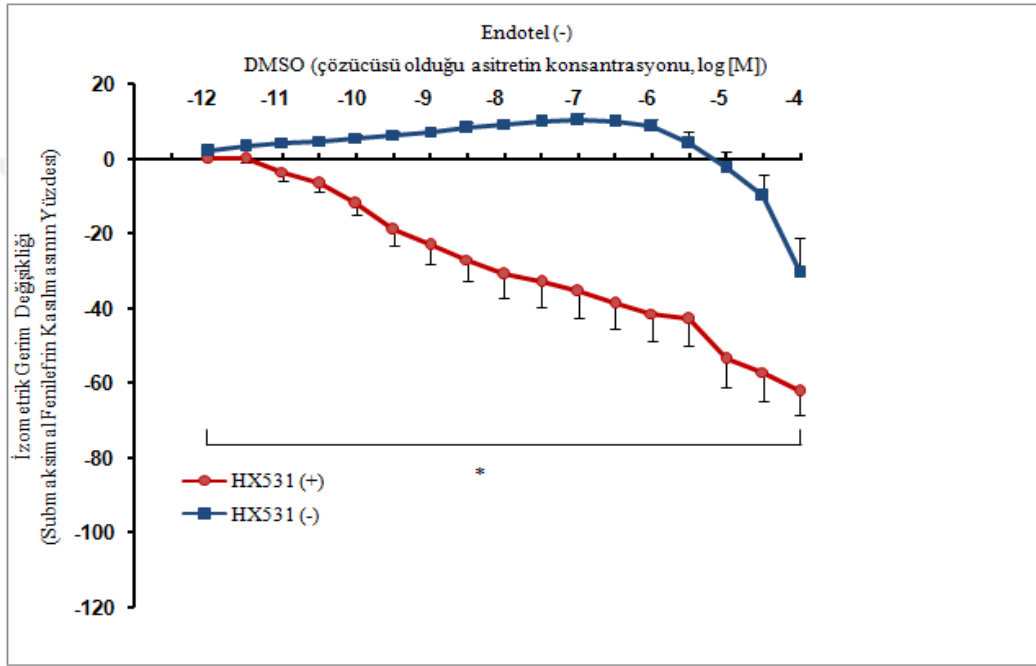
4.3.4. Asitretin çözücüsü DMSO'nun damar gevşetici etkisinde RXR'ın rolü

Endotel (+) sıçan torasik aorta preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması sonrası asitretinin çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun artan miktarda (10^{-12} – 10^{-4} M asitretin konsantrasyonuna karşılık gelen) banyo ortamına eklenmesi ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine RXR antagonisti HX531'in (10^{-5} M; 2 saat inkübasyon) etkisinin araştırıldığı deneylerde iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$; Şekil 4.11).



Şekil 4.11. HX531 (RXR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (+) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan miktarlarda uygulanan DMSO'nun etkisi. Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

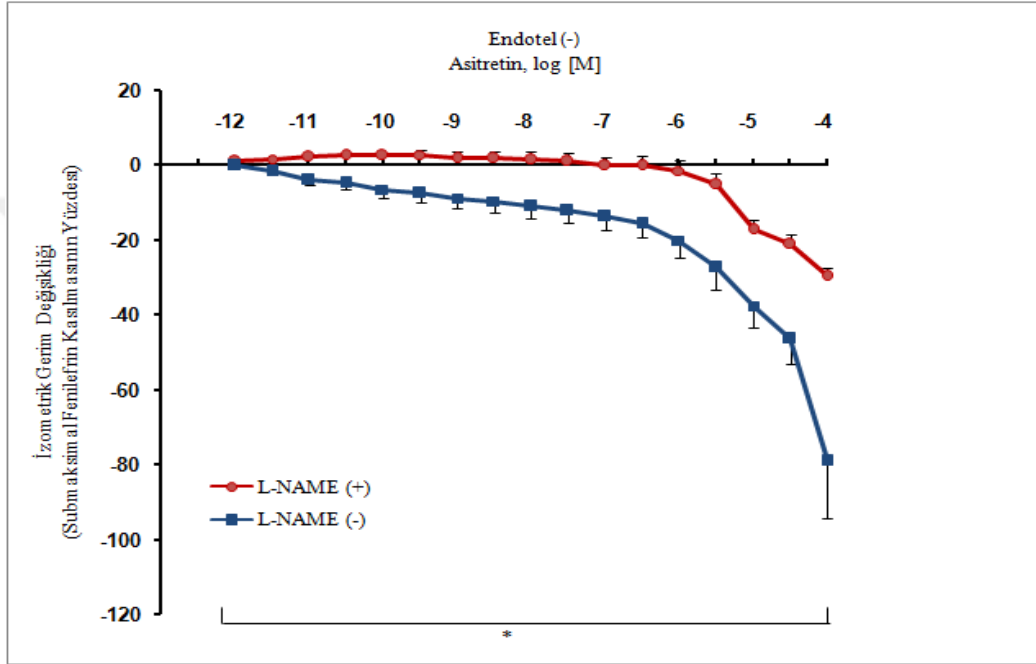
Öte yandan, aynı protokol endotel (-) preparatlarda uygulandığı zaman; HX531 inkübasyonu yapılmayan grupta DMSO ile düşük konsantrasyonlarda (10^{-12} – 10^{-7} M) kasılma ve yüksek konsantrasyonlarda (3×10^{-6} – 10^{-4} M) gevşeme yanıtı izlendi. Bu sonucun aksine HX531 inkübasyonu sonrasında DMSO'nun artan miktarda (10^{-12} – 10^{-4} M asitretin konsantrasyonuna karşılık gelen) eklenmesi ile tüm konsantrasyonlarda gevşeme yanıtları elde edildi. HX531 varlığında veya yokluğunda elde edilen yanıtlar arasında tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$; Şekil 4.12).



Şekil 4.12. HX531(RXR antagonisti, 10^{-5} M) ile 2 saat inkübe edilen (n=6) ve edilmeyen (n=10) endotel (-) sıçan izole torasik aorta haşka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan miktarlarda uygulanan DMSO'nun etkisi. * $p < 0,05$; anlamlı olarak “HX531 ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

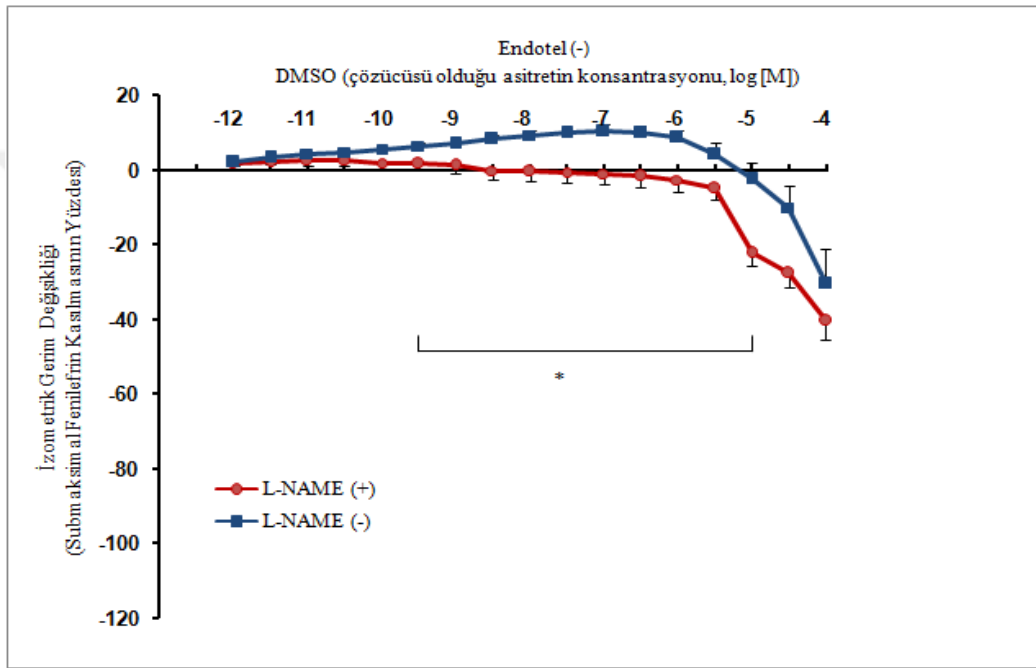
4.4. Asitretinin Damar Gevşetici Etkisinde Nitrik Oksidin Rolü

Endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarının nitrik oksit sentaz (e-NOS) inhibitörü L-NAME (10^{-4} M) ile 30 dakika inkübasyonu sonrası asitretinin artan konsantrasyonlarının (10^{-12} – 10^{-4} M) banyo ortamına eklenmesiyle elde edilen gevşeme yanıtlarında tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,05$; Şekil 4.13).



Şekil 4.13. L-NAME (NOS inhibitörü, 10^{-4} M) ile 30 dakika inkübe edilen ($n=6$) ve edilmeyen ($n=10$) endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan konsantrasyonlarda uygulanan asitretinin etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “L-NAME ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

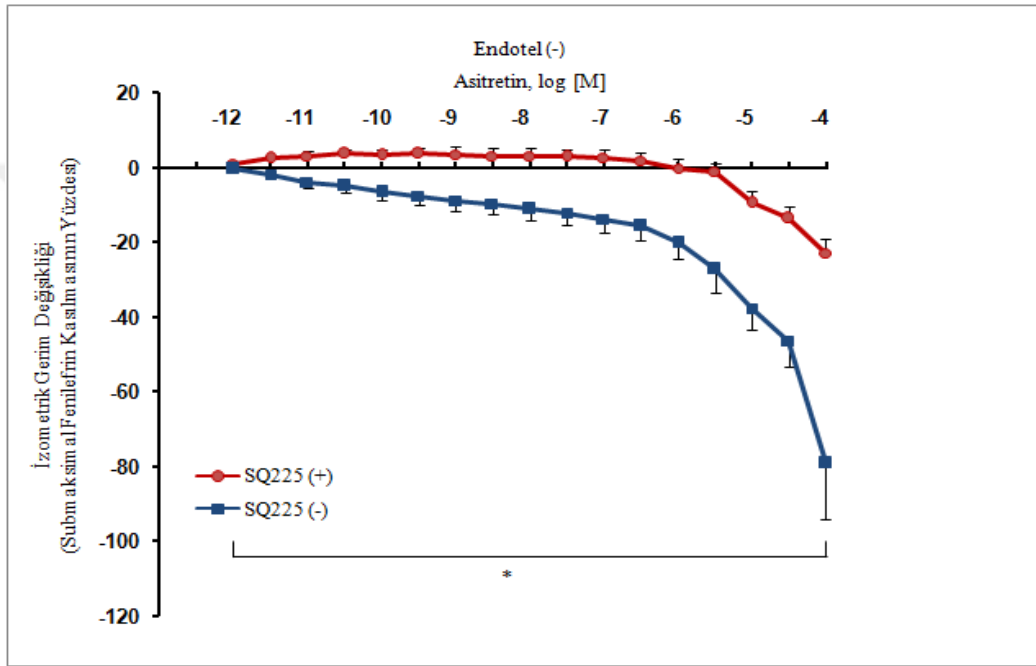
DMSO'nun düşük konsantrasyonlarda (10^{-12} – 10^{-7} M) oluşturduğu kasılma ve yüksek konsantrasyonlarda (3×10^{-6} – 10^{-4} M) oluşturduğu gevşeme yanıtlarından farklı olarak L-NAME inkübasyonunu (10^{-4} M, 30 dakika) takiben DMSO'nun artan miktarda (10^{-12} – 10^{-4} M asitretin konsantrasyonuna karşılık gelen) eklenmesi ile 3×10^{-10} M konsantrasyondan itibaren gevşeme yanıtları elde edildi. Yapılan analizde; L-NAME varlığında veya yokluğunda elde edilen yanıtlarda 3×10^{-9} – 10^{-5} M konsantrasyon aralığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$; Şekil 4.14).



Şekil 4.14. L-NAME (NOS inhibitörü, 10^{-4} M) ile 30 dakika inkübe edilen ($n=6$) ve edilmeyen ($n=10$) endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan miktarlarda uygulanan DMSO'nun etkisi. $*p < 0,05$; anlamlı olarak “L-NAME ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

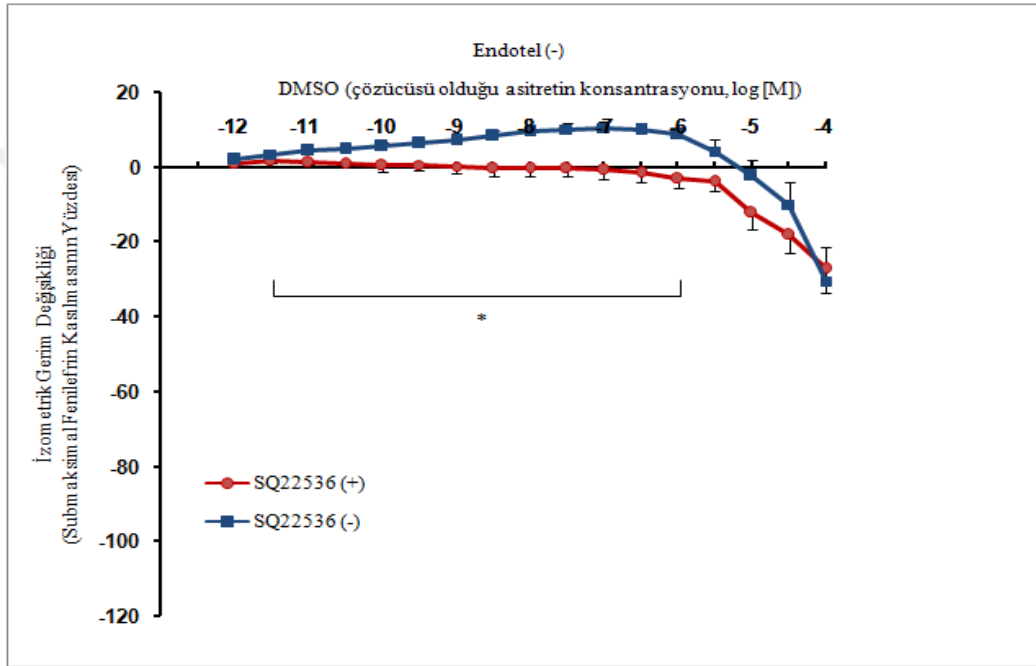
4.5. Asitretinin Damar Gevşetici Etkisinde Adenilat Siklaz / Guanilat Siklaz Enzimlerinin Rolü

Adenilat siklaz inhibitörü SQ22536 (10^{-5} M) ile 30 dakika inkübe edildikten sonra fenilefrinle ön-kasılma gerçekleştirilen endotel (-) sıçan torasik aorta preparatlarında asitretinin artan konsantrasyonlarıyla elde edilen gevşeme yanıtları, 10^{-12} – 10^{-4} M konsantrasyonları aralığında, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0,05$; Şekil 4.15).



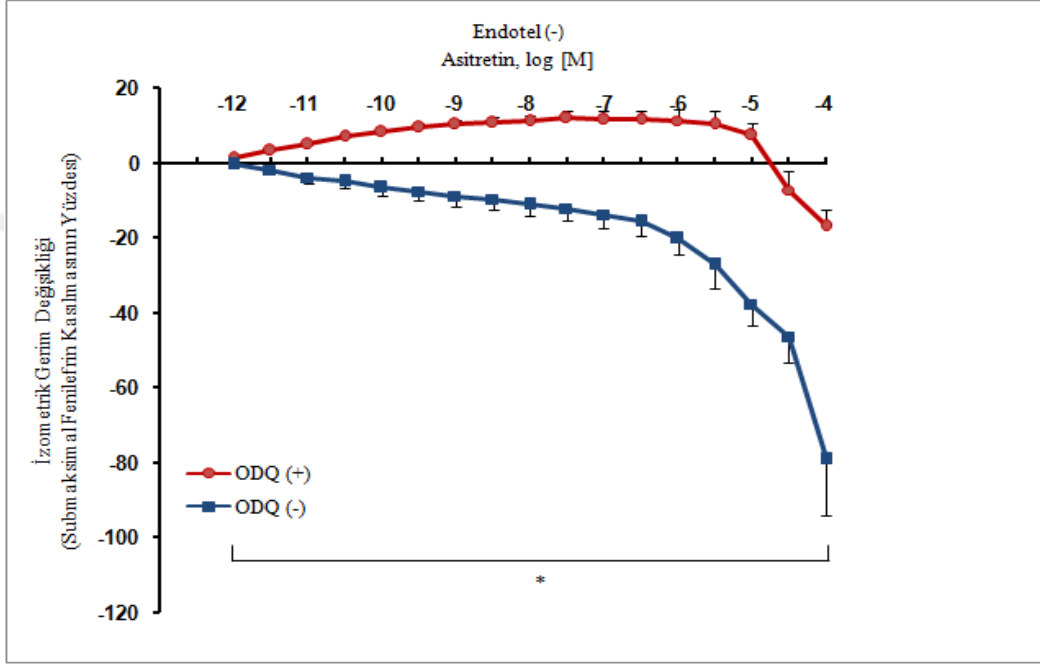
Şekil 4.15. SQ22536 (adenilat siklaz inhibitörü, 10^{-5} M) ile 30 dakika inkübe edilen ($n=6$) ve edilmeyen ($n=10$) endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine uygulanan asitretinin artan konsantrasyonlarda etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “SQ22536 inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

DMSO'nun düşük konsantrasyonlarda (10^{-12} – 10^{-7} M) meydana getirdiği kasılma ve yüksek konsantrasyonlarda (3×10^{-6} – 10^{-4} M) oluşturduğu gevşeme yanıtlarından farklı olarak SQ22536 inkübasyonunu (10^{-5} M, 30 dakika) takiben DMSO'nun artan miktarda (10^{-12} – 10^{-4} M asitretin konsantrasyonuna karşılık gelen) eklenmesi ile 10^{-7} M konsantrasyondan itibaren gevşeme yanıtları elde edildi. SQ22536 varlığında veya yokluğunda elde edilen yanıt eğrileri arasında 3×10^{-12} – 10^{-6} M konsantrasyon aralığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$; Şekil 4.16).



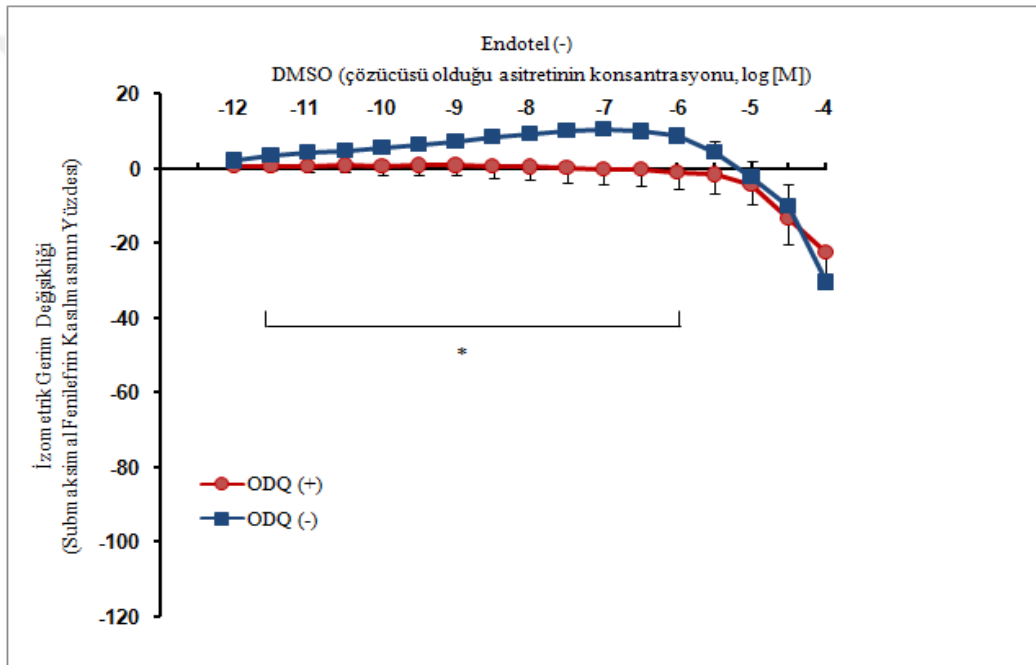
Şekil 4.16. SQ22536 (adenilat siklaz inhibitörü, 10^{-5} M) ile 30 dakika inkübe edilen ($n=6$) ve edilmeyen ($n=10$) endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine artan miktarlarda uygulanan DMSO etkisi. * $p < 0,05$; anlamlı olarak “SQ22536 ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Öte yandan, endotel (-) preparatlarda guanilat siklaz inhibitörü (*oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one*; ODQ; 10^{-6} M) ile 30 dakika inkübasyon sonrası submaksimal fenilefrin kasılması üzerine asitretin ile elde edilen gevşeme yanıtlarında anlamlı azalma, hatta 10^{-12} – 10^{-5} M konsantrasyon aralığında kasılma cevabı yönünde bir değişiklik saptandı. ODQ varlığında veya yokluğunda elde edilen yanıt eğrileri arasında tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p<0,05$; Şekil 4.17).



Şekil 4.17. ODQ (guanilat siklaz inhibitörü, 10^{-5} M) ile 30 dakika inkübe edilen ($n=6$) ve edilmeyen ($n=10$) endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında submaksimal fenilefrin ön-kasılması üzerine uygulanan asitretinin artan konsantrasyonlarda etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “ODQ inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

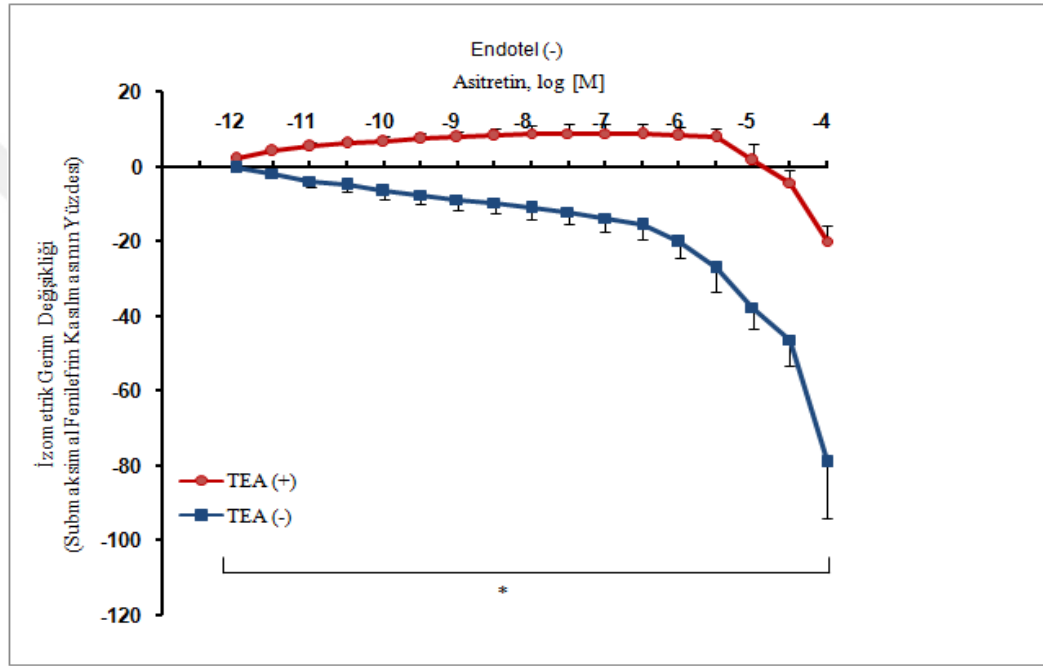
Guanilat siklaz inhibitörü ODQ (10^{-6} M, 30 dakika) ile inkübasyonun fenilefrin ile ön-kasılma oluşturulmuş endotel (-) torasik aorta preparatlarında DMSO'nun oluşturduğu cevaba etkisinin araştırıldığı deneylerde ise; DMSO'nun artan miktarlarıyla (10^{-12} – 10^{-4} M asitretin konsantrasyonuna karşılık gelen miktarlarda) elde edilen düşük konsantrasyonlarda (10^{-12} – 10^{-7} M) kasılma, yüksek konsantrasyonlarda (3×10^{-6} – 10^{-4} M) gevşeme şeklindeki yanıtlarda, 3×10^{-12} – 3×10^{-7} M konsantrasyon aralığında, ODQ ile inkübasyon sonrası kasılma yanıtının ortadan kalktığı ve 3×10^{-6} M konsantrasyondan itibaren de gevşeme yanıtının meydana geldiği gözlemlendi. İki eğrinin kıyaslamasında ise 3×10^{-12} – 10^{-6} M konsantrasyon aralığında anlamlı farklılık izlendi ($p < 0,05$; Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Fenilefrin ile ön-kasılma gerçekleştirilmiş endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında DMSO'nun artan miktarlarının oluşturduğu cevap üzerine guanilat siklaz inhibisyonunun etkisi. * $p < 0,05$; anlamlı olarak “ODQ (guanilat siklaz inhibitörü, 10^{-5} M) ile inkübasyon (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

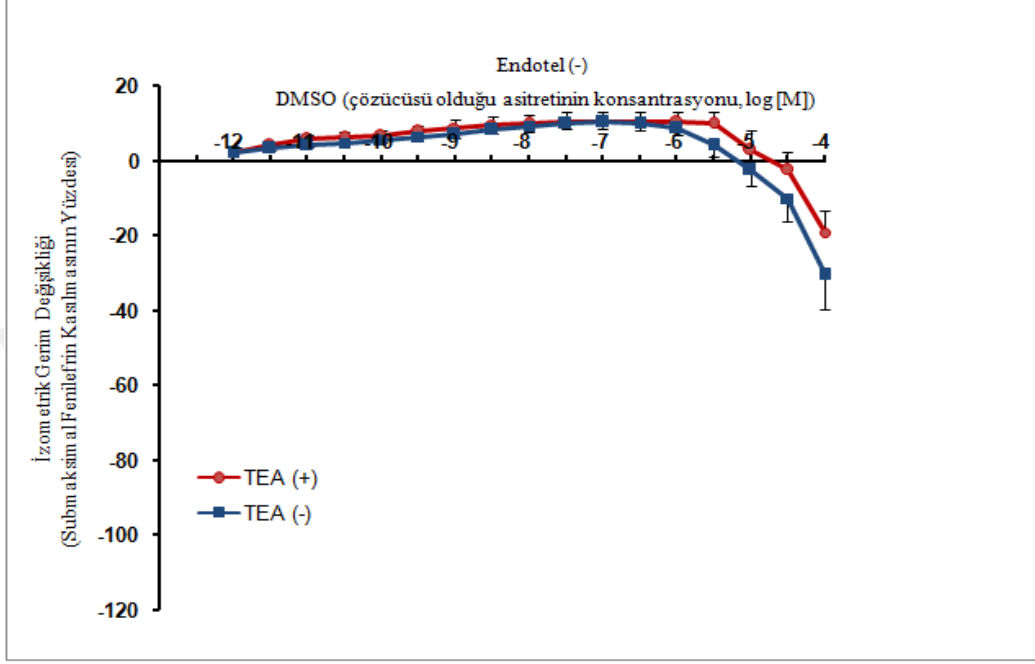
4.6. Asitretinin Damar Gevşetici Etkisinde Potasyum Kanallarının Rolü

Endotel (-) preparatlarda non-spesifik potasyum kanal blokörü tetraetil amonyum (TEA, 10^{-2} M, 30 dakika) ile inkübasyon sonrası submaksimal fenilefrin kasılması üzerine asitretin ile elde edilen gevşeme yanıtlarında anlamlı azalma, hatta 10^{-12} – 10^{-6} M konsantrasyon aralığında kasılma cevabı yönünde bir değişiklik saptandı. TEA varlığında veya yokluğunda elde edilen yanıt eğrileri karşılaştırıldığında; tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı fark elde edildi ($p<0,05$; Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Fenilefrin ile ön-kasılma gerçekleştirilmiş endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında asitretinin artan konsantrasyonlarının oluşturduğu cevap üzerine non-spesifik potasyum kanal blokajının etkisi. * $p<0,05$; anlamlı olarak “TEA (tetraetilamonyum - 10^{-2} M) ile inkübasyon (10^{-2} M) (+)” grubundan farklı (tekrarlı ölçümlerde iki yönlü ANOVA sonrası *post-hoc* Bonferroni testi). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Öte yandan, fenilefrinle ön-kasılma oluşturulmuş endotel (-) preparatlarda TEA ile inkübasyon sonrasında DMSO (10^{-12} – 10^{-4} M asitretin konsantrasyonuna karşılık gelen miktarlarda)’nın artan miktarlarının meydana getirdiği yanıtlarda anlamlı değişiklik izlenmedi ($p>0,05$; Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Fenilefrin ile ön-kasılma gerçekleştirilmiş endotel (-) sıçan izole torasik aorta halka preparatlarında DMSO’nun artan miktarlarının oluşturduğu cevap üzerine non-spesifik potasyum kanal blokajının etkisi (tetraetilamonyum - 10^{-2} M). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, sıçan torasik aorta preparatında bir retinoik asit türevi olan asitretinin damar düz kasını gevşetici etkisinin ve mekanizmasının ortaya konması amaçlandı. Gerçekleştirilen deneylerde asitretin ile onun çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun endoteli korunmuş (endotel +) ve endoteli uzaklaştırılmış (endotel -) sıçan izole torasik aorta preparatlarında düz kas fonksiyonları üzerine olan etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Endotel (+) sıçan torasik aorta preparatlarında fenilefrin ile elde edilen ön kasılma yanıtlarını takiben hem asitretin hem de DMSO ile benzer gevşeme yanıtları elde edildi. Endotel (-) sıçan izole torasik aorta preparatlarında ise asitretin DMSO cevaplarından farklı olarak belirgin düzeyde gevşeme yanıtına yol açtı. Asitretinin bu etkisi sıçan izole torasik aorta preparatlarında gevşemenin endotelden bağımsız olabileceği şeklinde yorumlandı. Literatürde, DMSO'nun damar düz kasındaki gevşetici etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda (114, 115); esas olarak endotel (+) sıçan torasik aorta preparatlarında olmak üzere endotel (-) preparatlarda da gevşemeye neden olduğu gösterilmiştir. DMSO'nun bu etkisi, endotel (+) preparatlarda NO/cGMP sinyal yolağının uyarılması ve endotel (-) preparatlarda ise Ca^{+2} kanallarının duyarlılığının azalması ile ilişkilendirilmektedir. Çalışmamızda da, bu bilgilerle uyumlu olarak özellikle endotel (+) preparatlarda DMSO'nun damar gevşetici etkisi izlendi. Endotel (-) preparatlarda ise DMSO'nun gevşetici etkisi sadece yüksek konsantrasyonlarda tespit edildi. Sonuç olarak endotel (+) preparatlarda asitretininin gevşetici etkisinde çözücüsü olan DMSO'nun da rolü olduğu kanaatine varılırken; endotel (-) preparatlarda asitretin ile elde edilen gevşetici etkinin DMSO'dan bağımsız olduğu gösterildi ve çalışmada asitretinin gevşetici etki mekanizmasını ortaya koymak için endotel (-) preparatlarla devam edilmesine karar verildi. Asitretine özgü bu gevşetici etkinin mekanizmasını ortaya koymak üzere damar düz kasının gevşemesinde rolü olan çeşitli mekanizmalarda işlev gören reseptör, enzim veya iyon kanallarının antagonistleri ya da inhibitörleri varlığında deneyler gerçekleştirildi.

Öncelikle asitretinin alfa-1 adrenerjik reseptörler üzerindeki etkisi incelendi. Üç farklı konsantrasyonda yapılan asitretin inkübasyonu sonrasında fenilefrin ile konsantrasyon-kasılma eğrileri elde edildi. Eğriler arasında fark olmadığı saptanarak asitretinin gevşetici etkisinde alfa-1 adreseptörlerinin asitretin ile bloke edilmesinin, fenilefrin aracılı kasılma yanıtlarının ortadan kalkması ile, meydana gelen gevşeme

yanıtlarında rolü olmadığına karar verildi. Ardından, asitretinin damar düz kasındaki gevşetici etkisine retinoik asit reseptörlerinin olası katkısının belirlenmesi adına RAR ve RXR varlığında gevşeme yanıtları incelendi. RAR antagonisti varlığında asitretin ile elde edilen gevşeme yanıtlarında bir değişiklik izlenmedi. Bunun aksine RXR antagonisti ile inkübasyon sonrasında asitretin ile elde edilen gevşeme yanıtlarının belirli konsantrasyon aralığında anlamlı olarak arttığı görüldü. Çalışmanın devamında damar düz kas gevşemesinde rolü olduğu bilinen mekanizmaları antagonize ya da inhibe (bloke) eden non-spesifik nitrik oksit sentaz inhibitörü (*No-Nitro-L-arginine-methyl-ester-hydrochloride*-L-NAME), adenilatsiklaz inhibitörü (SQ22536), guanilat siklaz inhibitörü (*oxadiazolo4,3-aquinoxalin-1-one*; ODQ) ve non-spesifik potasyum kanal blokörü tetraetilamonyum (TEA) ön uygulamalarının asitretin ile oluşan gevşeme yanıtları üzerindeki etkisi incelendi. Bu deneylerin sonucunda; endotel (-) sıçan torasik aorta preparatlarında asitretinin gevşeme yanıtlarında, çözücüsü olan DMSO ile elde edilen yanıtlardan farklı ve anlamlı olarak daha fazla miktarda azalma izlendi. Sonuçlarımız; asitretinin damar düz kasındaki gevşetici etkisinde nitrik oksit yolağı, adenilat ve guanilat siklaz enzimlerinin rol aldığı yollar ve/veya potasyum kanallarının rolü olabileceğini düşündürdü.

Retinoidlerle ilgili çalışmaların büyük kısmı görme sürecindeki rolleri (116) üzerine yoğunlaşmakla birlikte; retinoid yapıya sahip A vitamininin miktarında meydana gelen değişikliklerin epitel hücrelerinin farklılaşmasını dramatik biçimde etkilediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (117). Ayrıca retinoid metaboliti olan ATRA (*all-trans* retinoik asit)'nin da epitel hücre farklılaşmasında güçlü bir sinyal molekülü olduğunu ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır (118). Özetle retinoidler görme, epitel yüzeylerin korunması, bağışıklığın yetkin hale getirilmesi, üreme ve embriyonik büyüme ve gelişme gibi birçok önemli işleve sahiptir (117). Öte yandan, fazlalığı embriyonik malformasyonlar (119), azalan kemik mineral yoğunluğu ve artan kırık riski (120) ile ilişkilendirilmiştir.

On yıllardır bilinen etkilerinin yanı sıra; birinci nesil bir retinoik asit türevi olan tretinoin (ATRA)'nin anti-inflamatuvar (121), anti-kanser (122) ve immüno-modülatör (123) etkileri de gösterilmiştir. Ayrıca ATRA'nın anti-proliferatif ve anti-oksidan etkileri de bulunmaktadır (124). Retinoidlerin aynı zamanda aterosklerotik plağın stabilitesinin korunmasını sağlayan; hücre proliferasyonunu inhibe edici, elastin sentezini artıran ve fibroblastlardan metalloproteinaz inhibitörü üretimini uyaran etkileri olduğu da gösterilmiştir (125).

Retinoik asit ve türevlerinin damar düz kası ve endotel üzerindeki etkilerine dair çok sayıda çalışmanın yanı sıra, bu tez çalışmasında asitretinin çözücüsü olarak kullanılan DMSO ile ilgili olarak da özellikle son yıllarda dikkat çekici çalışmalar yürütülmüştür. Kaneda ve arkadaşları tarafından sıçan aorta preparatında DMSO'nun endotele bağımlı şekilde cGMP miktarını ve buna bağlı NO salıverilmesini artırarak gevşeme cevabı oluşturduğu gösterilmiştir (115). Çalışmamızda, belirtilen çalışmanın sonuçları ile tutarlı olarak, DMSO'nun sıçan torasik aorta preparatlarında endotele bağımlı bir gevşeme yanıtı meydana getirdiği saptandı. Endotel (+) preparatlarda elde edilen bulguların aksine; endotel (-) preparatlarda DMSO ile düşük konsantrasyonlarda kasılma ve yüksek konsantrasyonlarda gevşeme yanıtı elde edildi. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ışığında; DMSO'nun endotele bağımlı bir gevşetici etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşıldı.

Wang ve arkadaşlarının sıçan mezenterik arteri ile gerçekleştirdikleri çalışmada; endotelin uzaklaştırılmasının ATRA ile elde edilen damar düz kası gevşeme yanıtlarını ortadan kaldırdığı gösterilmiştir ki bu da ATRA-aracılı gevşeme yanıtlarının endotele bağımlı olduğunu düşündürmektedir (110). Bu bulguların aksine; tez çalışmamızda sıçan torasik aorta preparatında sentetik bir retinoik asit türevi olan asitretinin endotelden bağımsız gevşetici etkisi olduğu saptandı.

Çalışmamızda endotel (-) aorta preparatlarında RAR antagonisti AGN193109 ile inkübasyonun ardından asitretin ile elde edilen gevşeme yanıtlarında değişiklik izlenmezken; RXR antagonisti HX531 ile inkübasyon sonrasında belirli konsantrasyonlar aralığında anlamlı artış gözlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçların aksine, Wang ve arkadaşlarının çalışmasında RAR antagonisti (BMS492) ve RXR antagonistin (UV13003) kombine olarak uygulanması sonrasında ATRA ile elde edilen gevşeme yanıtları ortadan kalkmıştır. Araştırmacılar, RAR ve RXR'ın ATRA aracılı gevşeme yanıtlarında rolü olabileceğini ifade etmişlerdir (110). RAR ve RXR antagonistleri ile elde ettiğimiz sonuçları daha tutarlı ve açıklanabilir hale getirmek adına ileride gerçekleştirilecek kapsamlı çalışmaların yapılması gerekli görülmektedir.

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında, NOS enzimini non-spesifik olarak inhibe eden L-NAME (10^{-4} M) kullanıldı. L-NAME ile 30 dakika inkübasyon sonrasında, asitretinin artan konsantrasyonları (10^{-12} – 10^{-4} M) ile endotel (-) aorta preparatlarında elde edilen gevşeme yanıtlarında anlamlı azalma saptandı. Endotel (-) aorta preparatlarında asitretin ile elde edilen gevşeme yanıtlarının tamamen ortadan kalkması, asitretinin damar düz kas gevşetici etkisinde nitrik oksidin bir rolü olabileceğini ve gevşetici etkinin endotelial NOS

kaynaklı olmadığını ve gevşemeyi meydana getiren NO'nun nöronal NOS kaynaklı olabileceğini düşündürdü. Förstermann'ın nöronal NOS'un spinal kord, sempatik gangliyonlar, adrenal bezler, periferik sinirler, birçok organın epitel hücreleri, böbrek maküla densa hücreleri, pankreasın adacık hücreleri ve vasküler düz kasta da ifadelendiğini ortaya koyduğu çalışması bu çıkarımımızı desteklemektedir (100). Retinoik asitin, nitrik oksit üretimi üzerindeki etkilerini inceleyen, farklı sonuçların bildirildiği çok sayıda çalışma mevcuttur. Cho ve arkadaşlarının sığır aorta endotel hücrelerinde ATRA'nın endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) fosforilasyonu üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, ATRA uygulanmasının eNOS ifadelenmesi ve NO sentezinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (126). Bir başka hücre kültürü çalışmasında ise ATRA'nın endotelial hücreler tarafından NO üretimi üzerindeki etkileri araştırılmış ve asimetrik dimetiltarjinin (ADMA) metabolizmasından sorumlu enzimlerin düzenlenmesinin bu etkilere katkıda bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. ATRA varlığı/yokluğunda inkübe edilen fare endotelyoma (sEnd.1) hücrelerinin endotel yapılarında nitrik oksit sentezinin arttığı ve bu etkinin meydana gelmesinde dimetiltarjinin dimetil aminohidrolaz (DDAH) enziminin indüklenmesinin rol oynadığı gösterilmiştir (127). ATRA'nın vasküler endotel hücrelerince nitrik oksit üretimindeki rolünün incelendiği diğer bir çalışmada insan dermal mikrovasküler endotel hücreleri, insan umbilikal arter endotel hücreleri ve sıçan akciğer vasküler endotel hücrelerinde ATRA ve RAR agonisti olan AM580'nin endotelial NOS fosforilasyonunu, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) aktivitesini ve NO üretimini anlamlı olarak artırdığı; L-NAME ile ön-uygulama yapılmasının ise bu artışı inhibe ettiği gösterilmiştir. Öte yandan PI3K inhibitörü Wortmannin uygulanması ile de NO artışı tamamen ortadan kalkmıştır. Tüm bu sonuçlar ışığında araştırmacılar ATRA'nın, vasküler endotelial hücrelerde RAR aracılı PI3K / Akt yolağı aktivasyonu sonucu eNOS fosforilasyonu ile NO üretimini artırdığı çıkarımında bulunmuşlardır (128). Literatürde genel olarak endotel kökenli NO ile ilişkili bir etkiye sahip olduğu gösterilen ATRA'nın aksine bizim çalışmamızda ise asitretinin sıçan torasik aorta preparatında endotel kaynaklı değil nöronal ya da indüklenabilir NOS'un meydana getirdiği NO aracılığı ile cGMP / guanilat siklaz üzerinden bir gevşeme yanıtı oluşturabileceğine dair sonuçlar elde edildi. Endotel (-) sıçan izole torasik aorta preparatlarında asitretin ile oluşan konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtının L-NAME tarafından ortadan kaldırılması, bu süreçte endotel dışı nitrik oksit sentezinin katkısı olduğunu düşündürdü. Nitekim literatürde, eNOS (NOS3)'e ek olarak arterlerin çevresinden NOS (NOS1)'in de oldukça fazla miktarda eksprese edildiği ortaya konmuştur (129). Ayrıca sinir lifleri ve mast hücrelerinde nNOS tarafından üretilen

NO'nun mikrodamarlar çevresindeki varlığı da gösterilmiştir (130, 131). Yapılan diğer çalışmalarda nNOS'un, eNOS geni silinmiş (*knock-out*) farelerde, eNOS kaybını telafi edebildiği ve bu şekilde de NO sentezinde bir değişiklik yaşanmaksızın NO aracılığı ile vazodilatasyonun devam ettirilebildiği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmalarda immünohistokimyasal teknikler kullanılarak yabani tip farelerdeki vasküler dokuda ve eNOS nakavt farelerdeki koroner arterlerin endotelinde nNOS varlığı ortaya konmuştur (132, 133). Literatürdeki tüm bu sonuçlar nNOS'un vasküler düz kas gevşemesini sağlayan NO'nun üretilmesinde eNOS'a bir alternatif olabileceğini düşündürmektedir. Tüm bu bulgular endotel (-) preparatlarda asitretin ile elde ettiğimiz gevşeme yanıtlarında endotel dışı bir kaynağa sahip NO'nun rolü olabileceği önerimizi destekler niteliktedir.

Çalışmamızın daha sonraki aşamasında damar gevşemesinde rol oynadığı bilinen ikinci haberci moleküller olan cAMP ve cGMP'nin sentezinde görev yapan adenilat siklaz ve guanilat siklaz enzimlerinin inhibitörlerinin (sırasıyla SQ22536 ve *oxadiazol* [4,3- *a*] *quinoxalin-1-one* [ODQ]) endotel (-) preparatlarda asitretinin gevşetici etkisini ortadan kaldırdığı saptandı. Bu sonuçlar hem adenilat siklaz hem de guanilat siklaz ürünlerinin ve bunların dahil olduğu ileri yollarında asitretinin damar gevşetici etkisine aracılık ediyor olabileceğini düşündürdü. Nelson ve arkadaşları sıçan vasküler düz kas hücre kültüründe, vasküler düz kasta eksprese olduğu bilinen çok sayıda adenilat siklaz enzimi arasında adenilat siklaz 6'nın, vazodilatasyon mekanizmasında ve vasküler düz kas hücresinin membran potansiyelini düzenlemede anahtar rol oynadığını bildirmiştir (134). Bir diğer hücre kültürü çalışmasında Lipskaia ve arkadaşları, P19 teratokarsinom kök hücrelerinin bazal düzeyde kalsiyum ile stimüle edilen bir adenilat siklaz aktivitesine sahip olduklarını ve bu aktivitenin de retinoik asit ile indüklenme sonrasında 10 kattan fazla arttığını göstermişlerdir (135). Wilkinson ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer hücre kültürü çalışmasında ise çeşitli retinoidlerle inkübe edilen kobay keratinosit hücreleri adenilat siklaz agonistleri ile uyarılmış ve tüm retinoidlerin kobay hücre serilerinde cAMP oluşumunu artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, retinoidlerin etkisine cAMP'nin de aracılık ettiği çıkarımında bulunulmuştur (136). Bizim çalışmamızda da, literatürle uyumlu olarak, asitretinin damar gevşetici etkisi spesifik adenilat siklaz inhibitörü (SQ22536) ile tamamen ortadan kalktı. Bu bulgu adenilat siklaz enziminin ve/veya bu enzimin ürünü olan cAMP'nin de asitretinin meydana getirdiği gevşeme yanıtlarına aracılık eden sürece katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Literatürde retinoidlerin adenilat siklaz ve cAMP yolağı üzerinden etkilerine dair izole organ banyosu çalışması bulunmazken; cGMP ve guanilat siklaz üzerinden

vasküler etkileri ile ilgili tek bir organ banyosu çalışmasına rastlanmıştır (110). Wang ve arkadaşlarının bu çalışmasında erkek Sprague Dawley sıçanların mezenterik arterleri üzerinde ATRA'nın etkileri incelenmiş ve endotel (+) preparatlarda ATRA'nın oluşturduğu gevşeme yanıtlarının guanilat siklaz inhibitörü ODQ ön uygulaması ile inhibe olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada *in vivo* olarak da ATRA'nın hipertansiyon üzerindeki etkilerine bakılmak üzere spontan hipertansif sıçanlara intraperitoneal yoldan uygulanan ATRA'nın kan basıncı değerlerinde anlamlı azalma sağladığı gösterilmiştir (110). Benzer şekilde bizim çalışmamızda endotel (-) sıçan izole torasik aorta preparatlarında ODQ ön- uygulaması ile asitretin gevşeme yanıtları ortadan kalktı. Elde ettiğimiz bu bulgu da literatürle uyumlu olarak asitretinin damar düz kası gevşetici etkisinde guanilat siklaz enziminin ve/veya bu enzimin ürünü olan cGMP'nin katkısı olduğunu gösterdi.

Çalışmamızın son basamağında, endotel (-) preparatlarda non-spesifik potasyum kanal blokörü tetraetilamonyumun asitretin ile elde edilen konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtlarını inhibe ettiği izlendi. Wang ve arkadaşlarının çalışmasında, endotel (+) mezenterik arter preparatında ATRA ile elde edilen gevşeme cevabı kalsiyumla-aktif olan potasyum kanallarının inhibisyonu (karibdotoksin - 10^{-5} M) ile ortadan kalkarken; voltaj bağımlı potasyum kanallarının blokajı (4-aminopiridin - 10^{-4} M) veya ATP-duyarlı potasyum kanallarının blokajı (glibenklamid - 10^{-5} M) ile ortadan kalkmadığı bildirilmiştir (110). Bu bulgular, çalışmamızda elde ettiğimiz gevşeme yanıtlarının non-spesifik potasyum kanal blokörü olan TEA ile ortadan kalkması ile uyum göstermektedir. Vasküler düz kas hücrelerinde potasyum kanallarının açılması, damar gevşemesini sağlar. Vazodilatasyonun gerçekleşmesi K^+ kanallarının açılması ve adenilat siklaz aktivasyonu sonucunda protein kinaz A (PKA) aktivasyonu ve artan miktarda cAMP varlığı ile ilişkilidir (137, 138). K^+ kanalları esas olarak vasküler düz kas hücrelerinde bulunmaktadır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı tiplerinin endotel hücrelerinde de bulunduğu gösterilmiştir (139, 140). Kullandığımız TEA'nın ise özellikle vasküler düz kasta yer alan K^+ kanallarına afinitesi daha yüksektir. Bu bilgi, asitretinin neden olduğu gevşeme yanıtları üzerine potasyum kanal blokörü TEA'nın etkisini incelemek üzere çalışmamızda endotel (-) aorta preparatlarını seçmiş olmamızı destekler niteliktedir. Tez çalışmamızın son basamağı, literatürde yapılan bir çalışmada yorumlandığı şekilde (137), asitretinin endotel kaynaklı olmayan nitrik oksit aracılığıyla potasyum kanallarının aktive olmasıyla vasküler düz kas gevşemesinde rolü olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında asitretinin, endotelden bağımsız olarak, birden fazla mekanizma üzerinden damar düz kasında gevşeme yanıtı meydana getirdiği ortaya kondu. Asitretinin damar düz kası üzerindeki gevşetici etkisi ilk kez bu tez çalışması ile gösterildi. Adenilat siklaz ve guanilat siklaz enzimlerinin inhibe edilmesi sonucunda asitretin aracılı gevşeme yanıtlarının ortadan kalkması, bu yanıtlarda cAMP ve/veya cGMP'nin rolü olduğunu düşündürmektedir. Damar düz kas gevşemesinde rolü olduğu bilinen farklı potasyum kanal alt tiplerinin aktivasyonlarında cAMP ve cGMP'nin rolü olduğu bilinmektedir (137). Çalışmamızda potasyum kanallarının non-spesifik olarak inhibe edilmesi sonucunda asitretin ile elde edilen damar düz kas gevşeme yanıtlarının ortadan kalkması da bu bilgilerle uyumlu olarak cAMP ve/veya cGMP'nin aracılığı ile potasyum kanalları üzerinden bir etkinin söz konusu olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca hem guanilat siklaz enziminin inhibisyonu sonucunda hem de L-NAME ile inkübasyon sonrasında asitretinin gevşeme yanıtlarının ortadan kalkması birbirleri ile ilişkili görünmektedir. NO aracılı gevşemede guanilat siklaz ve onun meydana getirdiği cGMP rol oynadığı için asitretinin NO aracılı bir mekanizma ile damar düz kasında gevşeme yanıtı oluşturmaları mümkündür. Tüm bu çapraz ilişkilerin tam olarak ortaya konulması ve net olarak belirlenebilmesi için ileride yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir. Asitretinin damar gevşetici etkisinde RAR ve RXR katkısının incelendiği deneylerin sonuçları ele alındığında; deney hayvanı sayısının daha fazla olduğu yeni çalışmaların gerçekleştirilmesi sonucunda standart hataların azalması ve istatistiksel analizin daha doğru yapılabilmesi mümkün olacaktır. Ayrıca, etken madde teminindeki güçlük sebebiyle, antagonistlerle inkübasyonun ardından asitretin ve DMSO ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrilerine dair sonuçların, çalışmanın başlangıcında bir defa belirli hayvanın ortalaması olarak elde edilen asitretin ve DMSO konsantrasyon-cevap eğrilerinin sonuçları ile kıyaslanmış olması çalışmamızın bir diğer kısıtlılığıdır. Son olarak, asitretinin yetersiz miktarda temini sebebiyle damar düz kas gevşemesinde rolü olabilecek tüm mekanizmaların ayrıntılı olarak değerlendirilmesi de mümkün olamamıştır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

A- Asitretinle ilgili sonuçlara ait özet bilgi:

- Endotel (-) preparatlarda fenilefrin ön-kasılması sonrasında asitretin ile konsantrasyona bağımlı ve çözücüsünden bağımsız gevşeme yanıtları elde edildi. Çalışmamız literatürde bu sonucu saptayan ilk çalışmadır.
- Asitretin ile elde edilen gevşeme yanıtlarında alfa-1 adrenoseptörlerin ve retinoik asit reseptörlerinin rolü yoktur.
- Asitretin ile elde edilen gevşeme yanıtları retinoid X reseptörlerinin antagonisti varlığında belirli konsantrasyon aralığında arttı.
- Endotel (-) preparatlarda asitretin ile elde edilen gevşeme yanıtları NOS, adenilat siklaz enzimi, guanilat siklaz enzimi inhibisyonu ile ortadan kalktı.
- Endotel (-) preparatlarda asitretin ile elde edilen gevşeme yanıtları potasyum kanallarının non-spesifik blokajı sonucunda ortadan kalktı.
- Asitretinin endotel (-) preparatlarda meydana gelen gevşeme yanıtında nitrik oksit ve potasyum kanallarının rol oynadığı gösterildi.

B - Asitretinin çözücüsü DMSO ile ilgili sonuçlara ait özet bilgi:

- Endotel (+) preparatlarda DMSO ile belirgin gevşeme yanıtı elde edilirken; endotel (-) preparatlarda düşük konsantrasyonlarda kasılma yüksek konsantrasyonlarda ise gevşeme izlendi.
- Endotel (-) preparatlarda RAR ve RXR antagonisti varlığında DMSO ile elde edilen kasılma cevabının ortadan kalktığı izlendi.
- Endotel (-) preparatlarda L-NAME, adenilat siklaz inhibitörü ve guanilat siklaz inhibitörünün DMSO'nun meydana getirdiği kasılma yanıtlarını belirli konsantrasyon aralığında ortadan kaldırdığı görüldü.

C. Bu bilgiler ışığında ileriye yönelik yapılması planlanan çalışmalar;

- Bulgularımız asitretinin damar düz kası gevşetici etkisi nedeniyle klinik uygulamalar için aday bir molekül olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, gerçekleştirilecek *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla asitretinin damar düz kası gevşetici etkisinin mekanizmasının daha

ayrıntılı gösterilmesi,

- Endotel (+) preparatlarda DMSO ile meydana gelen gevşeme yanıtlarına ait mekanizmanın ortaya konması.
- Endotel (+) preparatlarda DMSO ile meydana gelen düşük konsantrasyonlarda kasılma ve daha yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan gevşeme yanıtlarına ait mekanizmanın gösterilmesi.



KAYNAKLAR

1. Orfanos CE, Zouboulis CC, Almond Roesler B, Geilen CC. Current use and future potential role of retinoids in dermatology. *Drugs*. 1997;53(3):358-88.
2. Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clin Interv Aging*. 2006;1(4):327-48.
3. Dogra S, Yadav S. Acitretin in psoriasis: an evolving scenario. *Int J Dermatol*. 2014;53(5):525-38.
4. Chandraratna RAS. Rational design of receptor-selective retinoids. *J Am Acad Dermatol*. 1998;39(4): S124-S8.
5. Saurat JH. Retinoids and psoriasis: Novel issues in retinoid pharmacology and implications for psoriasis treatment. *J Am Acad Dermatol*. 1999;41(3): S2-S6.
6. Katz HI, Waalen J, Leach EE. Acitretin in psoriasis: An overview of adverse effects. *J Am Acad Dermatol*. 1999;41(3): S7-S12.
7. Coleman R, Macdonald D. Effects of isotretinoin on male reproductive-system. *Lancet*. 1994;344(8916):198.
8. Csaba G, Gaal A. Effect of perinatal vitamin A or retinoic acid treatment (hormonal imprinting) on the sexual behavior of adult rats. *Hum Exp Toxicol*. 1997;16(4):193-7.
9. Reynolds OD. Erectile dysfunction in tretinate treatment. *Arch Derm*. 1991;127(3):425-6.
10. Rossi M aPM. Acitretin-associated erectile dysfunction: a case report. *Cases J*2009. p.1-3.
11. Bouvy ML, Sturkenboom M, Cornel MC, Dejong vandenbergh LTW, Stricker BHC, Wesseling H. Acitretin (Neotigason®) - A review of pharmacokinetics and teratogenicity and hypothesis on metabolic pathways. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*. 1992;14(2):33-7.

12. Orfanos CE, Ehlert R, Gollnick H. The retinoids - a review of their clinical-pharmacology and therapeutic use. *Drugs*. 1987;34(4):459-503.
13. Leyden JJ, McGinley KJ. Effect of 13-cis-retinoic acid on sebum production and propionibacterium-acnes in severe nodulocystic acne. *Arch Dermatol Res*. 1982; 272(3-4):331-7.
14. Vandekerckhof PCM, Chang A, Vandoorengreebe R, Geiger JM, Happle R. Intra-epidermal accumulation of polymorphonuclear leukocytes in persistent palmoplantar pustulosis during treatment with acitretin. *Acta Dermato-Venereologica*. 1988;68(6):499-503.
15. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Henderson WR. Relationships between structure and activity of retinoids. *Nature*. 1976;263(5573):110-3.
16. Sporn MB, Roberts AB. Introduction - what is a retinoid. *Ciba Founda Symp*. 1985; 113:1-5.
17. Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol*. 2006;66(7):606-30.
18. Aryal A, Upreti S. A brief review on systemic retinoids. *Int J Pharm Sci Res*. 2017;8(9):3630-9.
19. Takase S, Ong DE, Chytil F. Transfer of retinoic acid from its complex with cellular retinoic acid-binding protein to the nucleus. *Arch Biochem Biophys*. 1986;247(2):328-34.
20. Pilkington T, Brogden RN. Acitretin - a review of its pharmacology and therapeutic use. *Drugs*. 1992;43(4):597-627.
21. Kang SW, Li XY, Voorhees JJ. Pharmacology and molecular action of retinoids and vitamin D in skin. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1996; 1:15-21.
22. Rowe A. Retinoid X receptors. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(2):275-8.

23. Aforнали A, Dieamant G, Feferman IHS, de Vecchi R, de Oliveira LL, Fabricio LHZ, et al. Triple nanoemulsion potentiates the effects of topical treatments with microencapsulated retinol and modulates biological processes related to skin aging. *An Bras Dermatol*. 2013;88(6):930-6.
24. Brun PJ, Yang KJZ, Lee SA, Yuen JJ, Blaner WS. Retinoids: Potent regulators of metabolism. *Biofactors*. 2013;39(2):151-63.
25. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & Development*. 2000;14(2):121-41.
26. Lee MS, Kliewer SA, Provencal J, Wright PE, Evans RM. Structure of the retinoid- x receptor-alpha dna-binding domain - a helix required for homodimeric dna-binding. *Science*. 1993;260(5111):1117-21.
27. Schwabe JWR, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. The crystal-structure of the estrogen-receptor dna-binding domain bound to dna - how receptors discriminate between their response elements. *Cell*. 1993;75(3):567-78.
28. Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Structural Biology*. 1996;3(2):206.
29. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb Journal*. 1996;10(9):940-54.
30. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The rxr heterodimers and orphan receptors. *Cell*. 1995;83(6):841-5.
31. Chytil F. Retinoic acid-Biochemistry and metabolism. *J Am Acad Dermatol*. 1986;15(4):741-7.
32. Ellis CN, Voorhees JJ. Etretnate therapy. *J Am Acad Dermatol*. 1987;16(2):267-91.
33. Geiger JM, Saurat JH. Acitretin and etretinate - how and when they should be used. *Dermatologic Clinics*. 1993;11(1):117-29.

34. Geiger JM, Czarnetzki BM. Acitretin (ro 10-1670, etretin) - overall evaluation of clinical-studies. *Dermatologica*. 1988;176(4):182-90.
35. Hsu S, Papp KA, Lebwohl MG, Bagel J, Blauvelt A, Duffin KC, et al. Consensus Guidelines for the Management of Plaque Psoriasis. *Arch Dermatol*. 2012;148(1):95-102.
36. Kragballe K, Jansen CT, Geiger JM, Bjerke JR, Falk ES, Gip L, et al. A double-blind comparison of acitretin and etretinate in the treatment of severe psoriasis - results of a nordic multicenter study. *Acta Dermato-Venereologica*. 1989;69(1):35-40.
37. Gollnick H, Bauer R, Brindley C, Orfanos CE, Plewig G, Wokalek H, et al. Acitretin versus etretinate in psoriasis - clinical and pharmacokinetic results of a german multicenter study. *J Am Acad Dermatol*. 1988;19(3):458-68.
38. Larsen FG, Jakobsen P, Larsen CG, Kragballe K, Nielsenkudsk F. Pharmacokinetics of etretin and etretinate during long-term treatment of psoriasis patients. *Pharmacol Toxicol*. 1988;62(3):159-65.
39. Lucek RW, Colburn WA. Clinical pharmacokinetics of the retinoids. *Clin Pharmacokinet*. 1985;10(1):38-62.
40. Paravicini U, Camenzind M, Gower M, Geiger JM, Saurat JH. Multiple-dose pharmacokinetics of ro-10-1670, the main metabolite of tigason. *Dermatologica*. 1984;169(4):289-292.
41. Allen JG, Bloxham DP. The pharmacology and pharmacokinetics of the retinoids. *Pharmacol Ther*. 1989;40(1):1-27.
42. Digiovanna JJ, Zech LA, Ruddel ME, Gantt G, Peck GL. Etretinate - persistent serum levels after long-term therapy. *Arch Dermatol*. 1989;125(2):246-51.
43. Massarella J, Vane F, Bugge C, Rodriguez L, Cunningham WJ, Franz T, et al. Etretinate kinetics during chronic dosing in severe psoriasis. *Clin Pharmacol Ther*. 1985;37(4):439-46.

44. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, et al. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med*. 1985;313(14):837-41.
45. Rollman O, Vahlquist A. Retinoid concentrations in skin, serum and adipose-tissue of patients treated with etretinate. *Br J Dermatol*. 1983;109(4):439-47.
46. Vahlquist A, Rollman O, Pihllundin I. Tissue distribution of aromatic retinoid (etretinate) in 3 autopsy cases - drug accumulation in adrenals and fat. *Acta Dermato-Venereologica*. 1986;66(5):431-4.
47. Orfanos CE. Treatment of psoriasis with retinoids: Present status. *Cutis*. 1999;64(5):347-53.
48. Wiegand UW, Chou RC. Pharmacokinetics of acitretin and etretinate. *J Am Acad Dermatol*. 1998;39(2): S25-S33.
49. Brindley CJ. Overview of recent clinical pharmacokinetic studies with acitretin (ro 10-1670, etretin). *Dermatologica*. 1989;178(2):79-87.
50. Berbis P, Bun H, Almallah NR, Durand A, Rognin C, Geiger JM, et al. Residual plasma-concentrations of acitretin (ro-10-1670) and its metabolite (ro-13-7652) after chronic administration. *Dermatologica*. 1988;177(4):244.
51. Menter A, Korman NJ, Elmets CA, Feldman SR, Gelfand JM, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis Section 3. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with topical therapies. *J Am Acad Dermatol*. 2009;60(4):643-59.
52. Lee CS, Koo J. A review of acitretin, a systemic retinoid for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Pharmacother*. 2005;6(10):1725-34.
53. Tong PS, Horowitz NN, Wheeler LA. Trans retinoic acid enhances the growth-response of epidermal-keratinocytes to epidermal growth-factor and transforming growth factor-beta. *J Invest Dermatol*. 1990;94(1):126-31
- .

54. Stadler R, Muller R, Orfanos CE. Effect of various retinoid compounds of the ii-generation and iii-generation on invitro keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol.* 1986;87(1):169.
55. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal T(H)17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science.* 2007;317(5835):256-60.
56. Qin X, Chen C, Zhang Y, Zhang L, Mei YJ, Long XC, et al. Acitretin modulates HaCaT cells proliferation through STAT1-and STAT3-dependent signaling. *Saudi Pharm J.* 2017;25(4):620-4.
57. Niu XW, Cao W, Ma HQ, Feng J, Li XM, Zhang XH. Acitretin exerted a greater influence on T-helper (Th)1 and Th17 than on Th2 cells in treatment of psoriasis vulgaris. *J Dermatol.* 2012;39(11):916-21.
58. Zhang M, Zhu L, Feng Y, Yang YX, Liu L, Ran YP. Effects of acitretin on proliferative inhibition and RANTES production of HaCaT cells. *Arch Dermatol Res.* 2008;300(10):575-81.
59. Bauer R, Schutz R, Orfanos CE. Impaired motility and random migration of vital polymorphonuclears invitro after therapy with oral aromatic retinoid in psoriasis. *Int J Dermatol.* 1984;23(1):72-7.
60. Young HS, Summers AM, Read IR, Fairhurst DA, Plant DJ, Campalani E, et al. Interaction between genetic control of vascular endothelial growth factor production and retinoid responsiveness in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2006;126(2):453-9.
61. Byus CV, Klimpel GR, Lucas DO, Russell DH. Type-i and type-ii cyclic amp-dependent protein-kinase as opposite effectors of lymphocyte mitogenesis. *Nature.* 1977;268(5615):63-4.
62. Costa M, Gerner EW, Russell DH. Cyclic-amp levels and type-i and type-ii cyclic amp-dependent protein-kinase activity in synchronized cells and in quiescent cultures stimulated to proliferate. *Biochimica Et Biophysica Acta.* 1978;538(1):1-10.

63. Raynaud F, Anderson WB, Brion DE. Retinoid treatment of human psoriatic fibroblasts induces an increase in cyclic-amp dependent protein-kinase activity. *J Invest Dermatol.* 1987;89(3):335.
64. Fontana JA, Reppucci A, Durham JP, Miranda D. Correlation between the induction of leukemic-cell differentiation by various retinoids and modulation of protein- kinases. *Cancer Res.* 1986;46(5):2468-73.
65. Larsen FG, Jakobsen P, Larsen CG, Norgaard A, Kragballe K, Nielsenkudsk F. Single dose pharmacokinetics of etretin and etretinate in psoriatic patients. *Pharmacol Toxicol.* 1987;61(2):85-8.
66. Paravicini U, Stockel K, Macnamara PJ, Hanni R, Busslinger A. On metabolism and pharmacokinetics of an aromatic retinoid. *Ann N Y Acad Sci.* 1981;359(Feb):54-67.
67. Ward A, Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS. Etretinate - a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in psoriasis and other skin disorders. *Drugs.* 1983;26(1):9-43.
68. McNamara PJ, Jewell RC, Jensen BK, Brindley CJ. Food increases the bioavailability of acitretin. *J Clin Pharmacol.* 1988;28(11):1051-5.
69. Larsen FG, Jakobsen P, Eriksen H, Gronhoj J, Kragballe K, Nielsenkudsk F. The pharmacokinetics of acitretin and its 13-cis-metabolite in psoriatic patients. *J Clin Pharmacol.* 1991;31(5):477-83.
70. Larsen FG, Jakobsen P, Knudsen J, Weismann K, Kragballe K, Nielsenkudsk F. Conversion of acitretin to etretinate in psoriatic patients is influenced by ethanol. *J Invest Dermatol.* 1993;100(5):623-7.
71. Laugier JP, Desousa G, Bun H, Geiger JM, Surber C, Rahmani R. Acitretin biotransformation into etretinate - role of ethanol on in-vitro hepatic-metabolism. *Dermatol.* 1994;188(2):122-5.
72. Larsen FG. Pharmacokinetics of etretinate and acitretin with special reference to treatment of psoriasis. *Acta Dermato-Venereologica.* 1994:1-33.

73. Chou RC, Wyss R, Huselton CA, Wiegand UW. A potentially new metabolic pathway - ethyl esterification of acitretin. *Xenobiotica*. 1992;22(8):993-1002.
74. Meyer E, Debersaques J, Lambert WE, Deleenheer AP, Kint AH. Skin, adipose- tissue and plasma-levels of acitretin with rare occurrence of esterified acitretin during long- term treatment. *Acta Dermato-Venereologica*. 1993;73(2):113-5.
75. Rubio F, Jensen BK, Henderson L, Garland WA, Szuna A, Town C. Disposition of c-14 acitretin in humans following oral-administration. *Drug Metab Dispos*. 1994;22(2):211-5.
76. Morgan KG. The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the Ca^{2+} indicator aequorin. *Cardiovasc Drug Ther*. 1990;4(5):1355-62.
77. Somlyo AP, Somlyo AV. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase (vol 164, 437, 1998). *Acta Physiol Scand*. 1999;165(4):437-448.
78. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*. 2003;27(4):201-6.
79. Cole WC, Welsh DG. Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure. *Arch Biochem Biophys*. 2011;510(2):160-73.
80. Webb RC, Bohr DF. Regulation of vascular tone, molecular mechanisms. *Prog Cardiovasc Dis*. 1981;24(3):213-42.81. Kamm JJ. Toxicology, carcinogenicity, and teratogenicity of some orally- administered retinoids. *J Am Acad Dermatol*. 1982;6(4):652-9.
82. Schaub MC, Kunz B. Regulation of contraction in cardiac and smooth muscles. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1986;8: S117-S23.
83. Blaustein MP. Sodium calcium exchange and the control of contractility in cardiac-muscle and vascular smooth-muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1988;12: S56-S68.

84. Somlyo AP. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth- muscle. *Circ Res.* 1985;57(4):497-507.
85. Vanbreemen C, Saida K. Cellular mechanisms regulating Ca^{2+} smooth-muscle. *Annu Rev Physiol.* 1989; 51:315-29.
86. Smooth muscle relaxation 2019 [internet] <https://www.memorangapp.com/flashcards/123514/Smooth+Muscle+Contraction+9%2F27/>. Erişim tarihi: Nisan, 2020.
87. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane-a₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev.* 1978;30(3):293-331.
88. Parsaee H, McEwan JR, Joseph S, Macdermot J. Differential sensitivities of the prostacyclin and nitric-oxide biosynthetic pathways to cytosolic calcium in bovine aortic endothelial-cells. *Br J Pharmacol.* 1992;107(4):1013-9.
89. White DG, Martin W. Differential control and calcium-dependence of production of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin by pig aortic endothelial-cells. *Br J Pharmacol.* 1989;97(3):683-90.
90. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res.* 1983;52(3):352-7.
91. Waldman SA, Murad F. Biochemical-mechanisms underlying vascular smooth-muscle relaxation - the guanylate cyclase-cyclic gmp system. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988;12: S115-S8.
92. Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *European J Pharmacol.* 1990;183(6):2088-9.
93. Lu DS, Kassab GS. Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *J R Soc Interface.* 2011;8(63):1379-85.
94. Paszkowiak Jacek J DA, Hawen W. Arterial Wall Shear Stress: Observations from the Bench to the Bedside. *Vasc Endovascular Surg.* 2003. p. 47-57.
95. Smooth muscle relaxation 2019 [internet] <https://www.memorangapp.com/flashcards/61782/2.09+-+Vascular+Events+in+Acute+Inflammation/>. Erişim tarihi: Nisan, 2020.

96. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial-cells in the relaxation of arterial smooth-muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
97. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric-oxide - use of pyrogallol and superoxide-dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth-muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;244(1):181-9.
98. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric-oxide release accounts for the biological-activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6.
99. Vanhoutte PM, Zhao YZ, Xu AM, Leung SWS. Thirty Years of Saying NO Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ Res*. 2016;119(2):375-96.
100. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-837.
101. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric-oxide synthase - molecular-cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(14):6348-52.
102. Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric-oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1993;268(23):17478-88.
103. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial-cells synthesize nitric-oxide from l-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-6.
104. Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt H, Nakane M, et al. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial-cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(23):10480-4.

105. Schmidt K, Werner ER, Mayer B, Wachter H, Kukovetz WR. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric-oxide) in aortic endothelial-cells. *Biochem J.* 1992; 281:297-300.
106. Busse R, Mulsch A, Fleming I, Hecker M. Mechanisms of nitric-oxide release from the vascular endothelium. *Circ.* 1993;87(5):18-25.
107. Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res.* 1996;78(5):750-8.
108. Arsyad A, Dobson GP. Adenosine relaxation in isolated rat aortic rings and possible roles of smooth muscle K-v channels, K-ATP channels and A(2a) receptors. *Bmc Pharmacol Toxicol.* 2016; 17:11.
109. da Silva JDP, Ballejo G. Pharmacological characterization of the calcium influx pathways involved in nitric oxide production by endothelial cells. *Einstein-Sao Paulo.* 2019;17(3):10.
110. Wang YS, Han Y, Yang J, Wang Z, Liu L, Wang W, et al. Relaxant effect of all-trans-retinoic acid via NO-sGC-cGMP pathway and calcium-activated potassium channels in rat mesenteric artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;304(1):H51-H7.
111. Cicala CM, Silvana I, Carolina C, Raffaele B, Francesca MN. Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. *Life sciences.* 2003;73: 73-80.
112. Hoenicka M, Keyser A, Rupprecht L, Puehler T, Hirt S, Schmid C. Endothelium-dependent vasoconstriction in isolated vessel grafts: a novel mechanism of vasospasm?. *Ann Cardiothorac Surg.* 2011;92(4): 1299-1306.
113. Niu L, Zhang M, Liu Y, Xue W, Liu D, Zhang J, Liang Y. Vasorelaxant effect of taurine is diminished by tetraethylammonium in rat isolated arteries. *Eur J Pharmacol.* 2008;580 1-2, 169-74.

114. Shiga KI, Hirano K, Nishimura J, Niino N, Naito S, Kanaide H. Dimethyl sulfoxide relaxes rabbit detrusor muscle by decreasing the Ca^{2+} sensitivity of the contractile apparatus. *Br J Pharmacol*. 2007;151(7):1014-24.
115. Kaneda T, Sasaki N, Urakawa N, Shimizu K. Endothelium-Dependent and Independent Vasodilator Effects of Dimethyl Sulfoxide in Rat Aorta. *Pharmacol*. 2016;97(3-4):171-6.
116. Wald G. Molecular Basis Of Visual Excitation. *Science*. 1968. p. 230-9.
117. Deluca L, Maestri N, Bonanni F, Nelson D. Maintenance of epithelial cell-differentiation - mode of action of vitamin-A. *Cancer*. 1972;30(5):1326-31.
118. Wolbach SB HP. Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *J Exp Med*. 1925. p. 753-77.
119. Rothman KJ, Moore LL, Singer MR, Nguyen U, Mannino S, Milunsky A. Teratogenicity of high vitamin-a intake. *N Engl J Med*. 1995;333(21):1369-73.
120. Melhus H, Michaelsson K, Kindmark A, Bergstrom R, Holmberg L, Mallmin H, et al. Excessive dietary intake of vitamin A is associated with reduced bone mineral density and increased risk for hip fracture. *Ann Intern Med*. 1998;129(10):770-8.
121. Nozaki Y, Yamagata T, Sugiyama M, Ikoma S, Kinoshita K, Funauchi M. Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis. *Clin Immunol*. 2006;119(3):272-279.
122. Salazar MD, Ratnam M, Patki M, Kisovic I, Trumbly R, Iman M. During hormone depletion or tamoxifen treatment of breast cancer cells the estrogen receptor apoprotein supports cell cycling through the retinoic acid receptor alpha 1 apoprotein. *BCR*. 2011;13(1):17.
123. Yang L, Munoz-Medellin D, Kim HT, Ostrowski J, Reczek P, Brown PH. Retinoic acid receptor antagonist BMS453 inhibits the growth of normal and malignant breast cells without activating RAR-dependent gene expression. *Breast Cancer Res Treat*. 1999;56(3):277-91.

124. Wang XJ, Hayes JD, Henderson CJ, Wolf CR. Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(49):19589-94.
125. Wiegman PJ, Barry WL, McPherson JA, McNamara CA, Gimple LW, Sanders JM, et al. All-trans-retinoic acid limits restenosis after balloon angioplasty in the focally atherosclerotic rabbit - A favorable effect on vessel remodeling. *Arterioscler Thromb Biol*. 2000;20(1):89-95.
126. Cho DH, Choi YJ, Jo SA, Nam JH, Jung SC, Jo I. Retinoic acid decreases nitric oxide production in endothelial cells: a role of phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at Ser(1179). *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;326(4):703-10.
127. Achan V, Tran CTL, Arrigoni F, Whitley GSJ, Leiper JM, Vallance P. all-trans-retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells - A role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res*. 2002;90(7):764-9.
128. Uruno A, Sugawara A, Kanatsuka H, Kagechika H, Saito A, Sato K, et al. Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Circ*. 2005;112(5):727-36.
129. Chen KJ, Pittman RN, Popel AS. Nitric oxide in the vasculature: Where does it come from and where does it go? A quantitative perspective. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(7):1185-98.
130. Kashiwagi S, Kajimura M, Yoshimura Y, Suematsu M. Nonendothelial source of nitric oxide in arterioles but not in venules - Alternative source revealed in vivo by diaminofluorescein microfluorography. *Circ Res*. 2002;91(12):E55-E64.
131. Suematsu M, Suganuma K, Kashiwagi S. Mechanistic probing of gaseous signal transduction in micro circulation. *Antioxid Redox Signal*. 2003;5(4):485-92.
132. Huang A, Sun D, Shesely EG, Levee EM, Koller A, Kaley G. Neuronal NOS-dependent dilation to flow in coronary arteries of male eNOS-KO mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282(2):H429-H36.

133. Talukder MAH, Fujiki T, Morikawa K, Motoishi M, Kubota H, Morishita T, et al. Up-regulated neuronal nitric oxide synthase compensates coronary flow response to bradykinin in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44(4):437-45.
134. Nelson CP, Rainbow RD, Brignell JL, Perry MD, Willets JM, Davies NW, et al. Principal role of adenylyl cyclase 6 in K⁺ channel regulation and vasodilator signalling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2011;91(4):694-702.
135. Lipskaia L, Djiane A, Defer N, Hanoune J. Different expression of adenylyl cyclase isoforms after retinoic acid induction of P19 teratocarcinoma cells. *Febs Letters.* 1997;415(3):275-80.
136. Wilkinson DI, Orenberg EK. Retinoids increase the response of guinea-pig but not human keratinocytes to agonists of adenylate-cyclase in vitro. *Arch Dermatol Res.* 1983;275(3):147-51.
137. Kubacka M, Kotanska M, Kazek G, Waszkielewicz AM, Marona H, Filipek B, et al. Involvement of the NO/sGC/cGMP/K⁺ channels pathway in vascular relaxation evoked by two non-quinazoline alpha 1-adrenoceptor antagonists. *Biomed Pharmacother.* 2018;103:157-66.
138. Panthiya L, Pantan R, Tocharus J, Nakaew A, Suksamrarn A, Tocharus C. Endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxant effects of tiliacorinine 12'-O-acetate and mechanisms on isolated rat aorta. *Biomed Pharmacother.* 2019;109:2090-9.
139. Feletou M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol.* 2009;156(4):545-62.
140. Jackson WF. Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation.* 2005;12(1):113-27.

EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı



Sayı : 94603339-604.01.02/ 33117
Konu : Proje Onayı

21/09/2018

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALINA

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Doç. Dr. Tolga Reşat Aydos'un yürütücülüğünde Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Tıbbi Farmakoloji Doktora Programı öğrencisi Oğuzhan Ekin Efe'nin sorumluluğunda yürütülecek olan DA18/27 nolu "Sıçan izole torasik aorta preparatlarında asitretinin damar gevşetici etki mekanizmasının araştırılması" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 17/09/2018 tarih ve 18/24 sayılı kararı ile uygun görülmüştür. Projenin başlama tarihi ile çalışmanın sunulduğu kongre ve yayımlandığı dergi konusunda Kurulumuza bilgi verilmesini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Hakan ÖZKARDEŞ
Kurul Başkanı

Not: Çalışma bildiri ve/veya makale haline geldiğinde "Gereç ve Yöntem" bölümüne aşağıdaki ifadelerden uygun olanının eklenmesi gerekmektedir.

— Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:...) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

— This study was approved by Baskent University Ethical Committee for Experimental Resarch on Animals (Project no:...) and supported by Baskent University Research Fund.

DAĞITIM

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalına



BAŞKENT 25.
ÜNİVERSİTESİ Yıl

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KARARI

TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI	KARAR TARİHİ
18	18/24	17/09/2018

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Doç. Dr. Tolga Reşat Aydos tarafından yürütülecek olan DA18/27 nolu "Sıçan izole torasik aorta preparatlarında asitretinin damar gevşetici etki mekanizmasının araştırılması" başlıklı araştırma projesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından incelendi ve etik açıdan uygun olduğuna oybirliği ile karar verildi.

Prof. Dr. Hakan Özkardes

Prof. Dr. A. Eftal Yücel

Prof. Dr. Ali Varan

Prof. Dr. Feride Şahin

Prof. Dr. Adnan Fuat Büyüklü

Doç. Dr. Tolga Reşat Aydos

Dr. Didem Bacanlı

İmdat Aknermer

