

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN İZOLE MİDE FUNDUSUNDA
EPOKSİJENAZLARIN ETKİLERİNİN VE
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. DERYA SEBİLE KOÇ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. GÖKÇE SEVİM ÖZTÜRK FİNCAN

ANKARA
EKİM 2022

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN İZOLE MİDE FUNDUSUNDA
EPOKSİJENAZLARIN ETKİLERİNİN VE
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. DERYA SEBİLE KOÇ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. GÖKÇE SEVİM ÖZTÜRK FİNCAN

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TTU-
2021-7215 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
EKİM 2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin başlangıcından bugüne kadar değerli bilgileriyle bana yol gösteren, danışman hocam olmanın ötesinde her konuda bana emeği geçen, hoşgörü ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, asistanı olmaktan büyük mutluluk duyduğum Sayın Doç. Dr. Gökçe Sevim ÖZTÜRK FİNCAN'a, uzmanlık eğitimim süresince verdikleri değerli bilgiler, her konuda gösterdikleri hoşgörü, yardım ve destekleri için Prof. Dr. Sevil ÖZGER İLHAN'a ve Doç. Dr. Ergin DİLEKÖZ'e, eğitimimde emekleri olan Anabilim Dalımızın bütün öğretim üyelerine, asistanlığımın büyük bir bölümünde birlikte çalıştığım, her zaman her konuda bana destek olan sevgili arkadaşlarım Dr. Celil İlker AŞKIN ve Dr. Ayşe Kübra KİBAR'a, tez çalışmam sırasında desteğini esirgemeyen Ecz. Ayşegül KOÇ'a, laboratuvar çalışmalarında benden bilgisini esirgemeyen, tez çalışmalarında her zaman destek olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a, asistanlığımın sonunda beraber çalışabildiğim ama son dönemde moral ve destekleri için Dr. Tilbenur AKYEL'e ve 5 yıl boyunca birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, her konuda desteğini ve hoşgörüsünü eksik etmeyen, her zaman yanımda olan değerli eşim Dr. Aydın KOÇ'a, canım oğlum Ahmet Giray KOÇ'a ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan çok sevgili aileme içtenlikle teşekkür ederim.

Dr. Derya Sebile KOÇ

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	i
İçindekiler	ii
Şekil ve Grafik Dizini	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
1-GİRİŞ	1
2- GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mide	4
2.1.1. Mide Anatomisi ve Fizyolojisi	4
2.1.2. Midenin Fonksiyonları	5
2.1.3. Midenin İnnervasyonu	5
2.1.4. Kolinerjik Nörotransmisyon	6
2.2. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Sentez ve Metabolizması	7
2.2.1. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Sentezi	7
2.2.2. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Metabolizması	10
2.3. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Hücresel Etki Mekanizmaları	14

2.4. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Periferik Etkileri	20
2.4.1. Kardiyovasküler ve Renal Sistem Etkileri	20
2.4.2. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Ürogenital Sistemdeki Etkileri	25
2.4.3. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Gastrointestinal Sistemdeki Etkileri	26
3- GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Sıçan İzole Mide Fundus Preparatının Hazırlanması	27
3.2 Deney protokolü	28
3.2.1. EAU Aracılı Kasılma Yanıtlarının Tanımlanması	29
3.2.2. EAU Aracılı NO Bağımlı ve Bağımsız Kasılma Yanıtları	
Üzerine EET'lerin Etkisinin Araştırılması	29
3.2.3. EAU Aracılı NO Bağımlı ve Bağımsız Kasılma Yanıtları	
Üzerine EET'lerin Etkisine 14,15-EEZE'nin Katkısının Araştırılması	30
3.2.4. EAU Aracılı NO Bağımlı ve Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine	
EET'lerin Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin Katkısının Araştırılması	30

3.2.5. EAU Aracılı NO Bağımlı ve Bağımsız Gruplarda Kasılma Yanıtları

Üzerine Sitokrom P450 Mono-Oksijenaz İnhibitörlerinin Etkilerinin

Araştırılması 31

3.2.6. Potasyum Klorür ve Kalsiyumla Kastırılmış Dokularda

Agonist ve Antagonistlerin Etkilerinin Araştırılması 32

3.2.7. Western Blot yöntemiyle epoksit hidrolaz (sEH) ve CYP2J2'nin

varlığının tanımlanması 32

3.2.7.1. Sıçan Mide Fundus Doku Örneklerinden Total Protein Ekstraksiyonu 33

3.2.7.2. Western Blot Analizi 33

3.3. Deneylerde Kullanılan Solüsyon ve Maddeler 35

3.4. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz 36

4. BULGULAR 37

4.1. EAU Aracılı Kasılma Yanıtlarının Tanımlanması 37

4.2. EAU Aracılı NO Bağımlı ve Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine

11,12- EET'nin Etkisi 37

4.3. EAU Aracılı NO Bağımlı ve Bağımsız Kasılma Yanıtları

Üzerine 14,15-EET'nin etkisi 40

4.4. EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine 11,12-EET

Etkisinde 14,15-EEZE'nin Rolü 42

4.5. EAU Aracılı NO Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine 11,12-EET

Etkisinde 14,15-EEZE'nin Rolü 44

4.6. EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine 14,15-EET

Etkisinde 14,15-EEZE'nin Rolü 46

4.7. EAU Aracılı NO Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine 14,15-EET

Etkisinde 14,15-EEZE'nin Rolü 48

4.8. EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine

11,12-EET'nin Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü 50

4.9. EAU Aracılı NO Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine

11,12-EET'nin Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü 52

4.10. EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine

14,15-EET'nin Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin Katkısı 54

4.11. EAU Aracılı NO Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine 14,15-

EET'nin Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin Katkısı 56

4.12. EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine Sitokrom P450

Mono-Oksijenaz İnhibitörlerinin Etkileri 58

4.13. Potasyum Klorür ve Kalsiyumla Kastırılmış Dokularda

Agonist ve Antagonistlerin Etkileri 62

4.14. Western Blot yöntemiyle epoksit hidrolaz (sEH) ve CYP2J2'nin

varlığının tanımlanması 62

5. TARTIŞMA 64

6. SONUÇLAR 77

7. KAYNAKLAR 80

8. ÖZET 98

9. YABANCI DİLDE ÖZET (SUMMARY) 100

10. ÖZGEÇMİŞ 102

ŞEKİL VE GRAFİK DİZİNİ

Şekil 1: Araşidonik asit metabolizmasına genel bakış.	9
Şekil 2. CYP epoksijenaz yolu metabolizmasına genel bakış	10
Şekil 3. Mide fundus dokularından ekstrakte edilen protein örneklerinden CYP450-2J2 ve Epoksit hidrolaz protein bantlarının görüntüsü.	63
Grafik 1: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 11,12-EET (10^{-12} – 3×10^{-8} M)’nin etkisi	39
Grafik 2: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 14,15-EET (10^{-11} – 10^{-8} M)’in etkisi.	41
Grafik 3: EET Antagonisti olan 14,15-EEZE (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 11-12 EET (10^{-12} – 3×10^{-8} M)’nin etkisi.	43
Grafik 4: EET Antagonisti olan 14,15-EEZE (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 11-12 EET (10^{-12} – 3×10^{-8} M)’nin etkisi.	45

Grafik 5: EET Antagonisti olan 14,15-EEZE (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 14-15 EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin etkisi. 47

Grafik 6: EET Antagonisti olan 14,15-EEZE (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin etkisi. 49

Grafik 7: Potasyum kanal blokörleri, Glibenklamid (10^{-6} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M)'nin etkisi. 51

Grafik 8: Potasyum kanal blokörleri, Glibenklamid (10^{-6} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M)'nin etkisi. 53

Grafik 9: Potasyum kanal blokörleri, Glibenklamid (10^{-6} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 14-15 EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin etkisi. 55

Grafik 10: Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), 4-AP

(10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız

kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 14,15-EET (10^{-11} – 10^{-8} M)’nin etkisi.

57

Grafik 11: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine Mikonazol

(10^{-9} - 10^{-4} M)’ün etkisi.

59

Grafik 12: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 17- ODYA

(10^{-10} - 10^{-5})’ nın etkisi.

61

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Araşidonik asit
Ach	Asetilkolin
ATP	Adenozin trifosfat
A-II	Anjiyotensin II
BK _{Ca}	Kalsiyumla aktive olan potasyum kanalı
Ca ⁺²	Kalsiyum
CCK	Kolesistokinin
COX	Siklooksijenaz
CYP	Sitokrom P450
DAG	Diaçilgliserol
DHET	Dihidroksieikosatetraenoik asit
DMSO	Dimetilsülfooksit
dk	Dakika
EAU	Elektriksel Alan Uyarısı
EDHF	Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör
EET	Epoksieikozatrienoik asit

eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
EH	Epoksit hidrolaz
FABP	Yağ asidi bağlayıcı protein
g	Gram
GTP	Guanozin trifosfat
Gs	Guanilat siklaz
HETE	Hidroksieikozatetraenoik asit
Hz	Hertz
IP3	İnositol trifosfat
K ⁺	Potasyum iyonu
K _{ATP}	ATP duyarlı potasyum kanalları
K _{Ca}	Kalsiyumla aktive olan potasyum kanalları
K _v	Voltajla aktive olan potasyum kanalları
L-NAME	N-nitro-L-arjinin metil ester
LOX	Lipoksijenaz
M	Molar

ml	Mililitre
ms	Milisaniye
mV	Milivolt
μ M	Mikromolar
Na ⁺	Sodyum iyonu
NANK	Non adrenerjik non kolinergik
NF- κ B	Nükleer faktör- κ B
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1
PL	Fosfolipid
PDE	Fosfodiesteraz
PVDF	Poliviniliden florur
PG	Prostoglandin
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C

PKG	Protein kinaz G
PPAR α	Peroksizom proliferatör aktive edilmiş reseptör
sAMP	Siklik adenosin monofosfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel
sGMP	Siklik guanozin monofosfat
sPLA2 α	sitozolik fosfolipaz A2
sEH	Çözünebilir epoksit hidrolaz
TBST	Tris-tamponlu tuz çözeltisi
TEA	Tetraetilamonyum
TXA2	Tromboksan A2
TRPV4	Geçici reseptör potansiyel vanilloid 4 kanalları
V	Volt
4-AP	4-aminopiridin
14,15-EEZE	14,15-epoksieikosa-5(Z)-enoik asit
14,15-EEZE-SI	14,15-EEZE metilsülfonamid
17-ODYA	17-oktadesinoik asit

1. GİRİŞ

Epoksieikozatrienoik asitler (EET)'ler, Araşidonik asit (AA)'nın sitokrom P450 (CYP) epoksijenazları tarafından sentezlenen endojen lipid metabolitleridir (1). CYP2C ve CYP2J gen ailelerinden olan epoksijenazlar AA'yı epoksieikozatrienoik asitler (EET)'e dönüştürürler. EET'ler epoksit grubu içerirler ve EET'ler bu grubun yerleştiği karbon atomu numarasına göre adlandırılırlar. Epoksijenasyonun AA' nın 4 çift bağından herhangi birinde oluşmasına göre, 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET ve 14,15-EET olmak üzere 4 regioizomerik formu vardır (2, 3). EET'ler oluştuktan sonra, membran fosfolipidlerine esterleşme, proteinlere bağlanma, β -oksidasyon yoluyla daha kısa zincir moleküllerine metabolize edilme veya çözünür epoksit hidrolaz (sEH) ile metabolize edilme gibi çeşitli yollarla geri dönüştürülebilir veya atılabilirler (4). Birçok dokuda EET metabolizması için ana yol, epoksit hidrolaz aracılığıyla dihidroksieikosatetraenoik asidi (DHET) oluşturulmasıdır (5, 6). EET'lerin DHET'lere dönüşümü genellikle EET'lerin biyolojik olarak inaktif hale getirildiği bir süreç olarak görülse de, DHET'lerin koroner dolaşımda vazoaaktif oldukları ve böbrekte arginin vazopressinin hidroozmotik etkisinin inhibitörleri olduğu gösterilmiştir (7, 8). EET'lerin etkilerinin bir veya birden fazla reseptör aracılığıyla olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur (9). EET'lerin hücresel etkileri için farklı mekanizmalar ileri sürülmektedir. Bunlardan birincisi G proteini ile kenetli, selektif EET reseptörlerinin varlığı, ikincisi lipitte çözünebilir agonistlerin reseptörlerine bağlanarak etki göstermesi ve sonuncusu da EET'lerin hücre içine alınması ve hücre içinde iyon kanalları, sinyal proteinleri veya

transkripsiyon faktörleri ile direkt olarak etkileşmeye geçmesidir. EET'lerin ayrıca ADP-ribozilasyon, Gsα aracılı etkiler, protein kinaz A (PKA) aktivasyonu ve tirozin fosforilasyonu dahil olmak üzere hücre zarı sinyal mekanizmalarını etkilediği gösterilmiştir (10). CYP epoksijenazlar ile oluşturulan EET'ler, yüksek iletkenliğe sahip, kalsiyumla aktive olan (BK_{Ca}) K⁺ kanallarını ve membran hiperpolarizasyonunu aktive ederek vasküler düz kas gevşemesine neden olurlar (11, 12). Sıçan mezenterik arteriyel K_{ATP} kanallarının, 11,12-EET tarafından güçlü bir şekilde aktive edildiği bildirilmiştir (13). Yapılan bir çalışmada düz kas hücrelerinin plazma membranında bir EET reseptörünün mevcut olabileceğini ve bu reseptörün vasküler düz kas hücrelerinde K_{ATP} kanallarının aktivasyonunda rol oynadığını desteklemektedir (14). Son yıllarda yapılan araştırmalar, EET'lerin vasküler sistemde önemli biyolojik etkilerinin olduğunu vurgulamaktadır. EET'ler kardiyovasküler sistemde vazodilatasyon, antiinflamasyon, antiagregasyon gibi etkileriyle dikkat çekmektedir (4). EET agonistlerinin gelişimi, EET antagonistlerinin keşfine de yol açmıştır. 14,15-EEZE ve 14,15-EEZE metilsülfonamid (14,15-EEZE-SI)' nin parsiyel agonist aktiviteye sahip olduğu ve EET'nin neden olduğu gevşemeyi antagonize ettiği belirlenmiştir (15). Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi ile insan jejunumunda araşidonik asitten intestinal sitokrom P450'nin in vivo epoksidasyonu ile epoksieikosatrienoik asitlerin varlığı ilk kez kanıtlanmıştır. İnsan ve sıçan bağırsağının, otonomik ganglion hücrelerinde, epitel hücrelerinde, düz kas hücrelerinde ve vasküler endotelde lokalize olan CYP2J alt ailesine ait bir epoksijenaz içerdiği sonucuna ulaşılmıştır (16). EET'lerin gastrointestinal kanalda düz kas fonksiyonları üzerine

etkilerinin bakıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Sunulan çalışmada, mide fundus düz kasında epoksijenazların etkilerinin ve oluşan etkilere K^+ kanallarının ve nitrik oksidin katkısının araştırılması amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. MİDE

Mide gastrointestinal sistemin özefagus ve duodenum arasında bulunan genişlemiş bölümüdür. Midede yiyecekler depolanıp, kimyasal ve mekanik olarak sindirime hazırlanır ve sonrasında duodenuma gönderilir. Mide sıvısı yiyecekleri yarı sıvı kıvamlı kimüse dönüştürür ve hızlı bir şekilde duodenuma geçmesini sağlar. Boş mide ince barsaktan biraz daha genişken, yemek alımını takiben 2-3 litre (L) hacme kadar genişleyebilme kapasitesine sahiptir (17).

2.1.1 Mide Anatomisi ve Fizyolojisi

Midenin proksimal ucu diyafragmanın birkaç santimetre (cm) altında özofagusla birleşirken distal ucu orta hattın hemen sağında duodenum ile birleşir. Midenin superomedial sınırına küçük kurvatur, inferolateral sınırına büyük kurvatur adı verilir.

Makroskopik olarak mide 4 bölüme ayrılır:

Kardia; özofagusun hemen distalinde, gastroözefageal bileşkeden sonraki 1-3 cm'lik bölge olarak tanımlanır.

Fundus; midenin gastroözefageal bileşkesinin üstünde, sol hemidiyafragmanın hemen altında kalan kısımdır.

Antrum midenin pilora komşu olan distal 1/3'lük bölgesidir. Bu bölgeler haricinde kalan kısım ise korpus olarak adlandırılır (17).

2.1.2. Midenin Fonksiyonları

Gastrointestinal sistemin temel fizyolojik fonksiyonu besinlerin sindirilmesi ve absorbe edilip kan dolaşımına verilmesidir. Bu görevleri yerine getirmek için gereken fonksiyonlar: motilite, sekresyon, sindirim ve absorpsiyondur.

Mide Peristaltizminin Mekanığı: Peristaltik kontraksiyonlar yavaş dalga veya temel elektriksel ritim denen membran potansiyelindeki periyodik değişikliklerle meydana gelir. Mide duvarındaki pacemaker hücreler gastrik yavaş dalgaları meydana getirir. Mide peristaltizmi gastrin ve ACh ile regüle edilir. Ekstrasellüler sıvıdan kalsiyumun (Ca^{+2}) hücre içine girmesiyle yavaş dalga potansiyeli meydana gelir. Gastrik motiliteyi etkileyen hormonlardan eksitator etkili olan gastrin, antral distansiyona yanıt olarak dolaşıma verilir. İnhibitör etkili olan ve enterogastronlar olarak bilinen kolesistokinin (CCK) ve sekretin hormonları gastrik kontraksiyonları inhibe ederler. CCK, proteinlerin ve yağların sindirimine cevap olarak duodenumdan salgılanır. Sekretin ise asit varlığında duodenumdan salgılanır. Düz kaslar üzerinde direkt inhibitör etkilidirler (18).

2.1.3. Midenin İnervasyonu

Enterik sinir sistemi (ESS), merkezi sinir sisteminden (MSS) bağımsız olarak işlev görebilen, miyenterik plexus ve submukozal plexustaki gangliyonları barındıran bir grup nöron ve glial hücreden oluşur. MSS, parasempatik ve sempatik uyarılarla etkisini gösterir. ESS, *Cajal* hücreleri ile etkileşim sağlayarak ve gastrointestinal sistemin geri kalanının motilitesi ile mideyi koordine ederek, mide boşalmasının kontrolünü sağlar. ESS'nin mide boşalmasında rolü olmasına rağmen,

alışmalar ESS'nin inhibisyonunun midedeki aktivite dalgalarını tamamen ortadan kaldırmadığını göstermiştir (19).

Sempatik sinir sistemi, mide üzerinde temel olarak inhibe edici bir etkiye sahiptir ve ayrıca kan damarlarının vazokonstriksiyonuna neden olur (20). Parasempatik sistem, vagus siniri aracılığıyla mide üzerinde hem uyarıcı hem de inhibe edici etkiye sahiptir (21).

2.1.4. Kolinerjik Nörotransmisyon

Otonom sinirlerin gastrik motiliteyi düzenlediği kabul edilmektedir. Parasempatik sinirlerin mide üzerinde uyarıcı, sempatik sinirlerin ise inhibe edici bir etkisi olduğu düşünülmektedir (20, 22). Bununla birlikte, çalışmalar vagus sinirinin mide üzerinde hem inhibitör hem de uyarıcı etkilerini muskarinik reseptörler aracılığı ile gösterdiğini vurgulamaktadır (23, 24). G proteinleri ile kenetli muskarinik reseptörler kolinerjik agonistler tarafından aktive edilince sinyal iletimi gerçekleştirirler (25). Yapılarına, fonksiyonlarına ve bağlanma özelliklerine göre 5 tane muskarinik reseptör alt tipi (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5) tanımlanmıştır (26). M_1 , M_3 ve M_5 alt tipleri genellikle G_q ile M_2 ve M_4 alt tipleri de genellikle G_i proteini ile bağlıdır (27). Farelerde yapılan bir çalışmada, mide dokusunda kasılmalara M_3 reseptörü alt tipinin aracılık ettiği, M_2 reseptör alt tipinin de bu kasılmalara yaklaşık %45 oranında katkıda bulunduğu saptanmıştır (28, 29). Sıçanlarda mide dokusunda yapılan bir çalışmada ise antrumdaki sirküler düz kasın kasılmasında M_3 reseptör alt tipinin etkisi olduğu ayrıca M_2 reseptörünün de bu etkide rolü olduğu vurgulanmıştır (30). M_3 reseptör alt tipinin gastrointestinal

kanalda postsinaptik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (31). Presinaptik düzeyde ise uyarıcı ya da inhibitör muskarinik otoresptörler bulunabileceği vurgulanmıştır (32). Kobay ileumunda longitudinal kas myenterik pleksusu üzerinde yapılan bir çalışmada presinaptik konumda bulunan M_3 reseptörlerinin asetilkolin salıverilmesini inhibe ettiği, presinaptik konumda bulunan M_1 reseptörlerinin ise asetilkolin salıverilmesini arttırdığı gösterilmiştir (33). Kobaylarda yapılan bir çalışmada ise ileuma ait sirküler düz kasta bulunan presinaptik inhibitör muskarinik reseptörlerin M_1 alt tipi olduğu öne sürülmüştür (34). Kobay midesi üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada ise presinaptik M_1 ve M_2 reseptörlerinin asetilkolin salıverilmesini inhibe ettikleri gösterilmiştir (35).

2.2. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Sentez ve Metabolizması

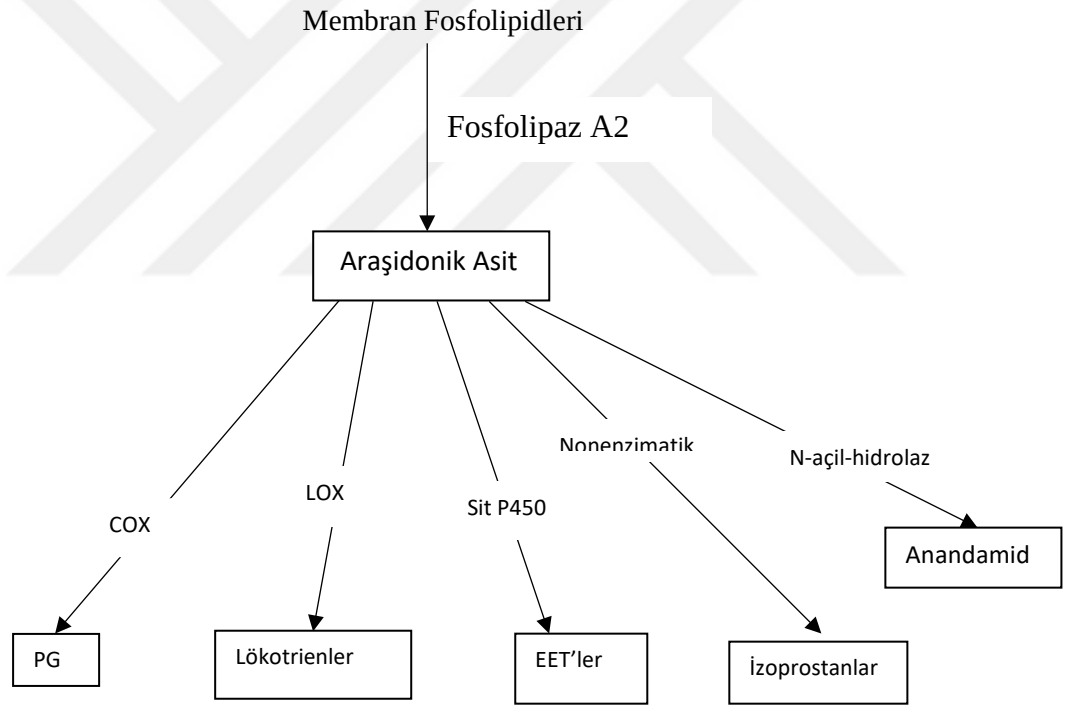
2.2.1. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Sentezi

Araşidonik asit (AA) in vivo olarak hücre zarı gliserofosfolipidlerine esterlenmiş biçimde bulunur. Hücrede Ca^{+2} artışının ardından fosfolipazlar aktive olur. Fosfolipazlar, fosfolipid (PL) havuzlarından AA'nın serbest bırakılmasını sağlar ve birkaç enzim sistemi ile oksidatif metabolizma için AA'nın substrat olarak kullanılmasına neden olur. AA salınımından sorumlu ana enzim, grup IVA sitozolik fosfolipaz A2'dir (sPLA2 α). Farklı PLA2 enzimleri eikosanoid üretimine katkıda bulunabilse de, sPLA2 α insanlarda eikosanoid üretimi için AA sağlamada büyük rol oynar (36).

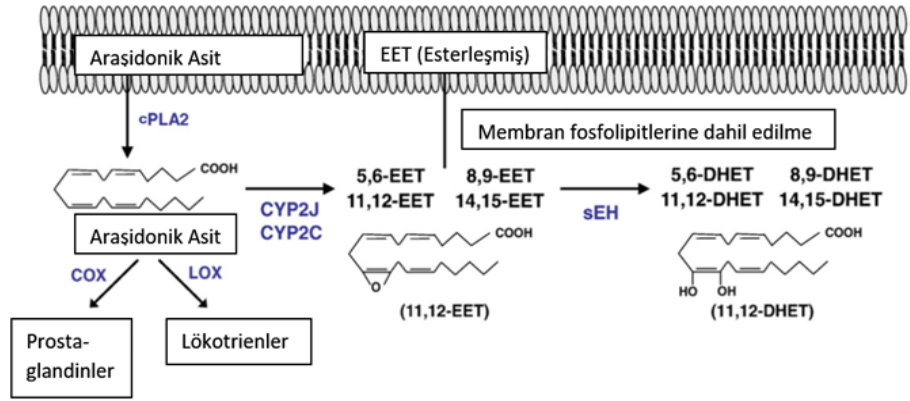
Siklooksijenaz (COX) enzimleri AA'yı prostaglandinler, tromboksan ve prostasiklinin öncüsü olarak görev yapan prostaglandin H2'ye metabolize ederler

(37). Lipoksigenazlar (LOX'lar), AA'yı kararsız hidroperoksi ara metabolitlerine dönüştürür ve lökotrienler, hidroksieikosatetraenoik asitler (HETE'ler) ve lipoksinleri oluşturur. Üçüncü fakat daha az bilinen bir yolak da AA'yı sitokrom P450 (CYP) enzim sistemi ile orta zincir HETE'lerine, ω -terminal HETE'lerine ve epoksieikozatrienoik asitlere (EET) metabolize eder. AA'nın bu üç metabolizma yolağı, ilk sentez adımını katalize eden enzime göre adlandırılır. EET'ler, AA'nın CYP epoksijenazları tarafından sentezlenen endojen lipid metabolitleridir (1). CYP2C ve CYP2J gen ailelerinden olan epoksijenazlar AA'yı Epoksieikozatrienoik asitler(EET)'e dönüştürürler. AA'nın allilik oksidasyonu ile birkaç orta zincirli konjuge dienol (5-, 8-, 9-, 11-, 12- ve 15-HETE'ler) oluşturulur. ω -terminal hidroksilasyon ile AA'nın (16-, 17-, 18-, 19- ve 20-HETE'ler) C16–C20 alkollerini oluşturulur. ω -hidroksilaz, CYP4A ve CYP4F gen ailesinden olup vazokonstriktör etkili 20-HETE oluşumunu sağlar. Olefin epoksidasyonu ise (epoksijenaz reaksiyonu olarak da adlandırılır), birbirlerinin R,S veya S,R enantiomeri olacak şekilde epoksieikosatrienoik asitlerin (14,15-, 11,12-, 8,9- ve 5,6-EET'ler) üretimi ile sonuçlanır. Ana insan CYP epoksijenazları, AA'yı dört EET'nin tümüne dönüştürebilen CYP2C8/9/19 ve CYP2J2'dir. EET'ler epoksit grubu içerirler. Bu grup yan yana bulunan iki karbon arasında stabil olmayan oksijen köprüsünden oluşmaktadır. EET'ler bu grubun yerleştiği karbon atomu numarasına göre adlandırılırlar. Epoksijenasyonun AA' nın 4 çift bağından herhangi birinde oluşmasına göre, 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET ve 14,15-EET olmak üzere 4 regioizomerik formu vardır. Her bölge izomeri, S/R ve R/S enantiyomerlerinin bir karışımından oluşur. Her enantiyomer farklı oranda

gevşeme yanıtı oluşturur (2, 3). (Şekil 1) Sıçan renal arterlerinde 11(R),12(S)-EET gevşemeye neden olurken, 11(S),12(R)-EET herhangi bir etki göstermemiştir (2). 14(S),15(R)-EET sığır koroner arterlerinde gevşemeye neden olurken, 14(R),15(S)-EET'nin gevşeme yanıtı daha düşüktür (38). Bu bulgular, farklı regioizomerik ve stereoselektif EET'lerin gevşeme yanıtı üzerinde farklı etkilere sahip olabileceği fikrini desteklemektedir (39).



Şekil 1: Araşidonik asit metabolizmasına genel bakış.



Şekil 2: CYP epoksijenaz yolu metabolizmasına genel bakış. (40).

2.2.2. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Metabolizması

EET'ler çeşitli yollarla hızla metabolize edilir. EET'lerin hücre içi seviyeleri sıkı bir şekilde düzenlenir. EET'ler oluşturulduktan sonra, membran fosfolipidlerine esterleşme, proteinlere bağlanma, β -oksidasyon yoluyla daha kısa zincir moleküllerine metabolize edilme veya çözünür epoksit hidrolaz (sEH) ile metabolize edilme gibi çeşitli yollarla geri dönüştürülebilir veya atılabilirler (4).

Epoksit hidrolazın en çok çalışılan iki formu olan ve memelilerde araşidonik asit epoksitlerini metabolize ettiği gösterilenler, çözünür epoksit hidrolaz (sEH) ve mikrozomal epoksit hidrolazdır. Bu enzimler substratlarının yapısına ve hücresel lokalizasyonlarına göre sınıflandırılmışlardır. sEH ile mikrozomal epoksit hidrolaz arasında sEH enzimi daha baskındır (6, 41, 42).

sEH, bir homodimer yapıdadır. N-terminal alanı, lipid fosfatları hidrolize eden bir fosfataz aktivitesi sergilerken, C-terminali alanı, epoksitleri diollerine dönüştüren bir epoksit hidrolaz aktivitesi sergiler (43). Birçok dokuda EET

metabolizması için ana yol, epoksit hidrolaz aracılığıyla dihidroksieikosatetraenoik asidi (DHET) oluşturulmasıdır (5, 6). Birçok organda DHET'lerin varlığı, bu yolun in vivo oluştuğunu doğrular. Yüksek sEH aktivitesi içerenler arasında karaciğer, böbrek, bağırsak ve damar dokusu bulunur. Düşük sEH seviyeleri testislerde, akciğerlerde, beyinde ve dalakta bulunur. sEH baskın olarak sitozolde yer alsa da, sEH enzimatik aktivitesi ve sEH proteininin varlığı peroksizomlarda da gösterilmiştir (44, 45). Zeldin ve arkadaşları sEH ile EET hidrasyonunun 14(R),15(S)-EET, 11(S),12(R)-EET ve 8(S),9(R)-EET enantiyomerleri için stereoselektif olduğunu vurgulamıştır. EET'lerin sEH tarafından metabolize edilmesi, stereoselektif özelliklerin yanı sıra regioizomerik özelliklere de bağlıdır. 14,15-EET regioizomeri, sEH tarafından tercih edilen substrattır, ardından 11,12-EET ve 8,9-EET gelir. Ayrıca, 5,6-EET de bu enzim için zayıf bir substrattır (46).

EET'lerin DHET'lere dönüşümü genellikle EET'lerin biyolojik olarak inaktif hale getirildiği bir süreç olarak görülse de, DHET'lerin koroner dolaşımda vazoaaktif oldukları ve böbrekte arginin vazopressinin hidroozmotik etkisinin inhibitörleri olduğu gösterilmiştir (7, 8).

sEH yolağının araştırılması, doku ve dolaşımdaki EET seviyelerini artıran sEH inhibitörlerinin ve transgenik sEH fareleri geliştirilmesi, CYP epoksitlerinin ve diollerin biyolojik etkilerinin tanımlanmasına büyük ölçüde katkıda bulunmuştur (47, 48). Küçük moleküllü bir inhibitör kullanmak ya da EPHX genlerini silmek, sEH'nin aktivitesini azaltabilir. sEH aktivitesinin baskılanması, EET'lerin biyoyararlanımını arttırmak için çok önemli bir yöntem olarak kabul edilir. Sonuç

olarak sEH inhibisyonu EET'lerin hidrolizini engelleyerek EET'lerin seviyesini artırabilir (49, 50).

Transgenik sEH fareleri ile yapılan bir çalışmada EET'lerin DHET'lere dönüşümünün azaldığı gösterilmiş. Bunun yanında EET'lerin uzun zincirli epoksit metabolitlerinin ve β oksidasyon yolu ile oluşan kısa zincirli epoksit metabolitlerinin sentezinin arttığı vurgulanmıştır. β -oksidasyon ürünleri büyük ölçüde hücrelerden atılırken, uzun zincirli metabolitlerin esterleşme yolu ile çoğunlukla endotelial fosfolipidlere dahil edildiği gösterilmiştir. sEH inhibe edildiğinde β -oksidasyon ve zincir uzamasının ortaya çıkması, bu süreçlerin EET metabolizmasının alternatif yolları olarak işlev gördüğünü düşündürmüştür (51).

EET'ler böbrek ve karaciğer dokusunda fosfolipidlerin sn-2 pozisyonuna esterlenebilir ve bu esterleşme reaksiyonu potansiyel olarak hücre zarı kanal aktivitesini düzenleyerek fosfolipid aracılı sinyal iletim süreçlerinde bir rol oynayabileceklerini düşündürmektedir. Hücre içi EET'lerin çoğu fosfolipidlerde bulunduğundan, EET salıverilmesi bir fosfolipazın Ca^{+2} bağımlı aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. Fosfolipazın türü belirlenmemiştir, ancak EET'lerin sn-2 konumunda bulunması, muhtemelen bir fosfolipaz A2 olduğunu düşündürmektedir. Chen ve arkadaşları esterleşmiş EET'lerin bir lipid çift tabakasında kardiyak Ca^{+2} kanal aktivitesini inhibe ettiğini bildirmiştir. Bu bulgular, fosfolipidlerdeki esterleşmiş EET'lerin hücre zarı iyon taşınmasının düzenlenmesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir (52).

Yağ asidi bağlayıcı proteinlere (FABP) bağlanma, EET'lerin düzenlenebildiği başka bir potansiyel mekanizmadır. FABP sitozolde esterlenmemiş EET'yi fiziksel olarak bağlar, bağladığı EET'nin hedef proteinlere ve enzimlere dağıtımını düzenler. EET'nin bir kısmı, yağ asidi sentez ve oksidasyonunda görev alan Koenzim A'ya bağlı bir yolak aracılığıyla fosfolipitlere dâhil edilir ve daha sonra fosfolipaz aracılı hidroliz ile fosfolipitlerden yavaşça elimine edilir. Esterleşmemiş EET'nin bir kısmı DHET'e dönüştürülür ve DHET'in çoğu hücre dışı sıvıya salıverilir (53, 54). FABP'nin EET'lere yüksek afinitesi vardır ve bu bağlanma, EET'lerin DHET'lere dönüşümünü azaltır. EET'lerin FABP ile bağlanması, EET'ler için bir depo görevi görmekle birlikte EET'lerin biyolojik eylemlerinin düzenlenmesine katkıda bulunur (55). FABP, DHET'e kıyasla EET'lere daha fazla afinite göstermektedir. Bu veriler FABP bağlanmasının, EET'lerin hücre içi tutulmasını kolaylaştırabileceğini ve FABP'nin DHET'e afinitesinin düşük olmasından dolayı DHET'lerin hücrelerden salıverilmesini kısmen açıklayabilmektedir (56).

Yapılan bir çalışmada domuz koroner arter düz kas hücrelerinde 11,12 EET'den 11,12 DHET oluştuktan sonra β -oksidasyon yoluyla 11,12-DHET'in de metabolize edildiği gösterilmiştir. 11,12 DHET'ten vazodilatör aktiviteye sahip olan bir 16-karbon diol olduğu bulunmuş olup EET'lerin β -oksidasyonla kısa zincirli epoksitlere de dönüştürüldüğü gösterilmiştir (7). EET'lerden dolaylı olarak oluşan kısa zincirli epoksitler bir Δ^4 -cis-çift bağı içeren 16 karbonlu metabolitlerdir ve yapılan ek çalışmalar ile bu ürünlerin peroksizomal β -oksidasyon ile oluşturulduğunu göstermiştir (57).

Bunların dışında 5,6-EET'nin COX tarafından 5,6-epoksi-prostaglandinlere metabolize edildiğini ve COX metabolizmasının 5,6-EET aracılı biyolojik eylemlere katkıda bulunduğu bildirilmiştir (58, 59). Bu da COX metabolizmasının 5,6-EET'nin etkilerine katkıda bulunduğu dair kanıt sağlamaktadır.

Prostaglandinlerin aksine, HETE ve EET'ler doku lipidlerinde depolanabilir ve bir hormonal uyarıya cevap olarak salıverilebilir. HETE ve EET'nin lipidlere bağlanması, karaciğer, böbrekler ve trombositler gibi bazı dokuların bu maddeler için depo görevi görmesini sağlar (60, 61).

2.3. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Hücresel Etki Mekanizmaları

EET'lerin etkilerinin bir veya birden fazla reseptör aracılığıyla olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur (9). EET'lerin hücresel etkileri için farklı mekanizmalar ileri sürülmektedir. Bunlardan birincisi G proteini ile kenetli, selektif EET reseptörlerinin varlığı, ikincisi lipidde çözünebilen agonistlerin reseptörlerine bağlanarak etki göstermesi ve sonuncusu da EET'lerin hücre içine alınması ve hücre içinde iyon kanalları, sinyal proteinleri veya transkripsiyon faktörleri ile direkt olarak etkileşmeye geçmesidir. EET'lerin ayrıca ADP-ribozilasyon, Gsα aracılı etkiler, protein kinaz A (PKA) aktivasyonu ve tirozin fosforilasyonu dahil olmak üzere hücre zarı sinyal mekanizmalarını etkilediği gösterilmiştir (10).

Hücre yüzeyinde EET reseptör bölgesinin varlığı ilk olarak Wong ve arkadaşları tarafından, insan U-937 monositlerinin plazma membranında ve kobay mononükleer hücrelerinde 14,15-EET için yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri

gösterilmiştir (62, 63). EET'lerin vasküler düz kas hücrelerinde spesifik bağlanma bölgeleri veya reseptörler ile etkileşime girerek ADP-ribozilasyon yoluyla Gsα'nın aktivasyonuna yol açtığı vurgulanmaktadır. Bu durum, adenilil siklaz aktivitelerinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Sonrasında sAMP oluşumunu artır ve PKA'yı aktive eder. PKA, vasküler K_{ATP} kanallarını fosforile ederek aktive eder, membran hiperpolarizasyonu sonrasında düz kaslarda gevşeme meydana gelir (15). EET'lerin Gsα'nın GTP bağlama aktivitesini 3.5 kat arttırdığı ve insan U-937 monosit hücrelerinde, kobay mononükleer hücrelerinde hücre içi sAMP konsantrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (62, 63).

Kardiyovasküler sistemde K_{ATP} kanalları yoğun miktarda bulunur ve K_{ATP} kanallarının vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (64). Yapılan bir çalışmada sıçan mezenterik arteriyel K_{ATP} kanallarının, 11,12-EET tarafından güçlü bir şekilde aktive edildiği bildirilmiştir. 11,12-EET ile K_{ATP} kanallarının aktivasyonu mezenterik damar gevşeme yanıtının yaklaşık %50'sini oluşturmuş olup, bu etkilerin PKA ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (13).

EET'lerin gevşetici yanıtlarının sığır koroner arterinde, EET'ye özgü antagonistler olan 14,15-epoksieikosa-5(Z)-enoikasit(14,15-EEZE) ve 14,15-epoksieikosa-5(Z)-enoik-metilsulfonilimid(14,15-EEZE-mSI) tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (15). Yapılan bir çalışmada mezenterik arteriyel K_{ATP} kanallarının 14,15-EET ile aktivasyonunun 14,15-EEZE, anti-Gsα antikorları ve ADP-riboziltransferaz inhibitörleri tarafından bloke edildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, 14,15-EET'nin izole edilmiş küçük mezenterik arterlerde güçlü

vazodilatasyon oluşturduğunu ve 14,15-EET'nin etkilerinin 14,15-EEZE ve ADP-riboziltransferaz inhibitörleri tarafından önemli ölçüde azaltıldığını göstermektedir. Ayrıca pinasidil (ATP duyarlı potasyum kanal açıcısı) aracılı K_{ATP} kanalı aktivasyonu ve bunun sonucu oluşan vazodilatasyon, 14,15-EEZE ve ADP-riboziltransferaz inhibitörleri ile ön inkübasyonla veya yama pipet çözeltisine anti- $G\alpha$ antikorunun eklenmesiyle inhibe edilememiştir, dolayısıyla bu bulgular bileşiklerin etkilerinin spesifik olduğunu ve K_{ATP} kanal aktivasyonu ile sonuşlanan EET sinyal yolundaki basamaklara etki ettiğini göstermektedir. Ayrıca 14,15-EEZE'ye glibenklamid (K_{ATP} kanal inhibitörü) ilavesinin ek bir inhibitör etkisi olmamıştır. Bu durum 14,15-EEZE'nin 14,15-EET tarafından indüklenen vazodilatasyonun K_{ATP} kanal aktivasyon bileşenini tamamen inhibe etmede yeterli olduğunu düşündürmektedir. İlaveten ADP-riboziltransferaz inhibitörü olan 3-aminobenzamid ile inkübasyon, 14,15-EET vazodilatör etkilerinin önemli ölçüde inhibisyonuna neden olmuştur ve bu durum ADP-ribozilasyonun 14,15-EET'nin etkilerine aracılık ettiğini göstermektedir (65). Bu bulgular düz kas hücrelerinin plazma membranında bir EET reseptörünün mevcut olabileceğini ve bu reseptörün vasküler düz kas hücrelerinde K_{ATP} kanallarının aktivasyonunda rol oynadığını desteklemektedir (14).

EET'lerin hücreSEL düzeydeki etkileri incelendiğinde bu etkilere aracılık edebileceği düşünölen 3 tip kalsiyum duyarlı potasyum kanalı mevcuttur. İletkenliklerine göre bu kanallar yüksek iletkenliğe sahip, kalsiyumla aktive olan K^+ (BK_{Ca}) kanalları, orta iletkenliğe sahip, kalsiyum ile aktive olan K^+ (IK_{Ca}) kanalları ve düşük iletkenliğe sahip, kalsiyum ile aktive olan K^+ (SK_{Ca})

kanallarıdır. CYP epoksijenazlar ile oluşturulan EET'ler, yüksek iletkenliğe sahip, kalsiyumla aktive olan BK_{Ca} kanallarını ve membran hiperpolarizasyonunu aktive ederek vasküler düz kas gevşemesine neden olurlar (11, 12). EET'lerin, özellikle 11,12- ve 14,15-EET'nin, hiperpolarizasyon ve gevşemeyi ortaya çıkarmak için vasküler düz kas hücreleri üzerindeki BK_{Ca} kanallarını aktive edebileceğinin anlaşılması, onların bir Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör (EDHF) sınıfı olarak tanımlanmasına yol açmıştır (66, 67). 11,12-EET'nin, domuz koroner vasküler düz kas hücresinde SK_{Ca} , IK_{Ca} ile birlikte BK_{Ca} kanalını da aktive ettiği bildirilmiştir (68). BK_{Ca} kanallarının aktivasyonuna bağlı endojen ADP-ribozilasyonunun rolü sığır koroner arterlerinde incelenmiştir. EET'lerin, ADP-ribozilasyon ile guanin nükleotid bağlayıcı protein olan $G_{s\alpha}$ 'nın aktivasyonu yoluyla hücre içi sAMP artışına neden olduğu gösterilmiştir. Bu yolun ise 11,12-EET tarafından indüklenen BK_{Ca} kanallarının aktivasyonuna aracılık etmede önemli bir rol oynadığı vurgulanmıştır (69).

Mezenterik arterde yapılan bir çalışmada 11,12-EET ve 11,12-EET analogları olan 11,12-eter-EET-8-ZE, 11,12-eter-EET-8-ZE-OH ve 11,12-tetra-EET-8-ZE mezenterik arter gevşemesine neden olduğu gösterilmiştir. 11,12-EET ve 11,12-EET analogları, mezenterik miyosit protein fosfataz 2A (PP2A) aktivitesini 3.5 kat arttırmıştır. Protein fosfataz inhibitörü olan Okadaik asit ve EET inhibitörü 14,15-EEZE, PP2A aktivitesinde 11,12-EET aracılı artışı inhibe etmiştir. Bu bulgular, PP2A aktivitesinin BK_{Ca} kanallarının aktivasyonu ile ilişkili olduğu ve EET'lerin oluşturduğu gevşeme yanıtına katkı sağladığı düşünülmektedir (70).

Öte yandan, 5,6-EET ve 8,9-EET'nin fare endotel hücrelerinde geçici reseptör potansiyel vanilloid 4 kanallarını (TRPV4) aktive ettiği gösterilmiştir. Bu vanilloid kanalın aktivasyonu sonucunda Ca^{2+} akışı ile beraber endotelial K^+ kanalı aktive olur. Endotel hücrelerinin hiperpolarize olduğu, ardından vasküler düz kasın gevşediği gösterilmiştir (68). Yapılan başka bir çalışmada seçici olmayan bir K^+ kanal blokörü olan tetraetilamonyum (TEA) ile 5,6-EET'nin vazodilatör etkisi ortadan kaldırılarak, EET'ye bağlı vazodilatasyonun K^+ kanallarının aktivasyonu ile ilgili olduğu doğrulanmıştır (71). Koroner arterde, mezenterik arterlerde ve aortta gevşeme ve hiperpolarizasyon TEA tarafından bloke edildiği tespit edilmiştir, ancak glibenklamid tarafından bloke edilmediği gösterilmiştir. Bu veriler damar gevşeme yanıtına ATP'ye duyarlı K^+ kanalları inhibitörü olan glibenklamid'in değil, seçici olmayan K^+ kanal blokörü olan TEA'nın etki ettiğini ortaya koymuştur (72-74).

EET'lerin biyolojik aktivitesi, hücrelerin plazma membranında bulunan bir reseptörün aracılık ettiği bir mekanizma ile ilişkilidir. EET'lerin reseptöre bağlanması üzerine bir sinyal kaskadı başlattığı düşünülmektedir. EET'ler reseptöre bağlandığında, sAMP tarafından uyarılan ve aromataz geninin transkripsiyonuna neden olan mekanizma aktive olur. EET'lerin aromataz üzerindeki biyolojik etkilerini bu mekanizma ile sağladığı düşünülmektedir ve vasküler tonusun korunmasına katkıda bulunduğu vurgulanmıştır (75, 76).

Sıçan izole aort dokusunda EET'lerin gevşetici etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada, dokular U-46619 (Tromboksan A2 analogu) ve fenilefrin ile inkübe edilerek kasılma yanıtı elde edilmiştir. EET'lerin gevşetici etkisi selektif

tromboksan (TP) antagonisti olan SQ-29548 ve alfa reseptör antagonisti olan prazosin ile karşılaştırılmış olup 14,15-EET, SQ-29548'e benzer şekilde bir gevşeme yanıtına neden olurken, prazosinin yaptığı gevşeme yanıtına benzer bir gevşeme yanıtı oluşturmamıştır. Bu nedenle 14,15-EET'nin TP reseptörleri üzerinden de etkili olabileceği ileri sürülmüştür (77).

Yapılan bir çalışmada, mikrozomlarda EET'lerden oluşturulan ω -hidroksillenmiş 11,12- ve 14,15-EET türevlerinin peroksizom proliferatör aktive edilmiş reseptör (PPAR $_{\alpha}$) 'yı aktive ettiğini göstermiştir, bu da EET ile uyarılan gen ifadenin düzenlenmesinin hücre içi bir mekanizma yoluyla gerçekleştiğini düşündürmektedir (78).

Tirozin kinaz bağlantılı kaskadlar aracılığıyla EET biyolojik tepkimelere aracılık edebilir. Domuz aortu endotelial hücre lizatlarındaki tirozin kinaz aktivitesinin 11,12-EET ilave edildikten sonra 3 kat kadar arttığı gösterilmiştir. Tirozin kinaz aktivitesinde EET ile indüklenen artış, Ca⁺² konsantrasyonunda veya K⁺ kanal aktivasyonunda bir değişikliğe neden olmadan gerçekleşmiştir. Bu bulgular, aktive edilen tirozin kinazın çözünür mü yoksa membran bağlantılı mı olduğunu göstermemekle birlikte EET'lerin hücrel mekanizmalarında rol aldığını desteklemektedir (79).

2.4. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Periferik Etkileri

2.4.1. Kardiyovasküler ve Renal Sistem Etkileri

Son yıllarda yapılan araştırmalar, EET'lerin vasküler sistemde önemli biyolojik etkilerinin olduğunu vurgulamaktadır. EET'ler kardiyovasküler sistemde vazodilatasyon, antiinflamasyon, antiagregasyon gibi etkileriyle dikkat çekmektedir. EET oluşumundaki bir bozukluğun hipertansiyona neden olabileceği düşünülmektedir. EET'lerin en önemli metabolize olma yollarından biri olan sEH enzimi üzerinde durulmuştur. Bir sEH inhibitörünün kan basıncını düşürme mekanizmasının, üç farklı etkene bağlı olduğu vurgulanmıştır. Birincisi, EET'lerin renal dolaşımında DHET'lerden daha fazla vazodilatasyon oluşturduğu bilinmektedir (58). Hipertansif sıçanlarda meydana gelen Ang II'ye karşı artan renal mikrovasküler aktivite, 11,12-EET analogu tarafından baskılanmaktadır, bu da endojen EET'deki bir artışın benzer bir etkiye sahip olacağını düşündürmektedir. sEH inhibitörünün uygulanması, EET'lerin hidrolizini azaltır ve bu nedenle daha yüksek bir endojen EET seviyesi sağlar. Bu durum, renal vazokonstriksiyonu azaltır ve böylece renin-Ang II-aldosteron bağımlı hipertansiyonu azalttığı görülmüştür(80). İkinci bir faktör, sEH inhibisyonunun, EET'lerin fosfolipidlere dahil edilmesini arttırarak, hücre uyarıldığında daha fazla EET mobilizasyonuna yol açmasıdır. EET'nin artan salıverilmesinin vazodilatasyon yanıtını güçlendirdiği düşünülmektedir (51). Üçüncü faktör, sEH inhibe edildiğinde, artan miktarlarda EET'nin β -oksidasyon yoluyla, kısa zincirli epoksi yağ asitlerine dönüştürülmesidir. Bu koşullar altında ortamda biriken kısa zincirli epoksi yağ asitlerinin, güçlü vazodilatasyona neden olduğu tespit edilmiştir (81). Yapılan

başka bir çalışmada sEH(Ephx2) gen silme ve sEH inhibisyonunun etkileri karşılaştırılmış ve sEH inhibisyonuna kıyasla sEH geni silinen farelerde EET'lerin DHET'lere dönüşme oranının daha yüksek olduğu ve sEH inhibisyonunda 9-HETE, 11-HETE, 15-HETE ve 19-HETE'nin plazma konsantrasyonlarının arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular AA metabolizmasının bahsi geçen HETE'lerin sentezlenme yolları olan ω -hidroksilaz-LOX yollarına doğru ilerlemesine neden olduğu düşünülmektedir. Proinflamatuvar faktör olan HETE'lerin seviyesinin artması EET'lerin antiinflamasyon ve kardiyoprotektif etkilerini ortadan kaldırmaktadır (82). Dahl sıçanlarındaki genetik hipertansiyon nedeninin epoksijenaz aktivitesindeki yetersizlikten kaynaklandığı düşünülmektedir ayrıca genetik hipertansiyonu olan farelere sEH gen hasarı da uygulandığında diyetlerinde tuz olup olmaması farketmeksizin kan basınçlarının düştüğü gözlemlenmiştir (83).

Böbreklerde epitelyal transport incelendiğinde, 11,12-EET'nin biyolojik olarak aktif EET regioizomeri olduğu görülmektedir. 11,12-EET'nin epitelyal sodyumun geri emilimini engellediği ve yüksek diyet sodyumuna yanıt olarak kan basıncının düzenlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (84, 85). AA türevi CYP metabolitleri olan EET'ler ve 20-hidroksiyeikosatetranoik asit (20-HETE) böbrek metabolizmasında anahtar rol oynar ve hem renal tübüler hem de vasküler fonksiyonların düzenlenmesinde etkilidir. CYP enzimleri, tübüler epitel hücrelerinde yüksek oranda bulunur ve sodyumun tübüler transportunun düzenlenmesine katılan EET'leri ve HETE'leri sentezler (86). Ayrıca gebelik hipertansiyonu bulunan kadınlarda epoksit metabolitlerinin üriner atılımı artmıştır. Bu bulgular, EET'lerin ve sEH'nin kan basıncının düzenlenmesinde aktif rol

oynadığını ve hipertansiyonda yeni bir tedavi metodu olabileceğini düşündürmektedir (87). Sistemik hipertansiyonda AA'nın vazodilatör etkisinin mikonazol(epoksijenaz inhibitörü) ile azaldığı bulunmuştur. Asetilkolin nitrik oksit (NO) bağımsız renal vazodilatasyona neden olurken mikonazol bu etkiyi azaltmaktadır (88).

Çözünür epoksit hidrolazın (sEH) artan aktivitesinin ve düşük EET seviyelerinin diyabetik nefropatinin altında yatan nedenlerden biri olduğu düşünülmektedir. Streptozotosin kaynaklı diyabette sEH gen silinmesinin afferent renal arteriyol endotel fonksiyonunu iyileştirdiği ve böbrek hasarını azalttığı rapor edilmiştir (89). Genetik olarak obez Zucker sıçanlarının renal ve mezenterik mikrodamarlarında CYP2C epoksijenazların seviyesinin azalması bozulmuş vazodilatasyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur (90).

Kısa bir yarı ömre sahip olan bir başka regioizomer olan 5,6-EET'nin de vazodilatör bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (59, 91-93). Yang ve arkadaşları 5,6-EET analogları kullanarak 5,6-EET'nin vasküler aktivitesini tanımlamışlar ve 5,6-EET analogunun metil türevinin (5,6-EET-Me) sığır koroner arterlerinde doza bağlı gevşemeye neden olduğunu ifade etmişlerdir (91). EET regioizomerleri arasında 5,6-EET'nin, izole edilmiş perfüze tavşan böbrek dokusunun gevşemesinde güçlü etkisi olduğu ve 5,6-EET aktivitesinin siklooksijenaz tarafından bloke edilen tek izomer olduğunu gösteren in vivo bir fizyoloji çalışması bulunmaktadır (94). Ayrıca, izole edilmiş perfüze tavşan böbreğinin 5,6-EET'yi siklooksijenaz metabolitleri 5-hidroksi-PGI1 ve 5,6-epoksi-PGE1'e dönüştürdüğü

bulunmuştur. Ayrıca, 5,6-epoksi-PGE1'nin vazodilatör etkisini 5,6-EET'ye eşdeğer olduğu gösterilmiştir (59).

EET agonistlerinin gelişimi, EET antagonistlerinin keşfine de yol açmıştır. EET antagonistleri, vasküler dokularda EET'lerin biyolojik rollerini belirlemek için farmakolojik bir araç olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda asetilkolin, bradikinin ve lokal endotel gerim stresine (shear stres) bağlı vazodilatasyonun endotel bağımlı olduğu ve siklooksijenaz, nitrik oksit sentaz inhibitörleri ile azaldığı gösterilmiştir. Bu ajanlarla oluşan gevşeme yanıtında siklooksijenaz ve nitrik oksit sentaz inhibitörleri uygulandıktan sonra kalan gevşeme yanıtının selektif EET antagonisti olan 14,15-epoksiheksa-5(Z)-enoik asit tarafından tamamen ortadan kalkmış olduğu gösterilmiştir (95). 14,15-EEZE ve 14,15-EEZE metilsülfonamid (14,15-EEZE-SI)'nin parsiyel agonist aktiviteye sahip olduğu ve EET'nin neden olduğu gevşemeyi antagonize ettiği belirlenmiştir. 14,15-EEZE tüm regioizomerik EET'lerde gevşemeyi engellerken, 14,15-EEZE-SI'nin 14,15-EET ve 5,6-EET ile indüklenen gevşemeyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar ayrıca AA'ya yanıt olarak prostaglandinlerden bağımsız vazodilatasyonun 14,15-EEZE tarafından inhibe edildiğini göstermiştir (15, 38). Sığır koroner arterinde yapılan çalışmalarda 14,15-EEZE ve 14,15-EEZE-SI, EET'lerin gevşeme yanıtları üzerindeki etkilerini azaltmıştır. Prostaglandin analogu iloprost ve NO donörü sodyum nitroprusid'in etkilerini değiştirmemiştir. Sonuçlar 14,15-EEZE ve 14,15-EEZE-SI'nin seçici EET antagonisti olduğunu göstermektedir (96, 97). COX ve NOS inhibitörlerinin varlığında insan meme arterlerinin bradikinin ve asetilkolin kaynaklı gevşemesi 14,15-EEZE ile ortadan kaldırılmıştır. Bu bulgular, düz kas

hücresi hiperpolarizasyonu yoluyla bradikinin, metakolin ve asetilkolinin neden olduğu, NO ve COX'ten bağımsız gerçekleşen vazodilatasyona EET'lerin aracılık ettiğini destekleyen güçlü kanıtlar sağlamıştır(98). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada adenosin analogu olan adenosin 5'-N-etilkarboksamide gevşemeye neden olduğu tespit edilmiştir. 14,15-EEZE ile yanıtın azaldığı gözlemlenmiştir. EET'lerin AA reseptörlerini aktive eden adenosin analoglarının aracılık ettiği gevşemeye katkı sağladığı belirlenmiştir (99). EET'ler ve antagonistlerinin kardiyovasküler sistemde farklı etkileri değerlendirildiğinde, EET'lerin iskemik reperfüzyon hasarında kardiyak koruyucu etkilerinin 14,15-EEZE ile ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (100). Bu bulgular, EET antagonistlerinin EET'lerin biyolojik etkilerini tanımlamak için önemli farmakolojik araçlar olduğunu göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda in vivo olarak asetilkolin (ACh) ile indüklenen retinal arteriyollerin genişlemesinde EET'lerin rolü araştırılmıştır. Vazodilatör yanıtları, oküler fundus görüntülerinde retina arteriyollerinin çapındaki değişiklik belirlenerek değerlendirilmiştir. Bir CYP epoksijenaz inhibitörü olan 17-oktadesinoik asit ve EET'lerin bir antagonisti olan 14,15-EE5(Z)E'nin intravitreal enjeksiyonunun, retina arteriyollerinin ACh ile indüklenen gevşemesini azalttığı bulunmuş ve EET antagonistleri, NO sentazların ve siklooksijenazların inhibitörleri olan NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) ve indometasin ile oluşan inhibisyon altında ACh'ye karşı oluşan gevşeme yanıtının zayıfladığı görülmüştür. 14,15-EET'nin intravitreal enjeksiyonu sonrası retina arteriyollerindeki gevşeme yanıtının, BK_{Ca} kanallarının bir inhibitörü olan iberiotoxin tarafından önlendiği

görülmüştür. Bu sonuçlar, ACh'nin EET'lerin üretimini uyardığını ve böylece BK_{Ca} kanallarının aktivasyonu yoluyla retinal arteriyolleri genişlettiğini göstermektedir (101) .

2.4.2. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Ürogenital Sistemdeki Etkileri

Sıçan izole miyometriyum düz kasında yapılan bir çalışmada, EETlerin etkilerini incelemek için sıçanlardan elde ettikleri miyometriyumda spontan kontraksiyonlar devam ederken 8,9-EET, 11,12-EET ve 14,15-EET etkisini değerlendirmişler ve epoksijenazların spontan kasılma yanıtlarını azalttığı tespit edilmiş, ayrıca miyometriyum dokusunda sEH ve CYP2J2'nin varlığı Western Blot yöntemiyle gösterilmiştir (102).

İşli ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, sitokrom P450 monooksijenaz inhibitörlerinin ve EET'lerin, izole tavşan korpusunda Elektriksel Alan Stimülasyonunun (EAU) aracılık ettiği NO bağımlı ve bağımsız non-adrenerjik non-kolinerjik (NANK) gevşeme yanıtlarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Etkilerini presinaptik bir mekanizma ile gösterdikleri bildirilmiştir (103).

Sıçan izole korpus kavernozumunda EETlerin etkisinin gösterildiği bir çalışmada, fenilefrin ile kasılmış izole dokuda 11,12-EET ile yaklaşık %80'lik bir gevşeme yanıtı olduğu tespit edilmiştir. Oluşan gevşetici etkinin nitrik oksit sentez inhibitörü L-NAME, ATP duyarlı potasyum kanal blokörü glibenklamid, kalsiyumla aktive potasyum kanal blokörü iberiotoksin ve soluble guanilat siklaz

inhibitörü 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) eklenmesiyle azaldığı saptanmıştır. 11,12- EET'nin korpus kavernozum üzerindeki gevşetici etkisine K_{ATP} ve K_{Ca} 'nın yanı sıra sGMP/NO yolağının aracılık ettiği gösterilmiştir (104). Ayrıca 14,15-EEZE, sıçanlarda erektile yanıtı azaltmıştır ve buna ek olarak normal erektile fonksiyon için NO ile birlikte EET'lerin gerekli olduğu vurgulanmıştır (105).

2.4.3. Epoksieikozatrienoik Asitlerin Gastrointestinal Sistemdeki Etkileri

EET'lerin gastrointestinal sistemde inflamasyon ile ilgili süreçlerde yer aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. EET'ler anti-inflamatuar özellikler sergiler. Kessler ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sitokinler ve lipopolisakkarit gibi proinflamatuvar mediatörlerin EET'lerin oluşumunu ve epoksijenaz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (106).

Ülseratif kolit hastalarından izole edilen örneklerde EET'lerin düzeylerini ve üretimini değerlendirmek amacıyla, lezyonlu dokular ve kontrol grubu olan sağlıklı gruplar arasında Western Blot analiziyle CYP2J2 düzeylerine bakılmıştır. Ülseratif kolitli dokuda CYP2J2 düzeyleri anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda yine EET düzeylerini karşılaştırmışlardır ve ülseratif kolitli dokuda EET düzeylerinin anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğunu saptamışlardır (107).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Sıçan İzole Mide Fundus Preparatının Hazırlanması

Deneylerde 250-300 g ağırlığındaki 30 adet erkek wistar sıçan kullanılmıştır. Çalışma Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (G.Ü.ET - TTU-2021-7215). Sıçanlar standart laboratuvar koşullarında [$20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12saat aydınlık, 12saat karanlık] tutuldu ve su içmeleri serbest, standart laboratuvar hayvan yemi ile beslendi. Sıçanlar ketamin/ksilazin (45 mg/kg /5 mg/kg, i.v.) ile anesteziye edildikten sonra karın orta hat bölgesinden açılarak mideye ulaşıldı. Mide fundusu distal kısmından ayrılarak büyük kurvatur boyunca açılıp özefagus sfinkteri ile büyük kurvatur arasındaki bölge kesilerek çıkarıldı. Dokular önceden 37°C 'ye ısıtılmış %5 CO_2 , %95 O_2 karışımı ile havalandırılan Krebs solüsyonu bulunan petrilere konulup, petrilere epidermal doku bağ dokusu dokudan uzaklaştırıldı. Mide fundusu $3\times 3\times 20$ mm boyutunda longitudinal şeritler halinde kesilerek ve hazırlandı. Dokular organ askısı yardımıyla Krebs solüsyonu içeren 20 ml'lik organ banyosuna bir ucu organ askısına bir ucu da izometrik kuvvet transdüserine (MAY, FDT35, COMMAT Ltd. Ankara, Türkiye) bağlı olacak şekilde yerleştirildi. İzometrik düz kas kasılmaları ve gevşemeleri transdüserler aracılığı ile (BIOPAC, MP35 System Inc, COMMAT Ltd., Ankara, Türkiye) kayıt edildi.

3.2 Deney protokolü

Dokulara deneyin başlangıcında 1 g ön gerim uygulanmış ve 15 dakika ara ile banyolar yıkanıp 1 saat dengelenmeye bırakılmıştır. Spontan tonusun oluşması nedeniyle bozulan gerim dinlenme süreci boyunca tekrar 1 g'a ayarlanmıştır. Dinlenme periyodunun ardından yapılan ön deneylerde Elektriksel Alan Uyarısı (EAU) için uygun parametreler belirlenmiş, EAU için dokular iki platin elektrod arasına vertikal olarak ve elektrodla değmeyecek şekilde asılmıştır. EAU aracılı kasılma yanıtları 120 sn aralıkla 10 sn süre ile 60 volt, 1 ms parametrelerinde ve 16 Hz de alınmıştır.

EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları, sempatik sinir sisteminin ve prostaglandinlerin etkisini ortadan kaldırmak için, sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini inhibe eden guanetidin (10^{-6} M) ve siklooksijenaz inhibitörü indometasin (10^{-5} M) varlığında alınmıştır. Guanetidin ve İndometasin organ banyosuna EAU aracılı kasılma yanıtları elde edilmeden 20 dk önce eklenmiştir.

Ayrı bir seri deneyde kolinerjik kasılma yanıtları, guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M)'e ek olarak NOS inhibitörü NG-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) (10^{-4} M) varlığında alınmıştır. Guanetidin, indometasin ve L-NAME organ banyosuna EAU aracılı kasılma yanıtları elde edilmeden 20 dk önce eklenmiştir.

Maddelerin çözücüsü olan etanol ve dimetil sülfoksit (DMSO)'in dokular üzerinde etkileri değerlendirilmiş ve etkileri görülmemiştir.

3.2.1. EAU Aracılı Kasılma Yanıtlarının Tanımlanması

Mide fundus şeritlerinde EAU aracılı kasılma yanıtları alındıktan sonra ortama farklı dokularda farklı agonist ve antagonistler (sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini inhibe eden guanetidin, 10^{-6} M; siklooksijenaz inhibitörü indometasin, 10^{-5} M; muskarinik reseptör antagonisti atropin, 10^{-6} M; antikolinesteraz neostigmin, 10^{-6} M; Nitrik oksit sentaz inhibitörü L-NAME, 10^{-4} M) uygulanarak tanımlama yapıldı.

3.2.2. EAU Aracılı NO Bağımlı ve Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine EET'lerin Etkisinin Araştırılması

Mide fundus şeritlerinde guaneditin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında EAU aracılı kontrol kasılma yanıtları stabilize olduktan sonra ortama kümülatif olarak 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M) ve 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M) eklenip NO bağımlı EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine etkisi gözlemlenmiştir.

Ayrı bir seri deneyde mide fundus şeritlerinde guaneditin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında EAU aracılı kasılma yanıtları stabilize olduktan sonra ortama kümülatif olarak 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M) ve 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M) eklenip NO bağımsız EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine etkisi gözlemlenmiştir.

3.2.3. EAU Aracılı NO Bağımlı ve Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine EET'lerin Etkisine 14,15-EEZE'nin Katkısının Araştırılması

Mide fundus şeritlerinde guaneditin (10^{-6} M) , indometasin (10^{-5} M) ve EET antagonisti olan 14,15-epoxyeicosa-5(Z)-enoicasit (14,15-EEZE) (10^{-7} M) varlığında EAU aracılı kasılma yanıtları stabilizeştikten sonra 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M) ve 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'in NO bağımlı EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

Ayrı bir seri deneyde Mide fundus şeritlerinde guaneditin (10^{-6} M) , indometasin (10^{-5} M), L-NAME (10^{-4} M) ve EET antagonisti olan 14,15-EEZE (10^{-7} M) varlığında EAU aracılı kasılma yanıtları alındıktan sonra 11,12-EET(10^{-12} - 3×10^{-8} M) ve 14,15-EET(10^{-11} - 10^{-8} M)'in NO bağımsız EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

3.2.4. EAU Aracılı NO Bağımlı ve Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine EET'lerin Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin Katkısının Araştırılması

Mide fundus şeritlerinde guaneditin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında EAU aracılı kasılma yanıtları stabilizeştikten sonra ortama kümülatif olarak 11,12- EET(10^{-12} - 3×10^{-8} M) ve 14,15- EET(10^{-11} - 10^{-8} M) eklenip NO bağımlı EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine etkisi gözlemlenmiştir. Ardından aynı protokol potasyum kanal blokörleri; ATP bağımlı (K_{ATP}) kanal blokörü glibenklamid(10^{-6} M), kalsiyumla aktive edilen potasyum (K_{Ca}) kanal blokörü iberiotoksin (10^{-8} M), voltaj bağımlı potasyum kanal (K_v) blokörü 4-AP (10^{-4} M)

varlığında tekrar edilmiştir. Her bir potasyum kanal blokörünün etkisi ayrı dokuda değerlendirilmiştir.

Mide fundus şeritlerinde guaneditin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L NAME (10^{-4} M) varlığında EAU aracılı kasılma yanıtları stabilize olduktan sonra ortama kümülatif olarak 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M) ve 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M) eklenip NO bağımsız EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine etkisi gözlemlenmiştir.

Ardından aynı protokol potasyum kanal blokörleri; ATP bağımlı (K_{ATP}) kanal blokörü glibenklamid (10^{-6} M), kalsiyumla aktive edilen potasyum (K_{Ca}) kanal blokörü iberiotoxin (10^{-8} M), voltaj bağımlı potasyum kanal (K_v) blokörü 4-AP (10^{-4} M) varlığında tekrar edilmiştir. Her bir potasyum kanal blokörünün etkisi ayrı dokuda değerlendirilmiştir.

3.2.5. EAU Aracılı NO Bağımlı ve Bağımsız Gruplarda Kasılma Yanıtları Üzerine Sitokrom P450 Mono-Oksijenaz İnhibitörlerinin Etkilerinin Araştırılması

Mide fundus şeritlerinde guaneditin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında EAU aracılı kontrol kasılma yanıtları elde edildi. Kasılma yanıtları stabilize olduktan sonra ortama kümülatif olarak sitokrom p450 monooksijenaz inhibitörleri: non spesifik sitokrom P450 inhibitörü mikonazol (10^{-9} - 10^{-4} M), spesifik ω -hidroksilaz inhibitörü 17- oktadesinoik asit (17-ODYA) (10^{-9} - 10^{-5} M) eklenmiş ve bu enzim inhibitörlerinin NO bağımlı EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine olan etkisine bakılmıştır. Her bir enzim inhibitörünün etkisi ayrı dokuda değerlendirilmiştir.

Mide fundus şeritlerinde guaneditin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) ve NOS inhibitörü L-NAME (10^{-4} M) varlığında EAU aracılı kontrol kasılma yanıtları elde edildi. Kasılma yanıtları stabilleştikten sonra ortama kümülatif olarak p450 monooksijenaz inhibitörleri: non spesifik sitokrom P450 inhibitörü mikonazol (10^{-9} - 10^{-4} M), spesifik ω -hidroksilaz inhibitörü 17- oktadesinoik asit (17-ODYA) (10^{-9} - 10^{-5} M) eklenip bu enzim inhibitörlerinin NO bağımsız EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine olan etkisine bakılmıştır. Her bir enzim inhibitörünün etkisi ayrı dokuda değerlendirilmiştir.

3.2.6. Potasyum Klorür ve Kalsiyumla Kastırılmış Dokularda Agonist ve Antagonistlerin Etkilerinin Araştırılması

Mide fundus şeritleri, ortamda guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında 80 mM potasyum klorür (KCl) ve 2,5 mM kalsiyum (Ca^{+2}) ile kasıldı. Kümülatif olarak 11,12-EET(10^{-12} - 3×10^{-8} M), 14,15 EET (10^{-11} - 10^{-8} M), Mikonazol(10^{-9} - 10^{-4} M) ve 17 ODYA(10^{-9} - 10^{-5} M) ve tek doz EET antagonisti 14,15-EEZE(10^{-7} M) eklenip kasılma yanıtları üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Her bir enzim inhibitörünün etkisi ayrı dokuda değerlendirilmiştir.

3.2.7. Western Blot Yöntemiyle Epoksit Hidrolaz (sEH) ve CYP2J2'nin Varlığının Tanımlanması

Western Blot yöntemi ile ilgili çalışmalar Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD laboratuvarında yapılmıştır.

3.2.7.1. Sıçan Mide Fundus Doku Örneklerinden Total Protein Ekstraksiyonu

Epoksit hidrolaz ve sitokrom p450-2J2 (CYP450-2J2) protein ifade düzeyleri Western Blot (WB) yöntemi ile belirlenmiştir. 100 mg doku örneği alınarak, buz üzerinde steril bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldıktan sonra proteaz ve fosfataz inhibitörleri ile desteklenmiş RIPA tamponu kullanılarak mekanik parçalayıcı (IKA T10) yardımıyla parçalanmış hücrelerden protein izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen total protein miktarı BCA Protein Assay kiti kullanılarak belirlenmiştir. Kit protokolüne uygun olarak 25 µg ile 2000 µg konsantrasyon arasında değişen 7 adet Bovine Serum Albumin (BSA) standardının dilüsyonları oluşturulmuştur. Kit içerisinde bulunan A ve B çözeltileri 50:1 oranında karıştırılarak elde edilen karışım standart protein dilüsyonlarına eklenmiş ve 30 dk 37 °C’de inkübe edilmiştir. Süre sonunda proteinlerin konsantrasyonları SpectraMax M3 (Molecular Devices, ABD) cihazında 562 nm dalga boyunda ölçülerek standart eğri hazırlanmış ve bu eğri yardımıyla protein miktarları belirlenmiştir.

3.2.7.2. Western Blot Analizi

Total protein konsantrasyonları belirlenmiş olan protein lizatlarından, eşit miktarda (30 µg) olacak şekilde protein karışımı alınarak, 4X Laemmli yükleme tamponu (%10 SDS, 20% Gliserol, %0.01 Bromofenol mavisi, 0.3125M Tris HCl pH:6.8) 3:1 oranında karıştırılmıştır. Ardından kuru ısıtıcı blokta proteinleri denatüre etmek amacıyla karışım 5 dakika süre ile 95°C’de bekletilmiş ve ardından

+4 derecede 5 dk soğuması beklenmiştir. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforez sistemiyle (Biorad), %4'lük yükleme jeli ve %10 luk SDS-PAGE ayırma jeli kullanılarak dikey elektroforez uygulanmıştır. İlk kuyucuğa boyalı peroksidaz işaretli protein moleküler ağırlık belirteci ve diğer kuyucuklara sırasıya denatüre edilmiş protein örnekleri yüklenerek elektroforez işlemi 100 V'da 1.5-2 saat +4 °C'de yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde proteinlerin yürütme tamponu aracılığıyla moleküler ağırlıklarına göre ayrılması sağlanmıştır.

Elektroforez işleminin tamamlanmasının ardından, metanol ile aktive edilmiş 0.2 µm poliviniliden florur (PVDF) membrana proteinlerin transferinin gerçekleştirilmesi amacıyla PAGE jel ile membran yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak şekilde karşı karşıya getirilerek transfer düzeneği oluşturulmuştur. Islak transfer sistemi kullanılarak 250 mA sabit akımda 2.5 saat +4 °C'de transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Birincil antikorların özgül olmayan bağlanmasını engellemek amacıyla membranlar, %0,1 Tween-20 eklenmiş tris-tamponlu tuz çözeltisi (1X TBST) içerisinde hazırlanmış %3 BSA çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında bloklama işlemine tabi tutulmuştur. Bloklama işleminin sonunda membranlar %3 BSA içeren 1X TBST içerisinde seyreltilmiş anti-CYP450-2J2 (1:1000) ile anti-Epoxide hydrolase (1:1000) antikorları ve housekeeping protein olarak anti-β-actin (1:1000) antikoru ile +4 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün İnkübasyonun ardından membranlar, 5 dakika boyunca 3'er defa 1X TBST çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonunda membranlar, %3 BSA içeren 1X TBST içerisinde seyreltilmiş anti-tavşan IgG, HRP konjuge sekonder antikoru (1:2000) ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sekonder antikor ile

inkübasyonun ardından membranlar, 5 dakika boyunca 3'er defa 1X TBST çözeltisinde yıkandıktan sonra kemilüminesan ışığa veren kromojen substrat (Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore, Almanya) ile muamele edilmiştir. Elde edilen kemiluminesans ışığı Kodak Gel Logic 2200 Carestream (ABD) görüntüleme sisteminde fotoğrafı çekilerek bant görüntüleri kaydedilmiştir. Western blot analizi her bir antikor için en az 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (108).

3.3 Deneylerde Kullanılan Solüsyon ve Maddeler

Banyo solüsyonu olarak kullanılan Krebs-Henseleit çözeltisinin bileşimi (mM), NaCl 118; KCl 4.7; NaHCO₃ 25; NaH₂PO₄-2H₂O 0.9; CaCl₂-2H₂O 1.26; MgCl-6H₂O 0.5; Glukoz monohidrat 11.

80 mM KCl 'lik Krebs-Henseleit çözeltisinin bileşimi (mM), NaCl 42.7; KCl 80.0 mM; NaHCO₃ 25; NaH₂PO₄-2H₂O 0.9; CaCl₂-2H₂O 1.26; MgCl-6H₂O 0.5; Glukoz monohidrat 11.

Atropin sülfat, neostigmin, guanetidin monosülfat, L-NAME hidroklorid, 11,12-EET, 14,15-EET, Mikanazol, 17-ODYA indometasin Sigma Chemical Co (St. Louis MO, ABD)'den 14,15-EEZE Cayman Chemical Co (Michigan, ABD)'den temin edilmiştir.

Atropin sülfat, neostigmin, guanetidin monosülfat, L-NAME hidroklorid distile suda, indometasin, mikonazol ve 17-ODYA dimetil sülfoksit (DMSO)'te çözünmüş olup düşük konsantrasyonları ise distile su kullanılarak elde edilmiştir.

14,15-EET, 11,12-EET etanol içinde çözünmüş olup düşük konsantrasyonları ise distile su kullanılarak elde edilmiştir.

Western blot yönteminde kullanılan maddeler ve çözeltiler; Anti-Epoxyde hydrolase antibody(Abcam), Anti-CYP2J2 Polyclonal Antibody(MyBiosource), Beta Actin Monoconal Antibody (Cell Signal Tecn.), RİPA tamponu(Abcam), Tris-Glycine Buffer(Cell Signal Tecn.), TBS(Cell Signal Tecn.), BCA Protein Assay kiti, Bovine Serum Albumin (BSA), Etanol (Sigma, ABD), Laemmli buffer (Sigma, ABD), Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Thermo Fisher Scientific, Almanya), Tetrametilendiamin (TEMED) (Thermo Fisher Scientific, Almanya)

3.4 Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz

Sitokrom P450 yolağı ürünlerinin ve mono-oksijenaz inhibitörlerinin kontrol yanıtlarına olan etkisi ifade edilirken, EAU aracılı kasılma yanıtları kontrol yanıtlarının yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Verilerin istatistiksel analizi “IBM SPSS Statistics 22” programı ile bilgisayar ortamında yapılmıştır. Deneysel sonuçlar, ortalama değer $\pm$ standart hata ile ifade edilmiştir. Deney gruplarından elde edilen yanıtların istatistiksel olarak anlamlılığını değerlendirmek için bağımsız gruplarda Mann Whitney U testi, gruplar arası farklılık değerlendirilirken Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Gruplar arası farklılıkta farkın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak için düzeltmeli p değerine göre Mann Whitney U testi yapılmıştır. $p < 0.05$ ise ortalamalar arası fark anlamlı kabul edilmiştir. Western Blot analizi ile epoksit hidrolaz (sEH) ve CYP2J2’nin varlığının tanımlanması semikantitatif olarak yapılmıştır.

4.BULGULAR

4.1. EAU Aracılı Kasılma Yanıtlarının Tanımlanması

Guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadi. Atropin (10^{-6} M) EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını tamamen ortadan kaldırdı. Neostigmin (10^{-6} M) EAU aracılı kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırdı ($\%227.43 \pm 8.33$).

Ayrı bir seri deneyde kolinerjik kasılma yanıtları, guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M)'e ek olarak NOS inhibitörü L-NAME (10^{-4} M) varlığında alınmıştır. L-NAME (10^{-4} M) kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırdı ($\%185.10 \pm 8.13$).

4.2. EAU Aracılı NO Bağımlı ve Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine 11,12-EET'nin Etkisi

11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M), Guaneditin (10^{-6} M) ve İndometasin (10^{-5} M) varlığında NO bağımlı EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($\%30,25 \pm 3,60$) (10^{-9} M, $p < 0,05$; 10^{-8} - 3×10^{-8} M, $p < 0,001$) (Grafik 1).

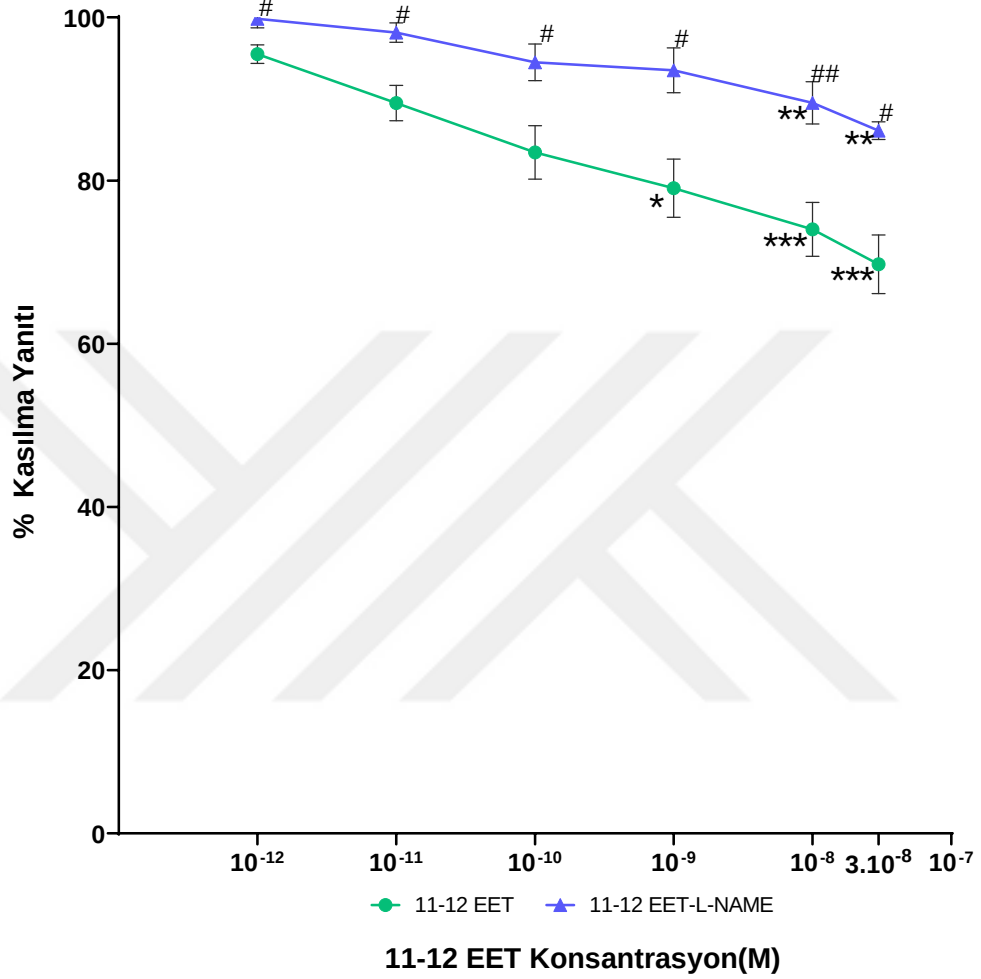
11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M), Guanetidin (10^{-6} M), İndometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında NO bağımsız EAU aracılı kolinerjik kasılma

yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı (%13,87 ± 1,09) (10^{-8} - 3×10^{-8} M, $p < 0,01$) (Grafik 1).

EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarında 11,12-EET'nin oluşturduğu kasılma yanıtlarını inhibe edici etkinin NO bağımlı grupta, NO bağımsız gruba göre daha fazla olduğu saptanmış ve 10^{-12} – 3×10^{-8} M konsantrasyonlarında bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Grafik 1).



11-12 EET'nin EAU Aracılı NO bağımlı ve bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine Etkisi



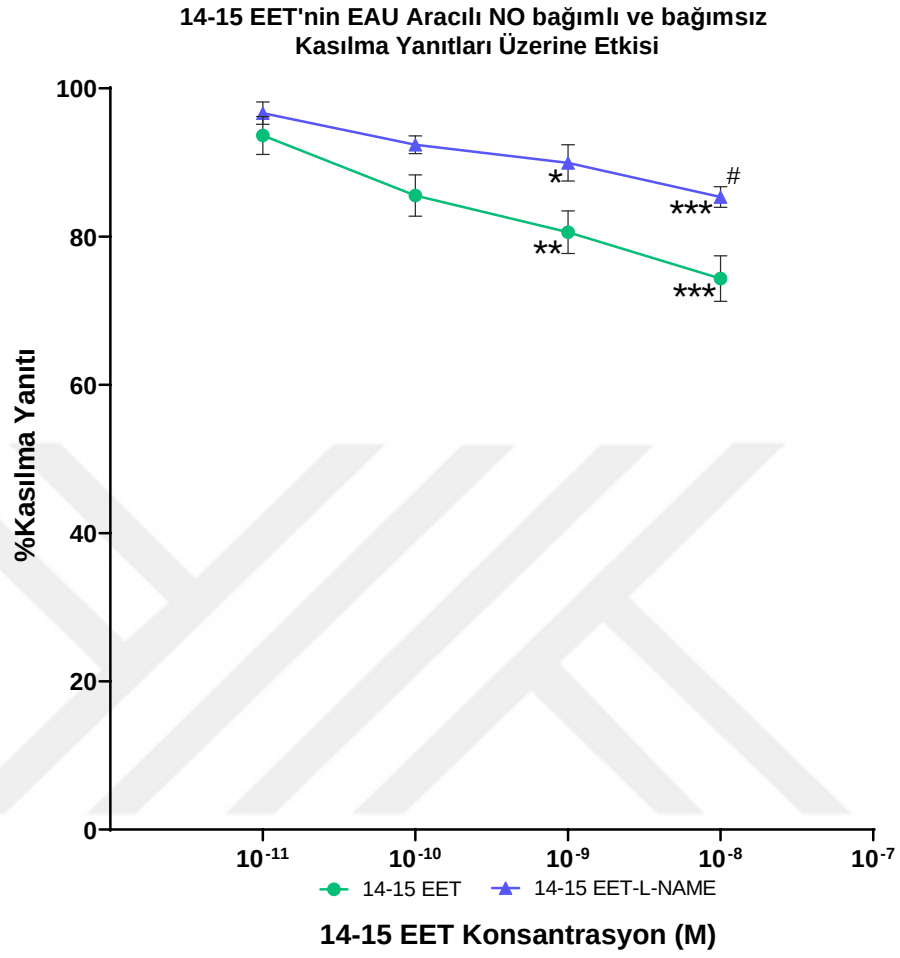
Grafik 1: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 11,12-EET (10^{-12} – 3×10^{-8} M)'nin etkisi. NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (Kontrole göre anlamlılık *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, L-NAME (10^{-4} M) varlığında aynı dozdaki gruplara göre anlamlılık #, $p < 0.05$, ##, $p < 0.01$ n=7).

4.3. EAU Aracılı NO Bağımlı ve Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine 14,15-EET'nin etkisi

14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M), Guaneditin (10^{-6} M) ve İndometasin (10^{-5} M) varlığında NO bağımlı EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($25,66 \pm 3,07$) (10^{-9} M, $p < 0,01$; 10^{-8} M, $p < 0,001$) (Grafik 2).

14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M), Guanetidin (10^{-6} M), İndometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında NO bağımsız EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($14,65 \pm 1,39$) (10^{-9} M, $p < 0,05$; 10^{-8} M, $p < 0,01$) (Grafik 2).

EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarında 14,15-EET'nin oluşturduğu inhibe edici etkinin NO bağımlı grupta, NO bağımsız gruba göre daha fazla olduğu saptanmış ve 10^{-8} M konsantrasyonda bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,01$) (Grafik 2).



Grafik 2: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'in etkisi. NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (Kontrolle göre anlamlılık *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$, L-NAME (10^{-4} M) varlığında aynı dozdaki gruplara göre anlamlılık #, $p<0.01$, n=6).

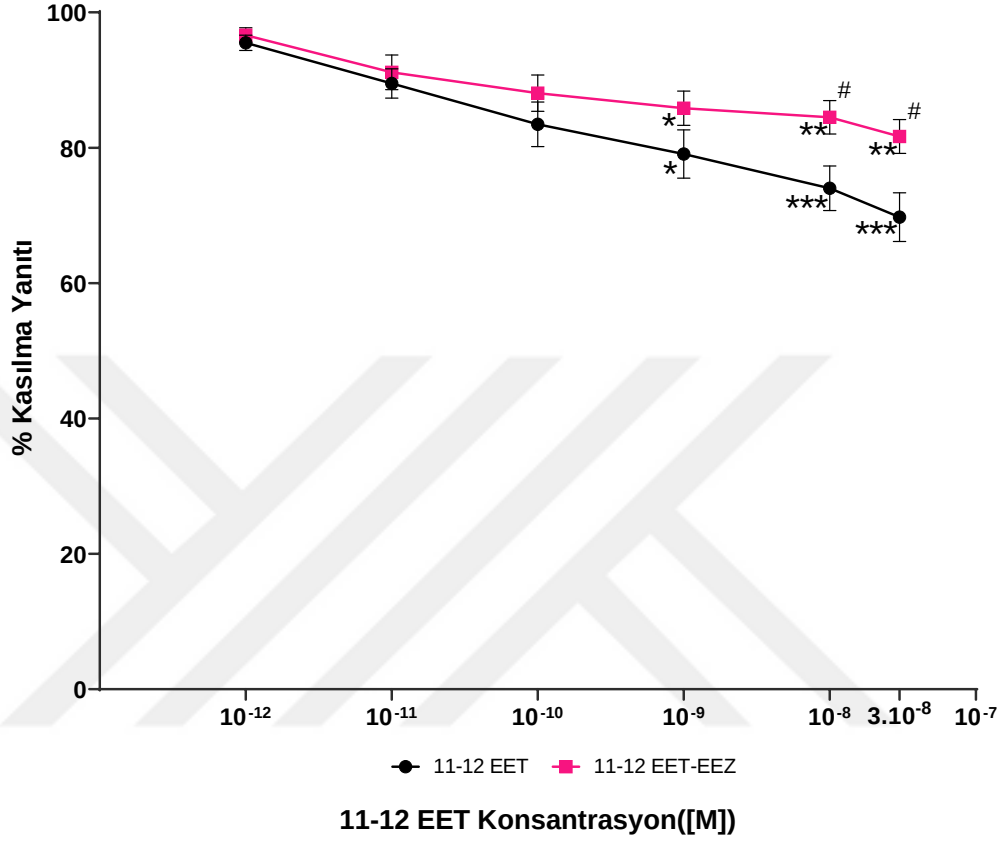
4.4. EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine 11,12-EET Etkisinde 14,15-EEZE'nin Rolü

11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M), Guaneditin (10^{-6} M) ve İndometasin (10^{-5} M) varlığında NO bağımlı EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($\%30,25 \pm 3,60$) (10^{-9} M, $p < 0,05$; 10^{-8} - 3×10^{-8} M, $p < 0,001$) (Grafik 3).

11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M), Guaneditin (10^{-6} M) , İndometasin (10^{-5} M) ve 14,15-EEZE (10^{-8} M) varlığında NO bağımlı EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($\%18,33 \pm 2,50$) (10^{-9} M, $p < 0,05$; 10^{-8} - 3×10^{-8} M, $p < 0,01$) (Grafik 3).

EET Antagonisti olan 14,15-EEZE (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M)'nin inhibe edici etkisi 14,15-EEZE ile inkübe edilmeyen gruba kıyasla konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmıştır (10^{-8} - 3×10^{-8} M, $p < 0,05$) (Grafik 3).

11-12 EET'nin EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine İnhibe Edici Etkisinde 14-15 EEZE'nin Rolü



Grafik 3: EET Antagonisti olan 14,15-EEZE (10⁻⁸ M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 11,12-EET (10⁻¹²-3x10⁻⁸ M)'nin etkisi. NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10⁻⁶ M) ve indometasin (10⁻⁵ M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (Kontrole göre anlamlılık *, p<0.05, **, p<0.01,***, p<0.001, 14,15-EEZE (10⁻⁸ M) varlığında aynı dozdaki gruplara göre anlamlılık #, p<0.05, n=6).

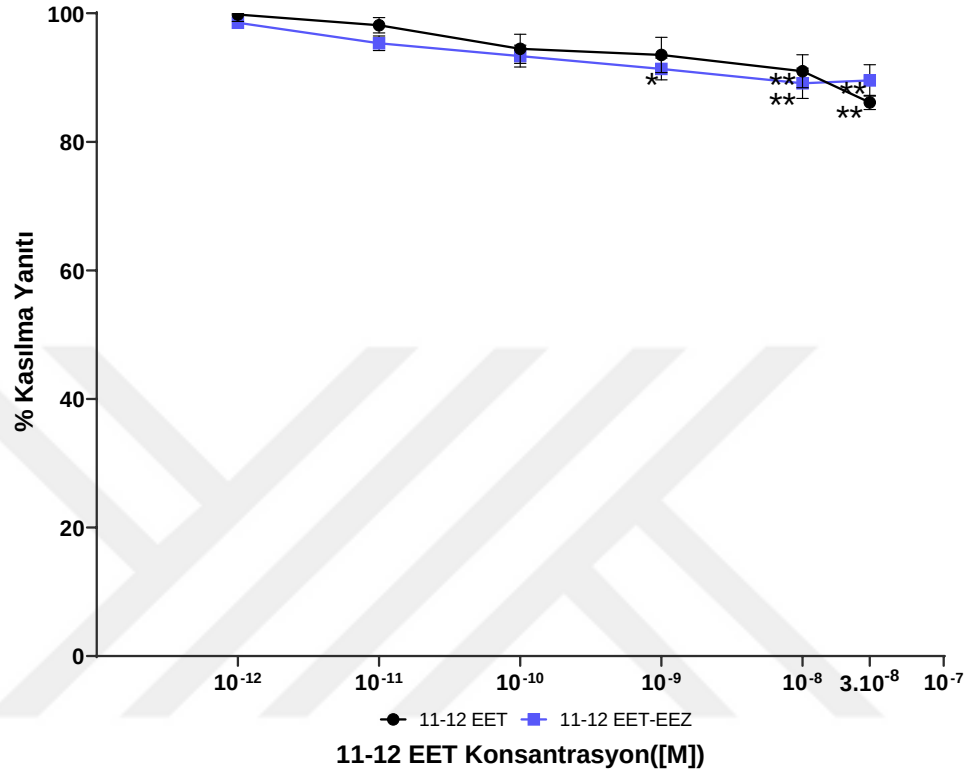
4.5. EAU Aracılı NO Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine 11,12-EET Etkisinde 14,15-EEZE'nin Rolü

11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M), Guanetidin (10^{-6} M), İndometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında NO bağımsız EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($\%13,87 \pm 1,09$) (10^{-8} - 3×10^{-8} M, $p < 0,01$) (Grafik 4).

11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M), Guaneditin (10^{-6} M) , İndometasin (10^{-5} M), L-NAME (10^{-4} M) ve 14-15 EEZE (10^{-8} M) varlığında NO bağımsız EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($\%11,43 \pm 2,47$) (10^{-9} M, $p < 0,05$; 10^{-8} - 3×10^{-8} M, $p < 0,01$) (Grafik 4).

EET Antagonisti olan 14,15-EEZE (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M)'nin inhibe edici etkisi 14,15-EEZE ile inkübe edilmeyen grup ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı oranda değişmedi (Grafik 4).

11-12 EET'nin EAU Aracılı NO Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine İnhibe Edici Etkisinde 14-15 EEZE'nin Rolü



Grafik 4: EET Antagonisti olan 14,15-EEZE (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 11,12-EET (10^{-12} – 3×10^{-8} M)'nin etkisi. NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (Kontrole göre anlamlılık *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, $n=6$).

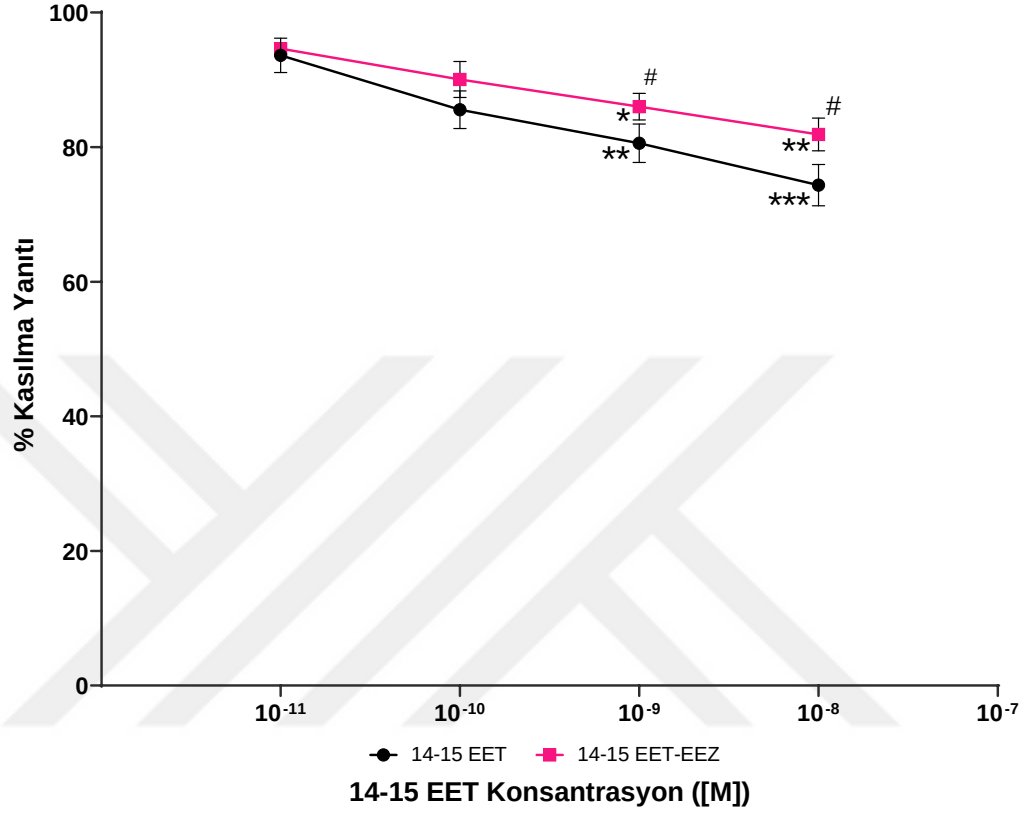
4.6. EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine 14,15-EET Etkisinde 14,15-EEZE'nin Rolü

14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M), Guaneditin (10^{-6} M) ve İndometasin (10^{-5} M) varlığında NO bağımlı EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($\%25,66 \pm 3,07$) (10^{-9} M, $p < 0,01$; 10^{-8} M, $p < 0,001$) (Grafik 5).

14-15 EET (10^{-11} - 10^{-8} M), Guaneditin (10^{-6} M) , İndometasin (10^{-5} M) ve 14-15 EEZE (10^{-8} M) varlığında NO bağımlı EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($\%18,11 \pm 2,44$) (10^{-9} M, $p < 0,05$; 10^{-8} M, $p < 0,01$) (Grafik 5).

EET Antagonisti olan 14-15 EEZE (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 14-15 EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin inhibe edici etkisi 14-15 EEZE ile inkübe edilmeyen gruba kıyasla konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmıştır (10^{-9} - 10^{-8} M, $p < 0,05$) (Grafik 5).

14-15 EET'nin EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine İnhibe Edici Etkisinde 14-15 EEZE'nin Rolü



Grafik 5: EET Antagonisti olan 14,15-EEZE (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin etkisi. NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (Kontrole göre anlamlılık *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, 14-15 EEZE (10^{-8} M) varlığında aynı dozdaki gruplara göre anlamlılık #, $p < 0.05$, $n=7$).

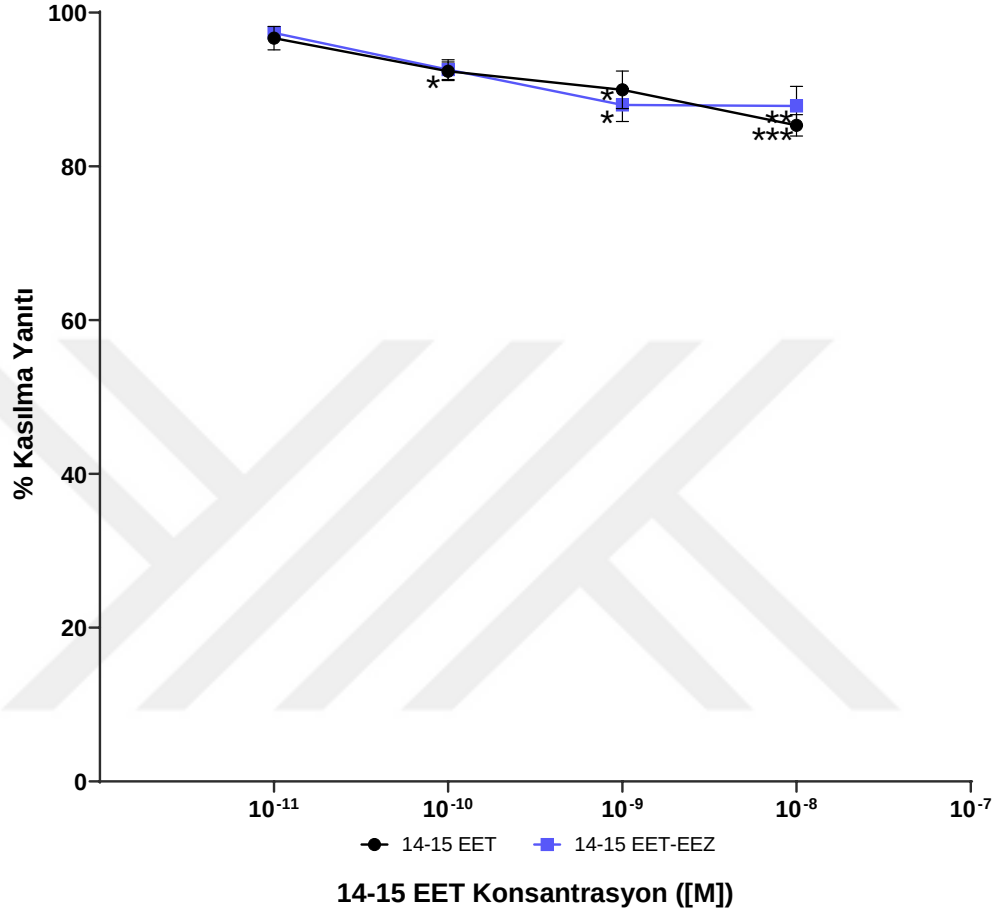
4.7. EAU Aracılı NO Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine 14,15-EET Etkisinde 14,15-EEZE'nin Rolü

14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M), Guaneditin (10^{-6} M) , İndometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında NO bağımsız EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($14,65 \pm 1,39$) (10^{-10} M- 10^{-9} M, $p < 0,05$; 10^{-8} M, $p < 0,001$) (Grafik 6).

14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M), Guaneditin (10^{-6} M) , İndometasin (10^{-5} M), L-NAME (10^{-4} M) ve 14-15 EEZE (10^{-8} M) varlığında NO bağımsız EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($13,13 \pm 2,56$) (10^{-9} M, $p < 0,05$; 10^{-8} M, $p < 0,01$) (Grafik 6).

EET Antagonisti olan 14-15 EEZE (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 14-15 EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin inhibe edici etkisi 14-15 EEZE ile inkübe edilmeyen grup ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı oranda değişmedi (Grafik 6).

**14-15 EET'nin EAU Aracılı NO Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine
İnhibe Edici Etkisinde 14-15 EEZE'nin Rolü**



Grafik 6: EET Antagonisti olan 14,15-EEZE (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin etkisi. NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi. (Kontrole göre anlamlılık *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.01$, $n=6$).

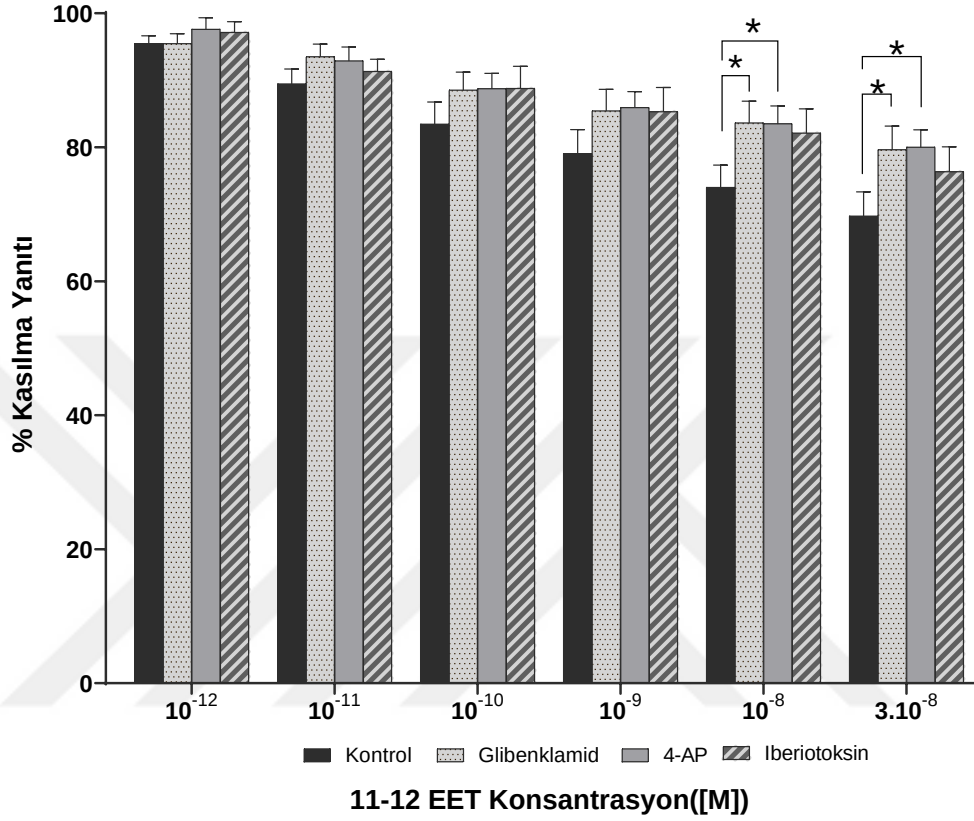
4.8. EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine 11,12-EET'nin Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü

Glibenklamid (10^{-6} M), guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında, artan dozlarda uygulanan 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M)'nin EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki 10^{-8} ve 3×10^{-8} M konsantrasyonlardaki inhibe edici etkisini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($20,34 \pm 3,49$) (10^{-8} - 3×10^{-8} M, $p < 0,05$) (Grafik 7).

4-AP (10^{-4} M), guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında, artan dozlarda uygulanan 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M)'nin EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki 10^{-8} M ve 3×10^{-8} M konsantrasyonlardaki inhibe edici etkisini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($19,97 \pm 2,56$) (10^{-8} - 3×10^{-8} M, $p < 0,05$) (Grafik 7).

İberiotoksin (10^{-8} M), guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında, artan dozlarda uygulanan 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M)'nin EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Grafik 7).

**11-12 EET'nin EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine
İnhibe Edici Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü**



Grafik 7: Potasyum kanal blokörleri, Glibenklamid (10^{-6} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 11,12-EET (10^{-12} – 3×10^{-8} M)'nin etkisi. NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (Glibenklamid (10^{-6} M), 4-AP (10^{-4} M) varlığında aynı dozdaki kontrol gruplarına göre anlamlılık *, $p < 0.05$, $n=6$).

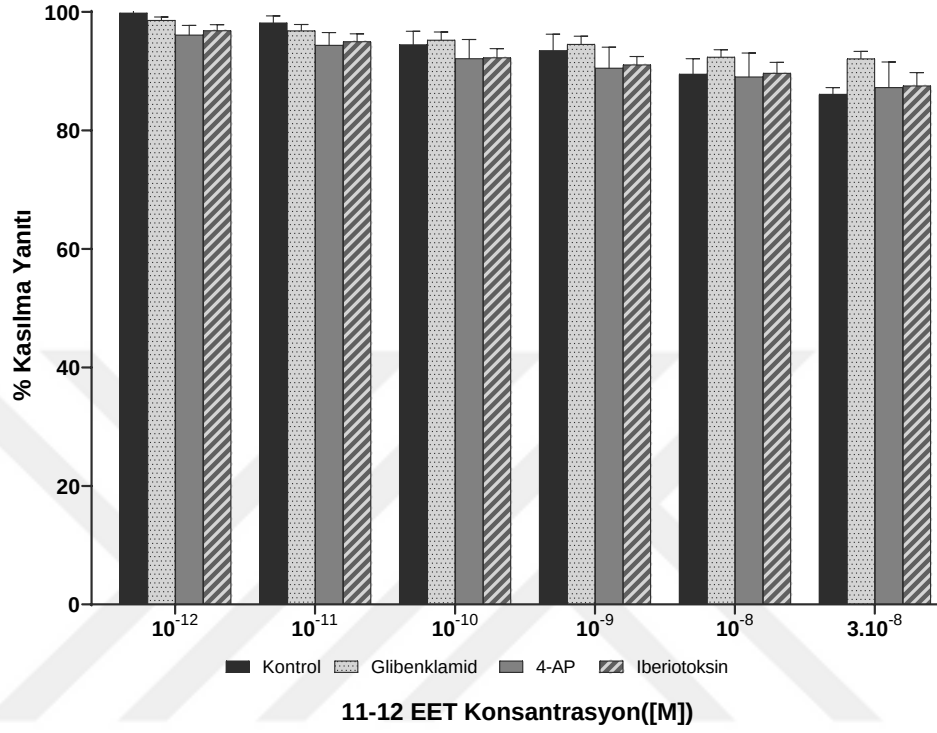
4.9. EAU Aracılı NO Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine 11,12-EET'nin Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü

Glibenklamid (10^{-6} M), guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında, artan dozlarda uygulanan 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M)'nin EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisine katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Grafik 8).

4-AP (10^{-4} M), guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında, artan dozlarda uygulanan 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M)'nin EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisine katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Grafik 8).

İberiotoksin (10^{-8} M), guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında, artan dozlarda 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M)'nin EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisine katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Grafik 8).

11-12 EET'nin EAU Aracılı NO Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine İnhibe Edici Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü



Grafik 8: Potasyum kanal blokörleri, Glibenklamid (10^{-6} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız kolinерjik kasılma yanıtları üzerine 11,12-EET (10^{-12} – 3×10^{-8} M)'nin etkisi. NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (n=6).

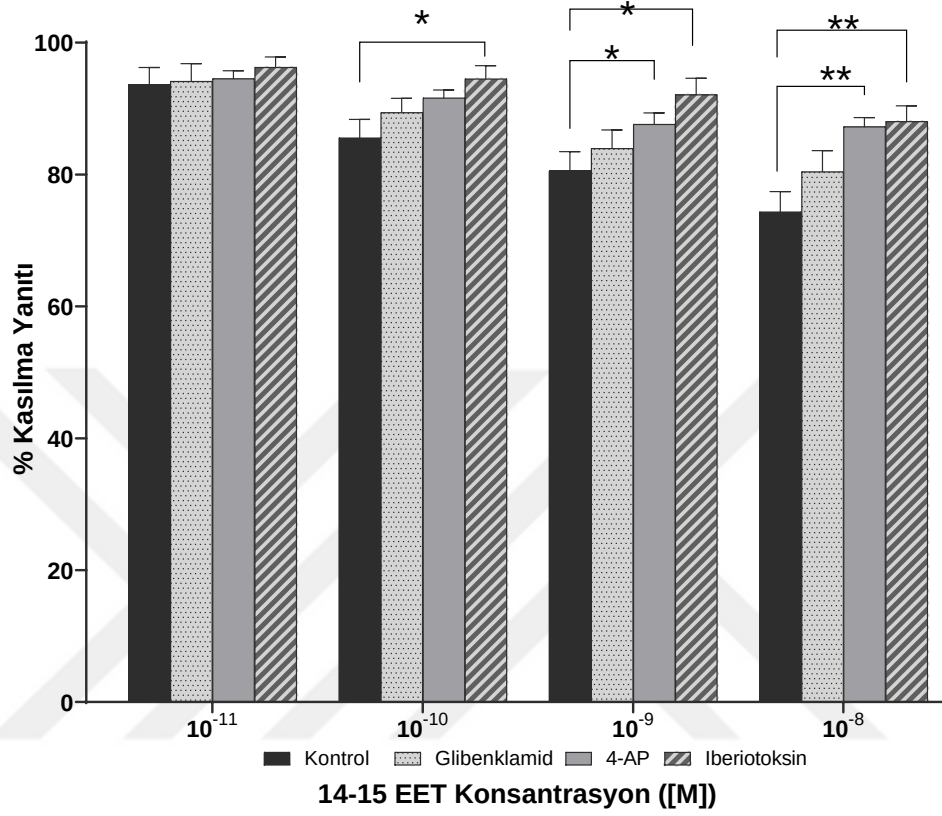
4.10. EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine 14,15-EET'nin Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin Katkısı

Glibenklamid'in (10^{-6} M), guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında, artan dozlarda 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisine katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Grafik 9).

4-AP (10^{-4} M), guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında, artan dozlarda uygulanan 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki 10^{-9} M ve 10^{-8} M konsantrasyonlardaki inhibe edici etkisini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($12,75 \pm 1,40$) (10^{-9} M, $p < 0,05$; 10^{-8} M, $p < 0,01$) (Grafik 9).

İberiotoksin (10^{-8} M); guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında, artan dozlarda üzerine 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki 10^{-10} M, 10^{-9} M ve 10^{-8} M konsantrasyonlardaki inhibe edici etkisini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($11,96 \pm 2,37$) (10^{-10} M- 10^{-9} M, $p < 0,05$; 10^{-8} M, $p < 0,01$) (Grafik 9).

14-15 EET'nin EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine İnhibe Edici Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü



Grafik 9: Potasyum kanal blokörleri, Glibenklamid (10^{-6} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 14-15 EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin etkisi. NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (4-AP (10^{-4} M) , İberiotoksin (10^{-8} M) , varlığında aynı dozdaki kontrol gruplarına göre anlamlılık *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, $n=6$).

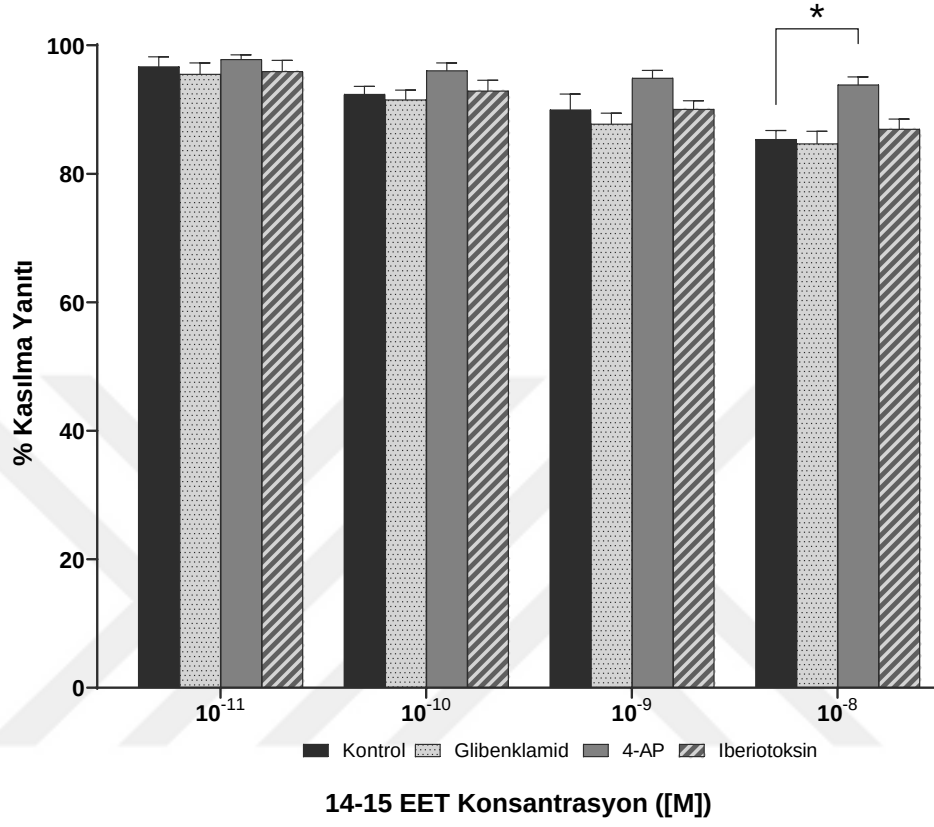
4.11. EAU Aracılı NO Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine 14,15-EET'nin Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin Katkısı

Glibenklamid (10^{-6} M), guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında, artan dozlarda 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M) 'nin EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisine katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Grafik 10).

4-AP (10^{-4} M), guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında, artan dozlarda 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($6,16 \pm 1,24$) (10^{-8} M, $p < 0,01$) (Grafik 10).

İberiotoksin'in (10^{-8} M), guanetidin (10^{-6} M) , indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında, artan dozlarda 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M)'nin EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisine katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Grafik 10).

**14-15 EET'nin EAU Aracılı NO Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine
İnhibe Edici Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü**



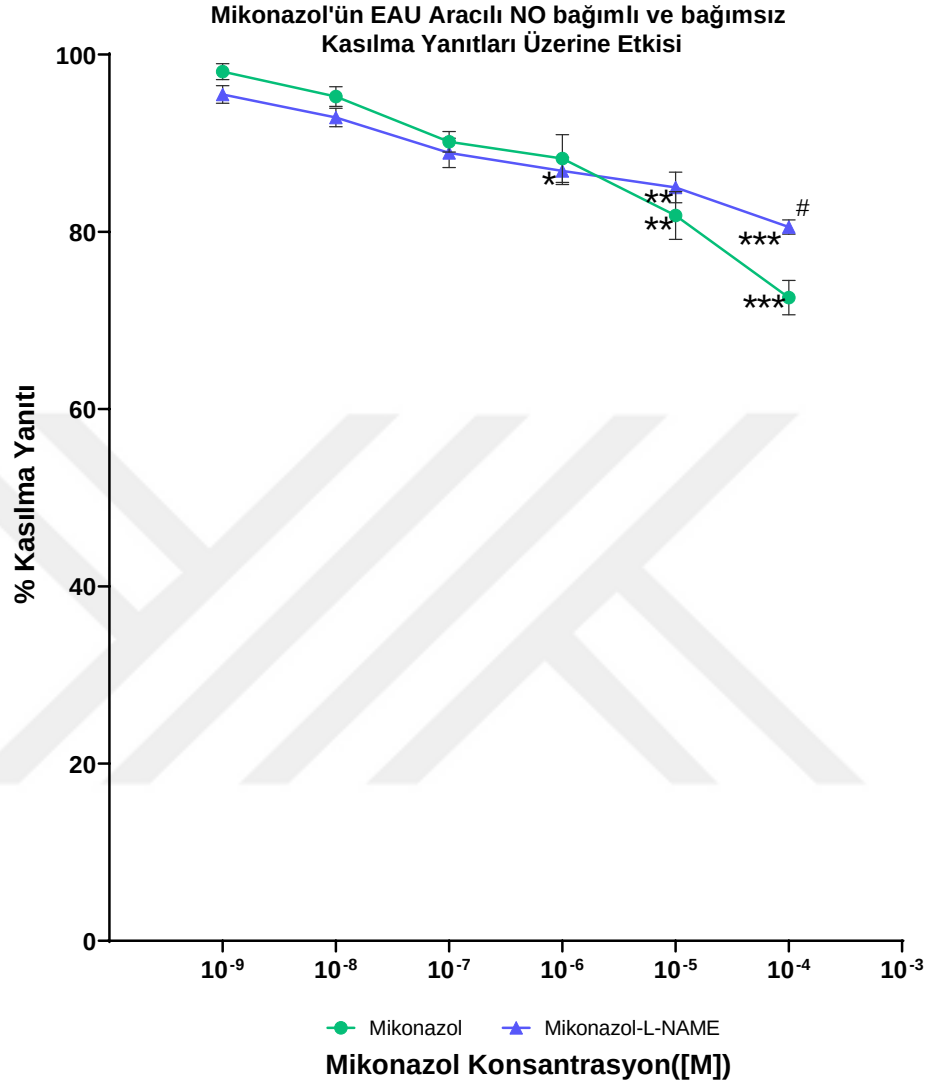
Grafik 10: Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 14,15-EET (10^{-11} – 10^{-8} M)'nin etkisi. NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (4-AP (10^{-4} M) varlığında aynı dozdaki kontrol gruplarına göre anlamlılık *, $p < 0.01$, $n=6$)

4.12. EAU Aracılı NO Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine Sitokrom P450 Mono-Oksijenaz İnhibitörlerinin Etkileri

Non spesifik sitokrom P450 inhibitörü olan Mikonazol (10^{-9} - 10^{-4} M) Guaneditin (10^{-6} M) ve İndometasin (10^{-5} M) varlığında NO bağımlı EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($27,42 \pm 1,94$) (10^{-5} M, $p < 0,01$; 10^{-4} M, $p < 0,001$) (Grafik 11).

Mikonazol (10^{-9} - 10^{-4} M); Guanetidin (10^{-6} M), İndometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında NO bağımsız EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($19,46 \pm 0,81$) (10^{-6} M, $p < 0,05$; 10^{-5} M, $p < 0,01$; 10^{-4} M, $p < 0,001$) (Grafik 11).

Mikonazol'ün oluşturduğu EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtının azalmasının NO bağımlı grupta, NO bağımsız gruba göre daha fazla olduğu saptanmış ve 10^{-4} M konsantrasyonda bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,01$) (Grafik 11).

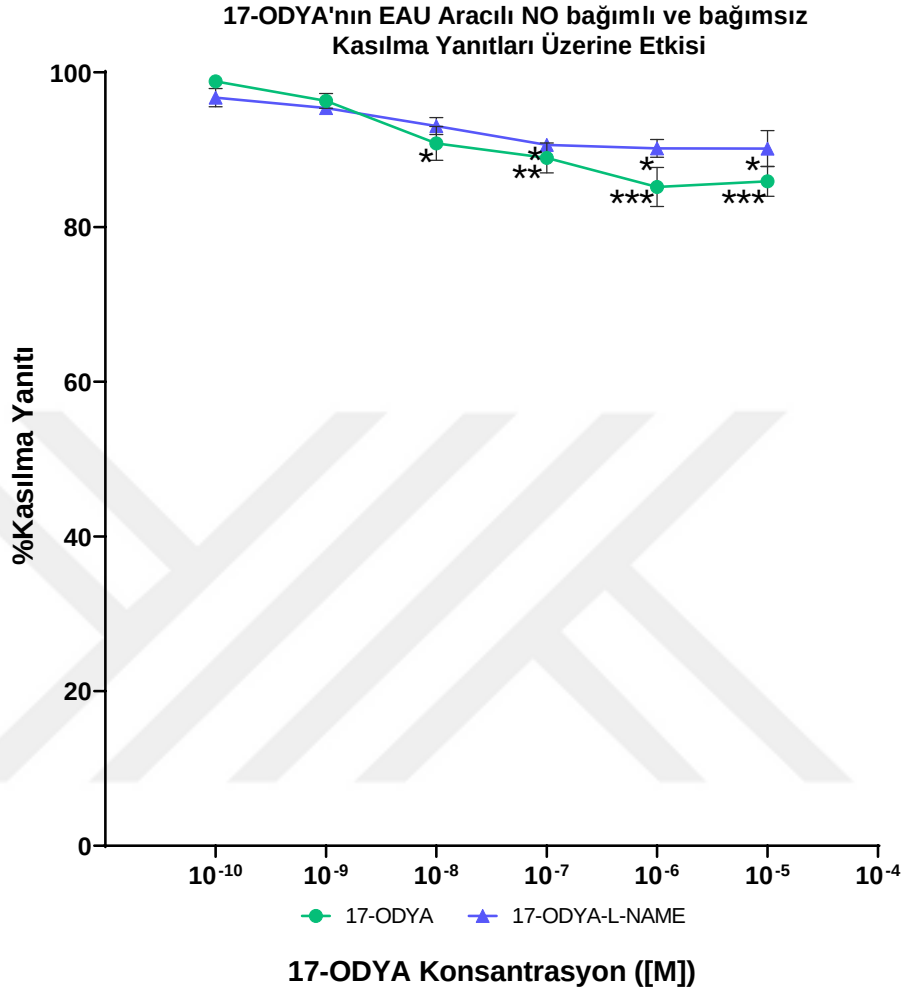


Grafik 11: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine Mikonazol (10^{-9} - 10^{-4} M)'ın etkisi. NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (Kontrole göre anlamlılık *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, *, $p<0.001$, L-NAME (10^{-4} M) varlığında aynı dozdaki gruplara göre anlamlılık #, $p<0.01$, $n=6$).**

Spesifik ω -hidroksilaz inhibitörü 17- ODTA (10^{-10} - 10^{-5} M), Guaneditin (10^{-6} M) ve İndometasin (10^{-5} M) varlığında NO bağımlı EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($\%14,08 \pm 1,93$) (10^{-8} M, $p < 0,05$; 10^{-7} M, $p < 0,01$; 10^{-6} - 10^{-5} M, $p < 0,001$) (Grafik 12).

17- ODTA (10^{-10} - 10^{-5} M), Guanetidin (10^{-6} M), İndometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında NO bağımsız EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($\%9,86 \pm 2,32$) (10^{-7} - 10^{-5} M, $p < 0,05$) (Grafik 12).

17-ODTA'nın oluşturduğu EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtını azalmasının NO bağımlı grupta, NO bağımsız gruba göre daha fazla olmasına karşı istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. ($p > 0,05$) (Grafik 12).



Grafik 12: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 17- ODYA (10^{-10} - 10^{-5})' nin etkisi. NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (Kontrole göre anlamlılık *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$, $n=6$)

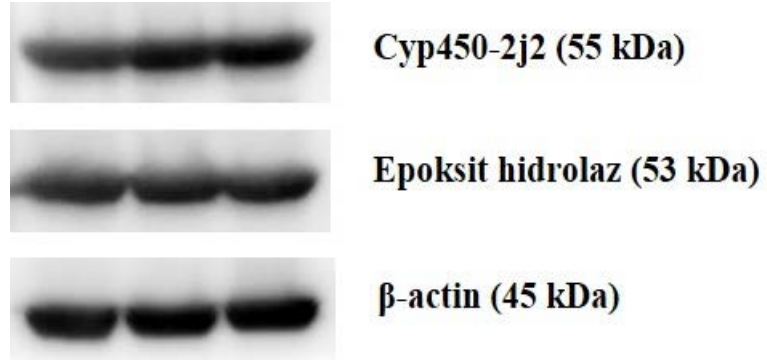
4.13. Potasyum Klorür ve Kalsiyumla Kastırılmış Dokularda Agonist ve Antagonistlerin Etkileri

Mide fundus şeritleri, ortamda guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında 80 mM potasyum klorür (KCl) ve 2,5 mM kalsiyum (Ca^{+2}) ile kasıldı. Kümülatif olarak 11,12-EET(10^{-12} - 3×10^{-8} M), 14,15-EET(10^{-11} - 10^{-8} M), Mikonazol(10^{-9} - 10^{-4} M) ve 17 ODYA(10^{-9} - 10^{-5} M) ve tek doz EET antagonisti 14,15-EEZE(10^{-7} M) eklenip kasılma yanıtları üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

80 mM potasyum klorür (KCl) ve 2,5 mM kalsiyum (Ca^{+2}) ile kastırılmış dokularda; 11,12-EET (10^{-12} - 3×10^{-8} M), 14,15-EET (10^{-11} - 10^{-8} M) , 14,15-EEZE (10^{-7} M), Mikonazol (10^{-9} - 10^{-4} M) ve 17 ODYA (10^{-9} - 10^{-5} M) istatistiksel olarak anlamlı bir gevşeme yanıtı oluşturmamıştır.

4.14. Western Blot yöntemiyle epoksit hidrolaz (sEH) ve CYP2J2'nin varlığının tanımlanması

Mide fundus dokularından elde edilen protein örneklerinde CYP450-2J2 ve epoksit hidrolaz proteinlerinin western blot analizi sonuçlarına göre her iki proteinin ifade düzeylerinin var olduğu sonucuna varılmıştır. Housekeeping protein olarak kullanılan β -actinin farklılık göstermediği görüldü (Şekil 3).



Şekil 3. Mide fundus dokularından ekstrakte edilen protein örneklerinden CYP450-2J2 ve Epoksit hidrolaz protein bantlarının görüntüsü.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda mide fundus dokusunda EAU aracılı kasılma yanıtları elde edildi. EAU aracılı kasılma yanıtları üzerinde siklooksijenaz inhibitörü indometasin ve sempatik sinir uçlarından noradrenalin salıverilmesini inhibe eden guanetidin istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadi. Kolinesteraz inhibitörü neostigmin EAU aracılı kasılma yanıtlarını arttırırken, muskarinik reseptör antagonisti atropin bu yanıtları tamamen inhibe etti. NOS inhibitörü L-NAME EAU aracılı kasılma yanıtlarını arttırdı. Bu sonuçlar mide fundus dokusunda EAU aracılı kasılma yanıtlarının kolinerjik sinirlerin uyarısına bağı olduğunu, ayrıca NO'nun inhibitör bir etkisinin olduğunu göstermektedir.

Tavşan mide fundusunda EAU aracılı kasılma yanıtlarının değerlendirildiği çalışmalarda, kasılma yanıtlarının atropin tarafından tamamen ortadan kalktığı ve neostigmin tarafından arttığı gösterilmiştir. Ayrıca çalışmalarda EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine Tetrodotoksin'in etkisi değerlendirilmiş ve yanıtların tamamen ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar EAU aracılı kasılma yanıtlarının presinaptik nörotransmisyonla olduğunu göstermektedir (109, 110). Çalışmamızda bu çalışmalarla benzer EAU parametreleri kullanılmıştır. Gastrointestinal motilitenin düzenlenmesinde kolinerjik sinir sistemi önemli bir role sahiptir. Mide fundusunda kolinerjik innervasyon olduğu ve kasılmaya muskarinik reseptörlerin neden olduğu bilinmektedir. Asetilkolinin, gastrointestinal motilitenin primer düzenleyicisi ve kasılmayı sağlayan ana nörotransmitter olduğu bilinmektedir. Enterik sinirlerden asetilkolin salıverilmesi, presinaptik olarak kontrol edilmektedir (29, 32, 35). Literatür ile benzer şekilde, mide fundusunda elde

ettiğimiz EAU aracılı kasılma yanıtlarının sinirsel uyarı bağı kolinerjik aşırıma ait olduğunu göstermektedir.

Sunulan çalışmada, EET analogları 11,12-EET ve 14,15-EET; EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerinde konsantrasyon bağımlı olarak inhibe edici etkiye neden olmuştur. Aynı zamanda etkilerinin hangi mekanizma üzerinden olduğunu araştırmak için EET antagonisti 14,15-EEZE, K^+ kanal blokörlerinden ATP bağımlı (K_{ATP}) kanal blokörü glibenklamid, kalsiyumla aktive edilen potasyum (BK_{Ca}) kanal blokörü iberiotoxin, voltaj bağımlı potasyum kanal (K_v) blokörü 4-AP varlığında 11,12-EET ve 14,15-EET etkisi tekrar değerlendirilmiştir.

Araşidonik asit (AA) metabolizma ürünlerinden prostaglandin ve lökotrienler; siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (LOX) enzimleri tarafından sentez edilirler. Üçüncü fakat daha az bilinen bir yolak da AA'yı sitokrom P450 (CYP) enzim sistemi ile hidroksieikozatetraenoik asit (HETE) ve epoksieikozatrienoik asit (EET)'e metabolize eder. CYP2C ve CYP2J gen ailelerinden olan epoksijenazlar AA'yı epoksieikozatrienoik asitler (EET)'e dönüştürürler. EET'lerin 1990'ların ortalarına kadar özellikle vasküler ve böbrek sistemlerinde önemli biyolojik etkiler yarattığı, damarlarda gevşeme yanıtlarına neden olduğu, ancak endotelde sentezlendikleri için etkilerinin sınırlı olduğu düşünülmekteydi (87). Literatürdeki çalışmalar bu nedenle öncelikle kardiyovasküler sistem ve hipertansiyon konusunda yoğunlaşmıştır. Normotansif ve hipertansif sıçanlarda yapılan bir çalışmada, EET'leri metabolize ederek dihidroksieikosatrienoik asitlere (DHET'ler) dönüştüren enzim çözünebilir epoksit hidrolazın (sEH) inhibe edilmesinin, normotansif sıçanlarda ve hipertansif

sıçanlarda kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir (111). Birçok hipertansiyon tipinde, vasküler sEH ifadelenmesindeki artıştan kaynaklı olarak EET düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (112). Sıçan izole böbrek arkuat arterlerinde EET'lerin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 11,12-EET'nin böbrek arkuat arterinde gevşetici etkisinin olduğu tespit edilmiştir (113). Benzer şekilde bir çok dokuda EET'lerin düz kaslardaki gevşetici etkileri gözlenmiş olup laboratuvarımızda izole tavşan korpus kavernozumunda yapılan bir çalışmada, EAU aracılı NO bağımlı ve bağımsız non-adrenerjik non-kolinerjik (NANK) gevşeme yanıtlarına EET'lerin katkılarının olduğu ve etkilerini presinaptik mekanizmayla oluşturdukları gösterilmiştir (103). Sıçan izole miyometriyum düz kasında yapılan bir çalışmada, EET'lerin etkilerini incelemek için sıçanlardan elde ettikleri miyometriyumda spontan kontraksiyonlar devam ederken 8,9-EET, 11,12-EET ve 14,15-EET etkisi değerlendirilmiş ve EET'lerin spontan kasılma yanıtlarını azalttığı tespit edilmiştir (102). EET'lerin gastrointestinal kanaldaki düz kas fonksiyonları üzerine etkilerinin bakıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda EET analogları olan 11,12-EET ve 14,15-EET; EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarında literatürle uyumlu olarak azaltıcı etkiye neden olmuştur.

NO ve EET sinyal yolları arasında bir denge olduğu düşünülmektedir. Fare mezenterinde yapılan bir çalışmada 8.9-EET ve 14.15-EET; eNOS aktivasyonu ve NO salıverilmesi ile vazodilatasyona neden olurken, endotel hasarı ve L-NAME uygulaması vazodilatör etkilerinin azalmasına neden olmaktadır (114). EET'lerin domuz aortik endotel hücre kültüründe eNOS aktivitesini ve ifadelenmesini artırdığı gösterilmiştir (115). Hercule ve arkadaşları, EET'lerin

vazodilatör etkisinin, artan NO salıverilmesi ve endotelial NOS aktivasyonu ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir (114). Geçici Reseptör Potansiyel İyon Kanal 1 (TRPC1) 11,12-EET ile indüklenen düz kas hiperpolarizasyonu ve gevşemesinde kritik bir bileşendir. TRPC1'in inhibisyonu, 11,12-EET ile indüklenen vazodilatasyonu azaltır. Aynı zamanda TRPC1, protein kinaz G (PKG)'nin fosforilasyonuna neden olur. NO-sGMP-PKG yolunun TRPC1 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. NO eksikliğinin bu mekanizma ile 11,12-EET ile indüklenen düz kas hiperpolarizasyonunu ve gevşemesini azalttığı düşünülmektedir (116). Farklı şekilde, sıçan böbrek mikrodamarlarında yapılan bir çalışmada ise NO'nun, EET'lerin yaptığı vazodilatasyonu, K⁺ kanalları üzerindeki etkilerini etkilemeden doğrudan ve geri dönüşümlü olarak engellediği gösterilmiştir (117). Literatürdeki bu çalışmalar göz önünde bulundurularak EET'lerin EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerindeki etkilerinin NO ile olan ilişkisini değerlendirmek için L-NAME'li ortamda değerlendirdik. Çalışmamızda EET'lerin EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerindeki etkileri incelendiğinde, 11,12-EET ve 14,15-EET'nin neden olduğu kasılma yanıtındaki azalmanın NO bağımlı grupta NO bağımsız gruba göre daha fazla olduğu belirlendi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu durum 11,12-EET ve 14,15-EET'nin mide fundus dokusunda EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine olan etkisinde, NO'nun kısmi payının olabileceğini göstermektedir. EET'lerin kasılma yanıtını azaltıcı etkisi L-NAME ile tamamen ortadan kalkmadığı için, NO dışında farklı bir gevşetici mekanizmanın da bulunduğunu göstermektedir.

Epoksieikosatrienoik asitler, endotelde sitokrom P-450 epoksijenazlar tarafından gerçekleşen araşidonik asit yıkımının metabolik ürünleridir. Ancak sitokrom P-450 ω -hidroksilaz, düz kas hücrelerinde araşidonik asidi metabolize ederek vazokonstriksiyona neden olabilen 20-hidroksieikosatetraenoik asit (20-HETE) oluşturur. Bu nedenle araşidonik asit metabolitlerinin oranı, düz kasın tonusunu belirler (118). Endojen EET'lerin rolüne ilişkin araştırmalarda sitokrom P450 inhibitörleri kullanılmıştır. Ancak bu inhibitörlerin spesifik olmayan vasküler etkileri olabilir ve ayrıca diğer vasküler sitokrom P450 enzimlerini de bloke edebilirler. Bu nedenle, aktivitelerini tam olarak karakterize etmek için spesifik EET inhibitörlerinin kullanılması gereklidir. Bu enzimleri incelemek için kullanılan herhangi bir antagonistin oldukça spesifik olması gerekmektedir. Gauthier ve arkadaşları, bir dizi analog tasarlayıp üretmişler ve bunlardan 14,15 EEZE'nin anlamlı etkileri olduğu bildirmişlerdir. 14,15 EEZE'nin, 20-HETE'nin etkisi veya sentezi üzerinde hiçbir değişikliğe neden olmayan, oldukça spesifik bir epoksieikosatrienoik asit antagonisti olduğu gösterilmiştir. 14,15-EEZE, hücre zarı üzerinde veya hücre içi reseptör bağlanma bölgesinde doğrudan bir EET antagonisti gibi etki göstermiştir (96, 97). Bu çalışmalar, 14,15-EEZE'nin, diğer gevşetici veya kasıcı maddelerin aktivitesini etkilemeyen ve araşidonik asit metabolizmasını değiştirmeyen, 4 regioizomerik EET'nin seçici bir antagonisti olduğunu vurgulamaktadır.

14,15-EEZE, epoksit hidrolazlar için bir substrat olabilir ve EET'ler ile epoksit hidrolaz bağlama bölgesi için yarışabilir. Böylelikle EET'lerin DHET'lere dönüşümünü azaltabilir. Bu nedenle, 14,15-EEZE'nin EET/DHET oranını artırması

mümkündür, ancak bu değişiklik 14,15-EEZE'nin neden olduğu bozulmuş vasküler gevşeme yanıtlarını açıklamayacaktır. Bu sonuçlar, 14,15-EEZE'nin EET üzerindeki antagonizmasının, EET veya 20-HETE sentezini değiştirmesi yoluyla değil, EET aktivitesinin inhibe edilmesi yoluyla meydana geldiğini göstermektedir (97). Oysa yapılan başka bir çalışmada 14,15-EEZE'nin bir vazodilatör özelliği de tanımlanmıştır. Veriler 14,15-EEZE'nin epoksieikosatrienoik asit reseptörü için bir parsiyel agonist olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada yüksek konsantrasyonda (10^{-4} M) 14,15-EEZE etkisi değerlendirilmiş ve vazodilatasyon etkisi gözlemlenmiştir (118). Çalışmamızda EET antagonisti olan 14,15-EEZE varlığında, EAU aracılı NO bağımlı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine 11,12-EET'nin ve 14,15-EET'nin inhibe edici etkisi, 14,15-EEZE ile inkübe edilmeyen gruba kıyasla azalmıştır. Fakat EAU aracılı NO bağımsız kolinerjik kasılma yanıtları üzerindeki 11,12-EET'nin ve 14,15-EET'nin inhibe edici etkisinde 14,15-EEZE varlığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır bu da bize 14,15-EEZE'nin mevcut konsantrasyonda, NO bağımsız kolinerjik yanıtlarda bir katkısının olmadığını düşündürmektedir. Çalışmamızda 14,15 EEZE'nin 10^{-7} M konsantrasyonda etkisini değerlendirdik daha yüksek konsantrasyonlardaki etkisini madde kısıtlılığından dolayı gözlemleyemedik. Yüksek konsantrasyonda etkisini değerlendirmek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

14,15-EET'nin K_{ATP} kanallarının aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. EET'lerin, G_{α} 'nın ADP-ribozilasyonunu kolaylaştırmak için belirli bir bölgeye veya reseptöre bağlandığı düşünülmektedir. Bu durum K_{ATP} kanallarının aktivasyonu sonrasında membran hiperpolarizasyonuna yol açan ve

bunun sonucunda gevşemeye neden olan mekanizma ile tutarlıdır. EET regioizomerlerinin tümü, K_{ATP} kanallarının etkili aktivatörleridir. Küçük mezenterik arterlerde K_{ATP} kanallarının EET tarafından aktivasyonu fizyolojik olarak önemli bir mekanizmadır ve EET'nin vazorelaksasyon etkilerinin %50'sinden sorumludur (119). Fukao ve arkadaşları, izole sıçan mezenterik arterlerinde 11,12-EET ile indüklenen düz kas hiperpolarizasyonunun glibenklamid tarafından bloke edildiğini bildirmiş ve bu durum K_{ATP} kanallarının etkili olduğunu düşündürmüştür (120). Sıçan izole korpus kavernozumunda EET'lerin etkisinin gösterildiği bir çalışmada, fenilefrinle kasılmış izole dokuda 11,12-EET ile yaklaşık %80'lik bir gevşeme yanıtı olduğu tespit edilmiştir. Oluşan gevşetici etkinin NO sentez inhibitörü L-NAME, ATP duyarlı potasyum kanal blokörü glibenklamid, kalsiyumla aktive potasyum kanal blokörü iberiotoksin eklenmesiyle azaldığı saptanmıştır. 11,12- EET nin korpus kavernosum üzerindeki gevşetici etkisinin, sGMP / NO yolağının yanı sıra K_{ATP} ve K_{Ca} aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (104). NO ile K_{ATP} ilişkisini değerlendiren sıçan izole aortasında yapılan bir çalışmada Glibenklamid'in, endoteli sağlam dokularda sGMP içeriğini arttırdığı saptanmıştır. L-NAME ile inkübasyon veya endotelin uzaklaştırılması, glibenklamidin sGMP artışı üzerindeki etkisini önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir (121). Çalışmamızda da glibenklamidin, NO bağımlı grupta, EAU aracılı kasılma yanıtları üzerindeki 11,12-EET'nin azaltıcı etkisini inhibe ettiği şekilde gösterilmiştir. 14,15-EET'de bu etki gözlemlenmemiştir. Ancak NO bağımsız grupta glibenklamid, hem 11,12-EET hem de 14,15-EET'nin kasılma yanıtları üzerindeki etkisini değiştirmemiştir. Çalışmamızın sonuçları, düz kas

hücrelerinin plazma membranında bir EET reseptörünün mevcut olabileceğine ve düz kas hücrelerinde K_{ATP} kanallarının aktivasyonunda rol oynadığına dair artan kanıtı desteklemektedir.

EET'ler vasküler BK_{Ca} kanallarının güçlü aktivatörleridir ve membran hiperpolarizasyonu oluşturarak vazodilatasyonuna yol açarlar (122). 14,15-EET analoglarının üç sentetik sülfonamid türevinin sıgır koroner arterlerini gevşettiği ve oluşan gevşeme yanıtının K^+ kanal blokajı yapan iberiotoxin tarafından inhibe edildiği saptanmıştır (123). Sıçan izole böbrek arkuat arterlerinde EET'lerin gevşetici etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 11,12-EET ile inkübe edildiğinde sAMP seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. 11,12-EET'nin böbrek arkuat arterindeki gevşetici etkisinin adenilat siklaz inhibitörü olan SQ-22536 ve PKA inhibitörü ile azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca BK_{Ca} kanal inhibitörü iberiotoxin varlığında da gevşetici etkisinin anlamlı oranda azaldığı tespit edilmiş olup, EET'lerin etkilerini hem adenilat siklaz hem de BK_{Ca} kanalları üzerinden oluşturduğu tespit edilmiştir (113). Bazı çalışmalar NO'nun vasküler düz kasları hiperpolarize etme kapasitesine sahip olduğunu ve sıçan renal arteriyollerinde BK_{Ca} kanallarının aktivasyonunun NO'nun neden olduğu gevşeme yanıtının yaklaşık %50'sine katkıda bulunduğunu göstermiştir (124-126). Çalışmamızda da 11,12-EET'nin etkisine iberiotoxinin katkısı gösterilememiş olmasına rağmen, iberiotoxinin 14,15-EET'nin EAU aracılı NO Bağımlı kasılma yanıtlarını azaltmasını anlamlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sonuç bize NO ile BK_{Ca} kanallarının kısmi olarak ilişkili olabileceğini literatür ile uyumlu olarak göstermiştir.

Sığır koroner arter düz kas dokusunda yapılan bir çalışmada 11,12-EET'nin gevşetici etkisi gösterilmiştir. Gevşetici etkinin voltaj bağımlı K^+ kanalları ile etkileşimini değerlendirmek için 4-aminopiridin varlığında gevşeme yanıtları tekrar değerlendirilmiş ve gevşeme yanıtında anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmemiştir (127). Kobay koroner arterinde yapılan bir araştırmada, voltaj bağımlı K^+ kanallarını (K_v) bloke eden 4-AP, 11,12-EET yanıtlarının neden olduğu gevşemeyi anlamlı olarak etkilememiştir fakat 11,12-EET'nin neden olduğu gevşeme yanıtlarının iberoiotoksin tarafından büyük ölçüde azaltıldığı gösterilmiştir (128). Sıçan retinal arterinde yapılan bir çalışmada NO'nun, iki mekanizma aracılığı ile K_v kanallarının aktivasyonu ve prostaglandin üretiminin artırılması yoluyla sıçanların retinal damar sistemi üzerindeki gevşetici etkisi gösterilmiştir. Çalışmamızda 4-AP, guanetidin ve indometasin varlığında, artan dozlarda 11,12-EET'nin EAU aracılı NO bağımlı ve 14,15-EET'nin EAU aracılı NO bağımlı ve bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisini azalttığı gözlemlenmiştir. EET regioizomerlerinin gücü ve altta yatan mekanizmalar tüm dokularda aynı değildir.

14,15-EET, 11,12-EET ve 14,15EEZE'nin postsinaptik etkilerinin değerlendirilmesi için 80 mM KCL ve 2,5 mM Ca^{+2} ile kastırılmış dokularda etkileri değerlendirildi ve gevşetici etkileri olmadığı saptanmıştır. Bu durum EET'lerin ve EET antagonisti olan 14,15EEZE'nin postsinaptik etkilerinin olmadığını, etkilerini presinaptik olarak oluşturduklarını göstermektedir.

Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi ile insan jejenumunda araşidonik asitten intestinal sitokrom P450'nin in vivo epoksidasyonu ile epoksieikosatrienoik

asitlerin varlığı ilk kez kanıtlanmıştır. İnsan ve sıçan bağırsağının, otonomik ganglion hücrelerinde, epitel hücrelerinde, düz kas hücrelerinde ve vasküler endotelde lokalize olan CYP2J alt ailesine ait bir epoksijenaz içerdiği sonucuna ulaşılmıştır. Buna göre, gastrointestinal sistemde, eikosanoidlerin biyosentezine katkıda bulunabilir ve EET oluşumunun önemli kaynakları olabilir. Özellikle, bağırsakta total EET'nin 40 ng/g bağırsak olduğu rapor edilmiştir. Toplam miktara 14,15-EET, 11,12-EET ve 8,9-EET'nin sırasıyla %31, %36 ve %33 oranında katkıda bulunduğu gösterilmiştir (16). Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak mide fundus dokularından elde edilen protein örneklerinde CYP450-2J2 ve epoksit hidrolaz proteinlerinin western-blot analizi sonuçlarına göre her iki proteinin ifadenmesinin mevcut olduğu gösterildi. Kararsız yapıları nedeniyle, EET'lerin ekzojen ilaçlar olarak geliştirilmesi mümkün gözükmemektedir. Fakat gen tedavisi, sEH inhibitörü ve EET analogları ile endojen EET'lerin seviyesini artırmak mümkündür. Bu nedenle EET'lerin mekanizmasının anlaşılması için detaylı araştırmalar yapılmıştır. Bunlar arasında sEH inhibitörü en umut verici tedavi olabilir. sEH inhibitörü, kan basıncını düşürmedeki etkinliği açısından klinik bir çalışmada faz 2 aşamasında test edilmiştir (129). Bununla birlikte, klinik kullanıma geçmesi için hala uzun bir yol ve bu konuları ele almak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sitokrom P450 inhibitörü olan Mikonazol ve ω -hidroksilaz inhibitörü olan 17-ODYA sadece epoksijenaz inhibitörleri değildir. İlaç metabolizması, steroid sentezi ve NO sentezi ile ilgili çok sayıda enzimin yapısında bulunan hem kısmına bağlanarak enzimlerin aktivitesini inhibe etmektedirler. Bunun dışında, hücre içi

kalsiyum saliverilmesi ve Ca^{+2} dışındaki diğer iyon kanalları üzerinde doğrudan etkileri olduğu da düşünülmektedir (130). Mikonazolün bilinen spesifik bir etkisi olmadığı için kendisinin ve metabolitlerinin etkilerinin ve bunların altında yatan mekanizmaların anlaşılması zorlaşmaktadır (131). Mikonazolün EET'lerin aktivitesi üzerinde inhibe edici etkisi olmasına rağmen, çalışmamızda mide fundusunda EAU aracılığıyla ortaya çıkan kasılma yanıtlarını azaltmıştır. Mikonazol'ün bu etkisi, etkisinin spesifik olmamasından veya epoksijenaz aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisinin yeterli olmamasından kaynaklanabilir. Benzer şekilde EAU aracılı kasılma yanıtlarını azaltması, kasıcı bir sistemin etkisini azaltırken bunu dengelemek adına bilinmeyen bir mekanizma ile gevşetici bir sistemi uyarmasından kaynaklanabilmektedir. Mikonazolün net etkisinin bilinmemesi ve kullandığımız mikonazol konsantrasyonlarının (10^{-9} - 10^{-4} M) maddenin özgülük/etki yollarını değiştirebilmesi, bu durumun açıklaması olabileceğini düşündürmektedir. Mikonazolün neden olduğu EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarının hem NO bağımlı hem de NO bağımsız grupta azaldığı ve ayrıca bu azalmanın NO bağımlı grupta NO bağımsız gruba göre daha fazla olduğu çalışmamızda saptanmıştır. Mikonazol'ün postsinaptik etkilerinin değerlendirilmesi için 80 mM KCL ve 2,5 mM Ca^{+2} ile kastırılmış dokularda etkileri değerlendirildi ve gevşetici etkilerinin olmadığı gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında, Mikonazol'ün EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine inhibe edici etkisinin presinaptik olduğu ve NO ile etkileşiminin olabileceği düşünülmektedir.

17-ODYA'nın spesifik ω -hidroksilaz inhibitörü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (131). Sıçan renal mikrozomlarında yapılan bir çalışmada, 17-

ODYA'nın CYP epoksiyjenazı da inhibe ettiği gösterilmiştir (132). Araşidonik asidin CYP hidroksilaz tarafından katalize edilen bir ω -hidroksilasyon ürünü olan 20-Hidroksiyeikosatetraenoik asit (20-HETE), düz kas tonusunu artırır. 17-ODYA ile ω -hidroksilazın inhibisyonu sonucunda AA'dan EET sentezini artırabilir veya genel AA havuzunda EET üretimine doğru bir kayma oluşabilir (133). Ek olarak, CYP yolunun inhibisyonu AA'nın CYP olmayan metabolitlerinin etkilerinin görülmesine neden olabilmektedir (131). İşli ve arkadaşlarının tavşan korpus kavernozumunda yapmış oldukları çalışmada, 17-ODYA'nın EAU ile oluşan gevşeme yanıtlarında artışa neden olduğu gösterilmiştir 17-ODYA'nın etkisine NO'nun katkısı araştırılmış ve NO'nun katkısının olmadığı tespit edilmiştir (103). Literatürde 17-ODYA'nın etkilerinin mide fundus üzerinde değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Sunulan çalışmada 17-ODYA, EAU aracılı NO bağımlı ve NO bağımsız gruplarda EAU aracılı kasılma yanıtlarını benzer oranda azaltmıştır. 17-ODYA'nın mide fundus dokusunda EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine olan etkilerinde literatürle uyumlu olarak NO'nun katkısının olmadığını gösterilmiştir. 17-ODYA'nın postsinaptik etkilerinin değerlendirilmesi için 80 mM KCL ve 2,5 mM Ca^{+2} ile kastırılmış dokularda etkileri değerlendirildi ve gevşetici etkilerinin olmadığı gösterilmiştir. 17-ODYA'nın EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine inhibe edici etkisinin presinaptik olduğu ve NO ile etkileşiminin olmadığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda, mide fundus düz kasında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerinde epoksieikozatrienoik asitlerin etkilerinin ve oluşan etkilere hangi

mekanizmaların katkısının olduğu araştırılmıştır. Aynı zamanda sitokrom P450 mono-oksijenaz inhibitörlerinin etkileri değerlendirilmiş olup mide fundus dokusunda epoksitlerin etkilerine K⁺ kanal blokörleri ve EET antagonisti olan 14-15 EEZE'nin katkısının araştırıldığı ilk çalışmadır. Konunun gastrointestinal sistemde görülen motilite bozuklukları üzerine olan etkileri değerlendirildiğinde ileriye yönelik tedavi ve çalışmalara ışık tutması açısından önemli bir referans niteliği taşımaktadır. Sunulan çalışmada, sitokrom P450 monooksijenaz inhibitörlerinin EAU tarafından indüklenen kolinerjik kasılma tepkileri üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Fakat CYP metabolitlerinin diğer olası etki mekanizmalarını araştırmak ve epoksijenaz sistemi ile ilgili diğer faktörlerin mide fundus dokusu üzerindeki olası katkılarını tanımlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

1. 11,12-EET ve 14,15-EET, NO bağımlı ve bağımsız EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını konsantrasyon bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı. Bu sonuçlar EET'lerin kasılma yanıtları üzerinde inhibe edici bir etkisinin olduğunu göstermektedir. 11,12-EET ve 14,15-EET'nin NO bağımlı ve bağımsız EAU aracılı kasılma yanıtlarını azaltıcı etkileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunması, EET'lerin bu etkisinde NO'nun katkısı olduğunu düşündürmektedir.

2. 14,15-EEZE; 11,12-EET ve 14,15-EET'nin NO bağımlı EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisini istatistiksel olarak anlamlı oranda azaltmasına rağmen NO bağımsız grupta istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Bu sonuçlar 14,15-EEZE'nin EET'lerin inhibe edici etkilerini antagonize ettiğini ve bu etkinin NO ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

3. Glibenklamid, 11,12-EET'nin EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı. 11,12-EET'nin EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisini Glibenklamid istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmemiştir. Bu sonuçlar bize 11,12- EET'nin NO bağımlı inhibe edici etkisini K_{ATP} kanalları ile ilişkili bir şekilde gerçekleştirdiğini düşündürken NO bağımsız inhibe edici etkisinin K_{ATP} kanalları ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Glibenklamid'in, artan dozlarda 14,15-EET'nin EAU aracılı NO bağımlı ve bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisine katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu sonuçlar

14,15-EET'nin NO bağımlı ve NO bağımsız inhibe edici etkisinin K_{ATP} kanalları ile ilişkili olmadığını göstermektedir.

4. 4-AP; 11,12-EET ve 14,15-EETnin EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı. 11,12-EET'nin NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmazken 14,15-EET'nin NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlar 11,12-EET'nin EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisinin ve 14,15-EET'nin EAU aracılı hem NO bağımlı hem de NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisinin K_v kanalları ile ilişkili olduğunu, 11,12-EET'nin EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisinin ise K_v kanalları ile ilişkili olmadığını göstermektedir.

5. İberiotoksin, 11,12-EET'nin EAU aracılı NO bağımlı ve NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisini istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuçlar 11,12-EET'nin kasılma yanıtlarındaki inhibe edici etkisinin BK_{Ca} kanalları ile ilişkili olmadığını göstermektedir. İberiotoksin, 14,15-EET'nin EAU aracılı NO bağımlı gevşeme yanıtları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmaya neden olmasına rağmen NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisine katkısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu sonuçlar 14,15-EET'nin NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisinin BK_{Ca} kanalları ile ilişkili olduğunu ancak, NO bağımsız inhibe edici etkisinin BK_{Ca} kanalları ile ilişkili olmadığını göstermektedir.

6. Mikonazol'ün oluşturduğu EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtının azalmasının NO bağımlı grupta, NO bağımsız gruba göre daha fazla olduğu saptanmış ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. 17-ODYA'nın oluşturduğu EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtını azalmasının NO bağımlı grupta, NO bağımsız gruba göre daha fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

7. 11,12-EET, 14,15-EET, 14,15-EEZE, Mikonazol ve 17-ODYA: potasyum klorür ve kalsiyumla kastırılmış dokularda istatistiksel olarak anlamlı bir gevşeme yanıtı oluşturmamışlardır. Bu durum maddelerin postsinaptik etkilerinin olmadığını, etkilerinin presinaptik mekanizma ile oluşturduklarını göstermektedir.

8. Mide fundus dokularından elde edilen protein örneklerinde CYP450-2J2 ve epoksit hidrolaz proteinlerinin western blot analizi sonuçlarına göre her iki proteinin ifade düzeylerinin var olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuç mide fundus dokusunda EET üretiminin gerçekleştiğini göstermektedir.

7.KAYNAKLAR

1. Zhang YF, Sun CC, Duan JX, Yang HH, Zhang CY, Xiong JB, et al. A COX-2/sEH dual inhibitor PTUPB ameliorates cecal ligation and puncture-induced sepsis in mice via anti-inflammation and anti-oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 2020;126:109907.
2. Zou A, Fleming J, Falck J, Jacobs E, Gebremedhin D, Harder D, et al. Stereospecific effects of epoxyeicosatrienoic acids on renal vascular tone and K(+) -channel activity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 1996;270(5):F822-F32.
3. Vatanparast M, Lee D-H, Kim Y. Biosynthesis and immunity of epoxyeicosatrienoic acids in a lepidopteran insect, *Spodoptera exigua*. *Developmental & Comparative Immunology.* 2020;107:103643.
4. Imig JD. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. *Physiological reviews.* 2012;92(1):101-30.
5. Chacos N, Capdevila J, Falck J, Manna S, Martin-Wixtrom C, Gill S, et al. The reaction of arachidonic acid epoxides (epoxyeicosatrienoic acids) with a cytosolic epoxide hydrolase. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1983;223(2):639-48.
6. Zeldin DC, Kobayashi J, Falck JR, Winder BS, Hammock BD, Snapper JR, et al. Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyeicosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase. *Journal of Biological Chemistry.* 1993;268(9):64027.
7. Fang X, Kaduce TL, Weintraub NL, VanRollins M, Spector AA. Functional implications of a newly characterized pathway of 11,12-epoxyeicosatrienoic acid metabolism in arterial smooth muscle. *Circ Res.* 1996;79(4):784-93.

8. Oltman CL, Weintraub NL, VanRollins M, Dellsperger KC. Epoxyeicosatrienoic acids and dihydroxyeicosatrienoic acids are potent vasodilators in the canine coronary microcirculation. *Circ Res.* 1998;83(9):932-9.
9. Sudhahar V, Shaw S, Imig JD. Epoxyeicosatrienoic acid analogs and vascular function. *Current medicinal chemistry.* 2010;17(12):1181-90.
10. Spector AA. Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *Journal of lipid research.* 2009;50:S52-S6.
11. Campbell WB, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. *Pflugers Arch.* 2010;459(6):881-95.
12. Fleming I. The factor in EDHF: Cytochrome P450 derived lipid mediators and vascular signaling. *Vascul Pharmacol.* 2016;86:31-40.
13. Ye D, Zhou W, Lee H-C. Activation of rat mesenteric arterial KATP channels by 11, 12-epoxyeicosatrienoic acid. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2005;288(1):H358-H64.
14. Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res.* 2004;43(1):55-90.
15. Gauthier KM, Falck JR, Reddy LM, Campbell WB. 14,15-EET analogs: characterization of structural requirements for agonist and antagonist activity in bovine coronary arteries. *Pharmacol Res.* 2004;49(6):515-24.
16. Zeldin DC, Foley J, Goldsworthy SM, Cook ME, Boyle JE, Ma J, et al. CYP2J subfamily cytochrome P450s in the gastrointestinal tract: expression, localization, and potential functional significance. *Mol Pharmacol.* 1997;51(6):931-43.

17. Keith L Moore, Arthur F. Dalley, Agur AMR. Clinically Oriented Anatomy. philadelphia: wolters kluwer; 2018.
18. L. S. Human Physiology: from cells to systems. 9th edition ed. CA/USA: Cengage Learning Inc; 2015.
19. Sullivan A, Temperley L, Ruban A. Pathophysiology, Aetiology and Treatment of Gastroparesis. Dig Dis Sci. 2020;65(6):1615-31.
20. Browning KN, Travagli RA. Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. Compr Physiol. 2014;4(4):1339-68.
21. Rogers RC, Hermann GE, Travagli RA. Brainstem pathways responsible for oesophageal control of gastric motility and tone in the rat. J Physiol. 1999;514 (Pt 2)(Pt 2):369-83.
22. Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. Adv Exp Med Biol. 2014;817:39-71.
23. Travagli RA, Hermann GE, Browning KN, Rogers RC. Brainstem circuits regulating gastric function. Annu Rev Physiol. 2006;68:279-305.
24. Zhou SY, Lu YX, Yao H, Owyang C. Spatial organization of neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus synapsing with intragastric cholinergic and nitric oxide/VIP neurons in the rat. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008;294(5):G1201-9.

25. Bygrave FL, Roberts HR. Regulation of cellular calcium through signaling cross-talk involves an intricate interplay between the actions of receptors, G-proteins, and second messengers. *Faseb j.* 1995;9(13):1297-303.
26. Dörje F, Wess J, Lambrecht G, Tacke R, Mutschler E, Brann MR. Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;256(2):727-33.
27. Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 1998;50(2):279-90.
28. Braverman AS, Tallarida RJ, Ruggieri MR, Sr. The use of occupation isoboles for analysis of a response mediated by two receptors: M2 and M3 muscarinic receptor subtype-induced mouse stomach contractions. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;325(3):954-60.
29. Hammer R. Muscarinic receptors in the stomach. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1980;66:5-11.
30. Wrzos HF, Tandon T, Ouyang A. Mechanisms mediating cholinergic antral circular smooth muscle contraction in rats. *World J Gastroenterol.* 2004;10(22):3292-8.
31. Leclerc PG, Lefebvre RA. Characterization of pre- and postsynaptic muscarinic receptors in circular muscle of pig gastric fundus. *Br J Pharmacol.* 2002;135(5):1245-54.

32. Leclere PG, Lefebvre RA. Characterization of pre-and postsynaptic muscarinic receptors in circular muscle of pig gastric fundus. *British journal of pharmacology*. 2002;135(5):1245-54.
33. Soejima O, Katsuragi T, Furukawa T. Opposite modulation by muscarinic M1 and M3 receptors of acetylcholine release from guinea pig ileum as measured directly. *Eur J Pharmacol*. 1993;249(1):1-6.
34. Dietrich C, Kilbinger H. Prejunctional M1 and postjunctional M3 muscarinic receptors in the circular muscle of the guinea-pig ileum. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1995;351(3):237-43.
35. Ogishima M, Kaibara M, Ueki S, Kurimoto T, Taniyama K. Z-338 facilitates acetylcholine release from enteric neurons due to blockade of muscarinic autoreceptors in guinea pig stomach. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294(1):33-7.
36. Leslie CC. Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. *Journal of lipid research*. 2015;56(8):1386-402.
37. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and- 2. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(52):33157-60
38. Falck JR, Krishna UM, Reddy YK, Kumar PS, Reddy KM, Hittner SB, et al. Comparison of vasodilatory properties of 14,15-EET analogs: structural requirements for dilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(1):H337-49.
39. Sudhahar V, Shaw S, Imig JD. Epoxyeicosatrienoic acid analogs and vascular function. *Curr Med Chem*. 2010;17(12):1181-90.

40. Deng Y, Theken KN, Lee CR. Cytochrome P450 epoxygenases, soluble epoxide hydrolase, and the regulation of cardiovascular inflammation. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(2):331-41.
41. Meijer J, DePierre JW. Cytosolic epoxide hydrolase. *Chem Biol Interact.* 1988;64(3):207-49.
42. Guenthner TM, Karnezis TA. Multiple epoxide hydrolases in human lung. *Drug Metab Dispos.* 1986;14(2):208-13.
43. Morisseau C, Hammock BD. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:37-58.
44. Zhang W, Otsuka T, Sugo N, Ardeshiri A, Alhadid YK, Iliff JJ, et al. Soluble epoxide hydrolase gene deletion is protective against experimental cerebral ischemia. *Stroke.* 2008;39(7):2073-8.
45. Zeldin DC, Moomaw CR, Jesse N, Tomer KB, Beetham J, Hammock BD, et al. Biochemical characterization of the human liver cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase pathway. *Arch Biochem Biophys.* 1996;330(1):87-96.
46. Zeldin DC, Kobayashi J, Falck JR, Winder BS, Hammock BD, Snapper JR, et al. Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyeicosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase. *J Biol Chem.* 1993;268(9):6402-7.
47. Harris TR, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase: gene structure, expression and deletion. *Gene.* 2013;526(2):61-74.
48. Fleming I. The pharmacology of the cytochrome P450 epoxygenase/soluble epoxide hydrolase axis in the vasculature and cardiovascular disease. *Pharmacological reviews.* 2014;66(4):1106-40.

49. Liu LP, Li B, Shuai TK, Zhu L, Li YM. Deletion of soluble epoxide hydrolase attenuates mice Hyperoxic acute lung injury. *BMC Anesthesiol.* 2018;18(1):48.
50. Chen Z, Tang Y, Yu J, Dong R, Yang Y, Fu M, et al. sEH Inhibitor Tppu Ameliorates Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis by Regulating Macrophage Functions. *Shock.* 2020;53(6):761-71.
51. Fang X, Kaduce TL, Weintraub NL, Harmon S, Teesch LM, Morisseau C, et al. Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. *J Biol Chem.* 2001;276(18):14867-74.
52. Chen J, Capdevila JH, Zeldin DC, Rosenberg RL. Inhibition of cardiac L-type calcium channels by epoxyeicosatrienoic acids. *Mol Pharmacol.* 1999;55(2):288-95.
53. Luxon BA, Milliano MT. Cytoplasmic transport of fatty acids in rat enterocytes: role of binding to fatty acid-binding protein. *Am J Physiol.* 1999;277(2):G361-6.
54. Richieri GV, Ogata RT, Zimmerman AW, Veerkamp JH, Kleinfeld AM. Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions. *Biochemistry.* 2000;39(24):7197-204.
55. Widstrom RL, Norris AW, Van Der Veer J, Spector AA. Fatty acid-binding proteins inhibit hydration of epoxyeicosatrienoic acids by soluble epoxide hydrolase. *Biochemistry.* 2003;42(40):11762-7.
56. Widstrom RL, Norris AW, Spector AA. Binding of cytochrome P450 monooxygenase and lipoxygenase pathway products by heart fatty acid-binding protein. *Biochemistry.* 2001;40(4):1070-6.

57. Fang X, Kaduce TL, VanRollins M, Weintraub NL, Spector AA. Conversion of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) to chain-shortened epoxy fatty acids by human skin fibroblasts. *J Lipid Res.* 2000;41(1):66-74.
58. Imig JD, Navar LG, Roman RJ, Reddy KK, Falck JR. Actions of epoxygenase metabolites on the preglomerular vasculature. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(11):2364-70.
59. Carroll MA, Balazy M, Margiotta P, Falck JR, McGiff JC. Renal vasodilator activity of 5,6-epoxyeicosatrienoic acid depends upon conversion by cyclooxygenase and release of prostaglandins. *J Biol Chem.* 1993;268(17): 12260-6
60. Zhu Y, Schieber EB, McGiff JC, Balazy M. Identification of arachidonate P-450 metabolites in human platelet phospholipids. *Hypertension.* 1995;25(4):854-9.
61. Carroll MA, Balazy M, Huang D-D, Rybalova S, Falck J, McGiff JC. Cytochrome P450-derived renal HETEs: storage and release. *Kidney international.* 1997;51(6):1696-702.
62. Wong PY, Lai PS, Falck JR. Mechanism and signal transduction of 14 (R), 15 (S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in guinea pig monocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2000;62(4):321-33.
63. Wong PY, Lai PS, Shen SY, Belosludtsev YY, Falck JR. Post-receptor signal transduction and regulation of 14(R),15(S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in U-937 cells. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1997;16(3):155-69.
64. Brayden JE. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;29(4):312-6.

65. Ye D, Zhou W, Lu T, Jagadeesh SG, Falck JR, Lee HC. Mechanism of rat mesenteric arterial KATP channel activation by 14,15-epoxyeicosatrienoic acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(4):H1326-36.
66. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circulation research*. 1996;78(3):415-23.
67. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*. 1999;401(6752):493-7.
68. Vriens J, Owsianik G, Fisslthaler B, Suzuki M, Janssens A, Voets T, et al. Modulation of the Ca²⁺ permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circ Res*. 2005;97(9):908-15.
69. Li P-L, Chen C-L, Bortell R, Campbell WB. 11, 12-Epoxyeicosatrienoic acid stimulates endogenous mono-ADP-ribosylation in bovine coronary arterial smooth muscle. *Circulation research*. 1999;85(4):349-56.
70. Dimitropoulou C, West L, Field MB, White RE, Reddy LM, Falck JR, et al. Protein phosphatase 2A and Ca²⁺-activated K⁺ channels contribute to 11,12-epoxyeicosatrienoic acid analog mediated mesenteric arterial relaxation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2007;83(1-2):50-61.
71. Pomposiello SI, Quilley J, Carroll MA, Falck JR, McGiff JC. 5,6-epoxyeicosatrienoic acid mediates the enhanced renal vasodilation to arachidonic acid in the SHR. *Hypertension*. 2003;42(4):548-54.

72. Van de Voorde J, Vanheel B, Leusen I. Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats. *Circulation research*. 1992;70(1):1-8.
73. Weston AH, Edwards G. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. *Biochemical pharmacology*. 1992;43(1):47-54.
74. Chen G, Yamamoto Y, Miwa K, Suzuki H. Hyperpolarization of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substances. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1991;260(6):H1888-H92.
75. Kauser K, Rubanyi GM. Potential cellular signaling mechanisms mediating upregulation of endothelial nitric oxide production by estrogen. *J Vasc Res*. 1997;34(3):229-36.
76. Snyder GD, Krishna UM, Falck JR, Spector AA. Evidence for a membrane site of action for 14,15-EET on expression of aromatase in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(5):H1936-42.
77. Behm DJ, Ogbonna A, Wu C, Burns-Kurtis CL, Douglas SA. Epoxyeicosatrienoic acids function as selective, endogenous antagonists of native thromboxane receptors: identification of a novel mechanism of vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328(1):231-9.
78. Cowart LA, Wei S, Hsu MH, Johnson EF, Krishna MU, Falck JR, et al. The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem*. 2002;277(38):35105-12.

79. Hoebel BG, Graier WF. 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid stimulates tyrosine kinase activity in porcine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 1998;346(1):115-7.
80. Imig JD, Zhao X, Falck JR, Wei S, Capdevila JH. Enhanced renal microvascular reactivity to angiotensin II in hypertension is ameliorated by the sulfonimide analog of 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *J Hypertens.* 2001;19(5):983-92.
81. Fang X, Weintraub NL, Oltman CL, Stoll LL, Kaduce TL, Harmon S, et al. Human coronary endothelial cells convert 14,15-EET to a biologically active chain-shortened epoxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(6):H2306-14.
82. Li L, Li N, Pang W, Zhang X, Hammock BD, Ai D, et al. Opposite effects of gene deficiency and pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase on cardiac fibrosis. *PLoS One.* 2014;9(4):e94092.
83. Sinal CJ, Miyata M, Tohkin M, Nagata K, Bend JR, Gonzalez FJ. Targeted disruption of soluble epoxide hydrolase reveals a role in blood pressure regulation. *J Biol Chem.* 2000;275(51):40504-10.
84. Nakagawa K, Holla VR, Wei Y, Wang WH, Gatica A, Wei S, et al. Salt-sensitive hypertension is associated with dysfunctional Cyp4a10 gene and kidney epithelial sodium channel. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1696-702.
85. Sun P, Lin DH, Wang T, Babilonia E, Wang Z, Jin Y, et al. Low Na intake suppresses expression of CYP2C23 and arachidonic acid-induced inhibition of ENaC. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;291(6):F1192-200.
86. Fan F, Roman RJ. Effect of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in nephrology. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2017;28(10):2845-55.

87. Zeldin DC. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(39):36059-62.
88. Jerez S, Sierra L, de Bruno MP. 17-Octadecynoic acid improves contractile response to angiotensin II by releasing vasoconstrictor prostaglandins. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2012;97(1-2):36-42.
89. Chen G, Xu R, Wang Y, Wang P, Zhao G, Xu X, et al. Genetic disruption of soluble epoxide hydrolase is protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2012;303(5):E563-E75.
90. Zhao X, Quigley JE, Yuan J, Wang M-H, Zhou Y, Imig JD. PPAR- α activator fenofibrate increases renal CYP-derived eicosanoid synthesis and improves endothelial dilator function in obese Zucker rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006;290(6):H2187-H95.
91. Yang W, Gauthier KM, Reddy LM, Sangras B, Sharma KK, Nithipatikom K, et al. Stable 5,6-epoxyeicosatrienoic acid analog relaxes coronary arteries through potassium channel activation. *Hypertension*. 2005;45(4):681-6.
92. Fulton D, Falck JR, McGiff JC, Carroll MA, Quilley J. A method for the determination of 5,6-EET using the lactone as an intermediate in the formation of the diol. *J Lipid Res*. 1998;39(8):1713-21.
93. Carroll MA, Garcia MP, Falck JR, McGiff JC. 5,6-epoxyeicosatrienoic acid, a novel arachidonate metabolite. Mechanism of vasoactivity in the rat. *Circ Res*. 1990;67(5):1082-8.

94. Carroll MA, Garcia MP, Falck JR, McGiff JC. Cyclooxygenase dependency of the renovascular actions of cytochrome P450-derived arachidonate metabolites. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;260(1):104-9.
95. Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension.* 2007;49(3):590-6.
96. Gauthier KM, Jagadeesh SG, Falck JR, Campbell WB. 14,15-epoxyeicosa-5(Z)-enoic-mSI: a 14,15- and 5,6-EET antagonist in bovine coronary arteries. *Hypertension.* 2003;42(4):555-61.
97. Gauthier KM, Deeter C, Krishna UM, Reddy YK, Bondlela M, Falck JR, et al. 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Circ Res.* 2002;90(9):1028-36.
98. Archer SL, Gragasin FS, Wu X, Wang S, McMurtry S, Kim DH, et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels. *Circulation.* 2003;107(5):769-76.
99. Nayeem MA, Poloyac SM, Falck JR, Zeldin DC, Ledent C, Ponnoth DS, et al. Role of CYP epoxygenases in A2A AR-mediated relaxation using A2A AR-null and wild-type mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(5):H2068-78.
100. Gross GJ, Gauthier KM, Moore J, Campbell WB, Falck JR, Nithipatikom K. Evidence for role of epoxyeicosatrienoic acids in mediating ischemic preconditioning and postconditioning in dog. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(1):H47-52.

101. Mori A, Yano E, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T. Role of Epoxyeicosatrienoic Acids in Acetylcholine-Induced Dilation of Rat Retinal Arterioles in Vivo. *Biol Pharm Bull.* 2021;44(1):82-7.
102. Corriveau S, Berthiaume M, Girard I, Nolin MA, Rousseau E, Pasquier JC. Effect of cytochrome P-450 epoxygenase and hydroxylase metabolites on rat myometrium contractility in non-pregnancy, late pregnancy and late pregnancy under inflammatory conditions. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40(3):661-9.
103. Isli F, Yildirim S, Ozturk Fincan GS, Ercan S, Sarioglu Y. Effects of epoxygenases on the nonadrenergic noncholinergic relaxant responses induced by electrical field stimulation in rabbit corpus cavernosum. *Andrologia.* 2019;51(8):e13317.
104. Yousif MH, Benter IF. Role of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in regulation of corporal smooth muscle tone in diabetic and older rats. *Vascul Pharmacol.* 2007;47(5-6):281-7.
105. Jin L, Foss CE, Zhao X, Mills TM, Wang MH, McCluskey LP, et al. Cytochrome P450 epoxygenases provide a novel mechanism for penile erection. *Faseb j.* 2006;20(3):539-41.
106. Kessler P, Popp R, Busse R, Schini-Kerth VB. Proinflammatory mediators chronically downregulate the formation of the endothelium-derived hyperpolarizing factor in arteries via a nitric oxide/cyclic GMP-dependent mechanism. *Circulation.* 1999;99(14):1878-84.
107. Qiu YE, Qin J, Luo Y, Qin SL, Mu YF, Cun R, et al. Increased epoxyeicosatrienoic acids may be part of a protective mechanism in human

ulcerative colitis, with increased CYP2J2 and reduced soluble epoxide hydrolase expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2018;136:9-14.

108. Yar Saglam AS, Alp E, Elmazoglu Z, Menevse S. Treatment with cucurbitacin B alone and in combination with gefitinib induces cell cycle inhibition and apoptosis via EGFR and JAK/STAT pathway in human colorectal cancer cell lines. *Hum Exp Toxicol.* 2016;35(5):526-43.

109. Ilhan SO, Vural IM, Dileköz E, Oztürk GS, Sarioglu Y. Enhancement effects of nicotine on neurogenic contractile responses in rabbit gastric fundus. *Eur J Pharmacol.* 2007;561(1-3):182-8.

110. Anuvarebekova A, Fincan GS, Vural IM, Ozger SI, Ercan ZS, Utkan T, et al. Investigation of enhancement effects of nicotine on cholinergic neurotransmission in isolated rabbit gastric fundus: role of antioxidants. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2010;30(3):179-84.

111. Yu Z, Xu F, Huse LM, Morisseau C, Draper AJ, Newman JW, et al. Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res.* 2000;87(11):992-8.

112. Imig JD, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(10):794-805.

113. Carroll MA, Doumad AB, Li J, Cheng MK, Falck JR, McGiff JC. Adenosine_{2A} receptor vasodilation of rat preglomerular microvessels is mediated by EETs that activate the cAMP/PKA pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;291(1):F155-61.

114. Hercule HC, Schunck WH, Gross V, Seringer J, Leung FP, Weldon SM, et al. Interaction between P450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(1):54-60.
115. Wang H, Lin L, Jiang J, Wang Y, Lu ZY, Bradbury JA, et al. Up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase by endothelium-derived hyperpolarizing factor involves mitogen-activated protein kinase and protein kinase C signaling pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;307(2):753-64.
116. Zhang P, Ma Y, Wang Y, Ma X, Huang Y, Li RA, et al. Nitric oxide and protein kinase G act on TRPC1 to inhibit 11,12-EET-induced vascular relaxation. *Cardiovasc Res.* 2014;104(1):138-46.
117. Udosen IT, Jiang H, Hercule HC, Oyekan AO. Nitric oxide-epoxygenase interactions and arachidonate-induced dilation of rat renal microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(5):H2054-63.
118. Harrington LS, Falck JR, Mitchell JA. Not so EEZE: the 'EDHF' antagonist 14, 15 epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid has vasodilator properties in mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol.* 2004;506(2):165-8.
119. Ye D, Zhou W, Lee HC. Activation of rat mesenteric arterial KATP channels by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(1):H358-64.
120. Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. Evidence against a role of cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolites in endothelium-dependent hyperpolarization by acetylcholine in rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1997;120(3):439-46.

121. Chan W, Yao X, Ko W, Huang Y. Nitric oxide mediated endothelium-dependent relaxation induced by glibenclamide in rat isolated aorta. *Cardiovasc Res.* 2000;46(1):180-7.
122. Zhang Y, Oltman CL, Lu T, Lee HC, Dellsperger KC, VanRollins M. EET homologs potently dilate coronary microvessels and activate BK(Ca) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(6):H2430-40.
123. Yang W, Holmes BB, Gopal VR, Kishore RV, Sangras B, Yi XY, et al. Characterization of 14,15-epoxyeicosatrienoyl-sulfonamides as 14,15-epoxyeicosatrienoic acid agonists: use for studies of metabolism and ligand binding. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321(3):1023-31.
124. Sun CW, Alonso-Galicia M, Taheri MR, Falck JR, Harder DR, Roman RJ. Nitric oxide-20-hydroxyeicosatetraenoic acid interaction in the regulation of K⁺ channel activity and vascular tone in renal arterioles. *Circ Res.* 1998;83(11):1069-79.
125. Tare M, Parkinson HC, Coleman HA, Neild TO, Dusting GJ. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature.* 1990;346(6279):69-71.
126. Onoue H, Katusic ZS. Role of potassium channels in relaxations of canine middle cerebral arteries induced by nitric oxide donors. *Stroke.* 1997;28(6):1264-70; discussion 70-1.
127. Lauterbach B, Barbosa-Sicard E, Wang MH, Honeck H, Kärger E, Theuer J, et al. Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators. *Hypertension.* 2002;39(2 Pt 2):609-13.

128. Eckman DM, Hopkins N, McBride C, Keef KD. Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in guinea-pig coronary artery: role of epoxyeicosatrienoic acid. *Br J Pharmacol*. 1998;124(1):181-9.
129. Lai J, Chen C. The Role of Epoxyeicosatrienoic Acids in Cardiac Remodeling. *Front Physiol*. 2021;12:642470.
130. Alvarez J, Montero M, Garcia-Sancho J. High affinity inhibition of Ca^{2+} -dependent K^{+} channels by cytochrome P-450 inhibitors. *J Biol Chem*. 1992;267(17):11789-93.
131. Nithipatikom K, Gross ER, Endsley MP, Moore JM, Isbell MA, Falck JR, et al. Inhibition of cytochrome P450 ω -hydroxylase: a novel endogenous cardioprotective pathway. *Circ Res*. 2004;95(8):e65-71.
132. Zou AP, Ma YH, Sui ZH, Ortiz de Montellano PR, Clark JE, Masters BS, et al. Effects of 17-octadecynoic acid, a suicide-substrate inhibitor of cytochrome P450 fatty acid ω -hydroxylase, on renal function in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;268(1):474-81.
133. Wang MH, Brand-Schieber E, Zand BA, Nguyen X, Falck JR, Balu N, et al. Cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolism in the rat kidney: characterization of selective inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;284(3):966-73.

8.ÖZET

Sıçan İzole Mide Fundusunda Epoksijenazların Etkilerinin ve Mekanizmalarının Araştırılması

Bu çalışmada izole sıçan mide fundus düz kasında epoksijenazların etkilerinin ve oluşan etkilere hangi mekanizmaların katkısının olduğunun araştırılması amaçlanmıştır. Erişkin erkek wistar sıçanlardan izole edilen mide fundus dokuları, Krebs solüsyonu içeren organ banyosuna bir ucu organ askısına bir ucu da izometrik kuvvet transdüserine bağlı olacak şekilde yerleştirilmiştir. NO bağımlı EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları guanetidin ve indometasin varlığında, NO bağımsız yanıtlar ortama ek olarak NOS inhibitörü L-NAME eklenerek elde edildi. 11,12-EET ve 14,15-EET, EAU aracılı NO bağımlı ve bağımsız kolinerjik kasılma yanıtlarını azaltmıştır. NO bağımlı ve NO bağımsız gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaktadır. Bu bulgu, etkilerine NO'nun katkısının olduğunu göstermektedir. 11,12-EET'nin NO bağımlı EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını azaltıcı etkisi 14,15-EEZE, Glibenklamid ve 4-AP varlığında azaldı. 14,15-EET'nin NO bağımlı EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını azaltıcı etkisi 14,15-EEZE, 4-AP ve iberiotoksin varlığında azaldı. NO bağımsız gruplarda sadece 14,15-EET'nin EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını azaltıcı etkisi 4-AP varlığında azaldı. Mikonazol ve 17-ODYA, tüm gruplarda EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını azaltıcı etki gösterdi. Mikonazolün etkisi, NO bağımlı ve NO bağımsız gruplar arasında istatistiksel olarak farklıdır. 11,12-EET, 14,15-EET, 14,15-EEZE, Mikonazol ve 17-ODYA: potasyum klorür ve kalsiyumla kastırılmış dokularda gevşeme yanıtı oluşturmadi.

Western blot analizi ile CYP450-2J2 ve epoksit hidrolaz proteinlerinin ifadenmesinin olduğu gösterildi. Bu sonuçlar, EET'lerin ve sitokrom p450 monooksijenaz inhbitörlerinin EAU kolinerjik kasılma yanıtları üzerine olan etkilerinin presinaptik mekanizma ile olduğunu, etkilerine NO'nun ve potasyum kanallarının katkısı bulunduğunu, endojen olarak sentez edildiklerini ve reseptörlerinin var olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Mide fundus, nitrik oksit, epoksijenazlar, potasyum kanal blokörleri

9. YABANCI DİLDE ÖZET (SUMMARY)

Investigation of the Effects and Mechanisms of Epoxygenases in Isolated Rat Gastric Fundus

This study aimed to investigate the effects of epoxygenases in isolated rat gastric fundus smooth muscle and which mechanisms contribute to the effects. Gastric fundus tissues isolated from adult male Wistar rats were placed in an organ bath containing Krebs solution with one end connected to the hanger and other end connected to the isometric force transducer. NO-dependent EFS-mediated cholinergic contractile responses were obtained in the presence of guanethidine and indomethacin, and to obtain NO-independent responses NOS inhibitor L-NAME was also added. 11,12-EET and 14,15-EET reduced the EAU-mediated NO-dependent and independent cholinergic contractile responses. There is a statistical difference between NO-dependent and NO-independent groups. This shows that NO contributes to their effects. The reducing effect of 11,12-EET on NO-dependent EFS-mediated cholinergic contractile responses decreased in the presence of 14,15-EEZE, Glibenclamide and 4-AP. The same reducing effect of 14,15-EET (NO-dependent group) decreased in the presence of 14,15-EEZE, 4-AP and iberiotoxin. In NO-independent groups, only the effect of 14,15-EET on reducing EFS-mediated cholinergic contractile responses was reduced in the presence of 4-AP. Miconazole and 17-ODYA decreased EFS-mediated cholinergic contractile responses in all groups. The effect of miconazole is statistically different

between NO-dependent and NO-independent groups. 11,12-EET, 14,15-EET, 14,15-EEZE, Miconazole and 17-ODYA did not induce a relaxation response in tissues contracted with KCl and Ca^{2+} . Western blot analysis demonstrated the expression of CYP450-2J2 and epoxide hydrolase proteins. These results show that the effects of EETs and cytochrome p450 monooxygenase inhibitors on EFS-mediated cholinergic contractile responses are mediated by a presynaptic mechanism, NO and potassium channels contribute to their effects, they are synthesized endogenously and their receptors exist.

Keywords: Gastric fundus, nitric oxide, epoxigenases, potassium channel blockers

10.ÖZGEÇMİŞ

Adı : Derya Sebile

Soyadı : KOÇ

