

164643

TC.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

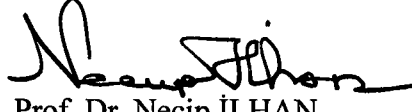
SIÇANLARDA AKUT ve KRONİK NİTRİK OKSİT
SENTAZ İNHİBİSYONU KAN BASINCI VE PLAZMA
NİTRİK OKSİT İLİŞKİLERİ ve ELEKTROKİMYASAL ve
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENGİN YILMAZ

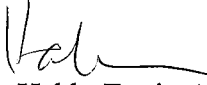
ELAZIĞ - 2005

ONAY SAYFASI


Prof. Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

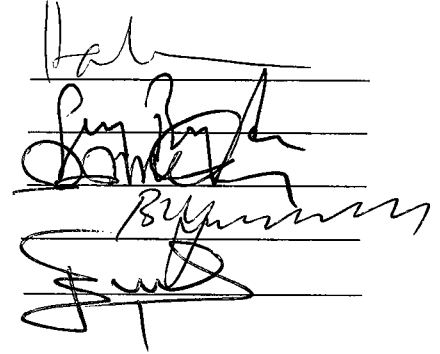

Prof. Dr. Hakkı Engin AKSULU Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak
kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Hakkı Engin AKSULU
Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Hakkı Engin AKSULU
Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ
Doç. Dr. İhsan HALİFEOĞLU
Doç. Dr. Bayram YILMAZ
Yrd. Doç. Dr. Engin ŞAHNA



İÇİNDEKİLER

	SAYFA
1. Özet	1
2. Abstract	3
3. Giriş	5
3.1.Nitrik oksit	6
3.1.1.Nitrik oksitin fizyolojik etkileri ve fizyopatolojik süreçlere katılımı	10
3.1.1.1 Nitrik oksit ve dolaşım sistemi	10
3.1.1.2. NO ve sinir sistemi	13
3.1.1.3. Nitrik oksit ve gastrointestinal sistem	13
3.1.1.4. NO ve solunum sistemi	14
3.1.1.5. NO ve üriner sistem	15
3.1.1.6. NO _x ve immün sistem	16
3.1.1.7. NOS İnhibisyonu	17
3.2. Ölçüm metodları	17
3.2.1.NO metre cihazı	18
3.2.2 Elektron paramanyetik rezonans spektrofotometresi	18
3.2.3.Ultraviyole görünür bölge spektrofotometresi	18
3.2.3.1. Asit ölçümü	19
3.2.3.2. Alkali ölçüm	19
3.2.3.3 İyon kompleks ölçümü	19
3.2.4.Kemiluminesans	20
3.2.5..Elektroforez	20
3.2.5.1.Misellar elektrokinetik kapiler kromatografisi	21
3.2.6. Kütle spektrofotometresi-gaz kromatografisi	21
3.2.7. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi	22
3.2.8.Kolorimetre	22
3.2.9.Florimetre	22
3.2.10. Diğer metodlar	23
4.YÖNTEM VE GEREÇ	24
4.1.Denekler	24
4.2.Gruplandırma ve deneysel prosedür	24

4.3.Kan basıncı ölçümleri	25
4.4.Kan örneklerinin alınması	26
4.5.Çözeltilerin hazırlanması	26
4.6.Ölçümlere hazırlık	27
4.6.1.Ultraviyole ve görünür bölge spektrofotometre	27
4.6.2.NO metre cihazı	28
4.7.Spektrofotometre ile ölçümler	29
4.8.NO metre cihazı ile ölçümler	29
4.9.Kullanılan kimyasallar	29
4.10. İstatistik	30
5. BULGULAR	31
5.1.L-NNA uygulamasının deneklerin ağırlıkları üzerine etkileri	31
5.2.L-NNA uygulamasının kan basıncı üzerine etkileri	32
5.2.1.Sistolik kan basınçları	32
5.2.1.1 Tek doz L-NNA uygulamasının SKB üzerine etkileri	32
5.2.1.2. Kronik düşük doz L-NNA uygulamasının SKB üzerine etkileri	33
5.2.1.3. Kronik yüksek doz L-NNA uygulamasının SKB üzerine etkileri	35
5.2.2. Diyastolik kan basınçları	37
5.2.2.1. Tek doz L-NNA uygulamasının DKB üzerine etkileri	37
5.2.2.2. Kronik düşük doz L-NNA uygulamasının DKB üzerine etkileri	38
5.2.2.3. Kronik yüksek doz L-NNA uygulamasının DKB üzerine etkileri	39
5.2.3. L-NNA uygulamasının NO _x düzeyi üzerine etkileri	40
5.2.3.1. Tek doz L-NNA uygulamasının NO _x üzerine etkileri	40
5.2.3.2. Kronik düşük doz L-NNA uygulamasının NO _x üzerine etkileri	42
5.2.3.3. Kronik yüksek doz L-NNA uygulamasının NO _x üzerine etkileri	44
5.3 NO metre cihazı ile UV-GB spektrofotometresinin karşılaştırılması	45

6. TARTIŞMA	46
7. KAYNAKLAR	53
8. ÖZGEÇMİŞ	63



Tablo.1 Kontrol dL-NNA ve yL-NNA gruplarının deney başlangıcı ve deney sonundaki ağırlık miktarındaki %artışlar.	31
Tablo.2 Tek doz L-NNA uygulamadan önceki, uyguladıktan 1, 3 ve 24 saat sonraki SKB ve DKB değerleri	32
Tablo.3 Tek doz L-NNA uygulamasından önce, 1, 3 ve 24 saat sonraki plazma NO _x değerleri	41
Tablo.4 Düşük doz L-NNA uygulanan sıçanların 0., 7., 14. ve L-NNA uygulaması kesildikten sonraki 24 ve 48. saatlerdeki SKB ve DKB değerleri	34
Tablo.5 Düşük doz L-NNA uygulanan grupta, L-NNA uygulandıktan hemen sonraki, 24 ve 48 saat sonraki plazma NO _x değerleri	43
Tablo.6 Yüksek doz L-NNA uygulanan grubun 0., 7. ve 14 günlerdeki SKB ve DKB değerleri	36

Şekil.1.1 Spektrofotometre cihazı için kalibrasyon eğrisi	27
Şekil.1.2 NO metre cihazı için kalibrasyon eğrisi	29
Şekil.2.1 Tek doz L-NNA uygulamasının SKB üzerine etkileri	33
Şekil.2.2 Tek doz L-NNA uygulamasının DKB üzerine etkileri	38
Şekil.3 Tek doz L-NNA uygulamasının plazma NO _x değerleri üzerine etkileri	42
Şekil.4.1 Düşük doz L-NNA uygulamasının ve L-NNA uygulaması sona erdirildikten 24 ve 48 saat sonrasının deneklerin SKB üzerine etkileri	35
Şekil.4.2 Düşük doz L-NNA uygulamasının ve 24 ve 48 saat sonrasının deneklerin DKB üzerine etkileri	39
Şekil.5 Düşük doz L-NNA uygulamasında plazma NO _x değerleri üzerine etkileri	44
Şekil.6.1 Yüksek doz L-NNA uygulamasının SKB üzerine etkileri	36
Şekil.6.2 Yüksek doz L-NNA uygulamasının DKB üzerine etkileri	40
Şekil.7 Spektrofotometre ve NO metre cihazlarının NO _x sonuçlarının karşılaştırılması	45

Kısaltmalar Listesi

ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
NO	Nitrik oksit
L-NAME	N _ω –nitro-L-arjinin metilester
L-NNA	N _ω Nitro-L-arjinin
eNOS	Endoteliyal nitrik oksit sentaz
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
Ach	Asetilkolin
iNOS	İndusibl nitrik oksit sentaz
BH ₄	Tetra hidrobiopterin
NADPH	Nikotinamid adenindinükleotid
Akt	Protein kinaz B
IL-6	İnterlökin 6
TNF-α	Tümör nekroze edici faktör
RSNO	S- nitrozotiyol
SOD	Süperoksit dismutaz
NO ⁻	Nitroksil anyonu
NO _x	NO ₂ + NO ₃
GABA	Gama aminobutirik asit
EPR	Elektronparamanyetik rezonans
DAN	2,3 diamino naftalen
LLC-PK1	Böbrek epitelyumu
RLF-6	Fibroblastlar
EDHF	Endotelyumdan türemiş hiperpolarize edici faktör
≈	Yaklaşık

1. ÖZET

Nitrik oksit sentaz (NOS) inhibisyonu sonucu oluşan kan basıncı (KB) artışları ve plazma NO değerleri değişimleri arasındaki ilişkiler henüz açıkça belirlenmemiştir. Bu çalışmanın amacı; 1) normal ve NOS enzim inhibitörü N^ω-Nitro-L-arjinin (L-NNA) uygulanmış sıçanlarda KB ve plazma NO_x düzeylerini belirlemek ve KB ile plazma NO₂⁻+NO₃⁻ (NO_x) düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek, 2) NO_x ölçümlerinde spektrofotometrik ve elektrokimyasal ölçümleri karşılaştırmaktır.

Yetişkin erkek Wistar sıçanlar 4 gruba ayrıldı. 1) Kontrol grubu (K, n=10), 2) Akut doz L-NNA ana grubu (aL-NNA, n=19). Bu ana grubun deneklerine tek doz L-NNA (25 mg/kg i.p.) uygulamasından 1, 3 ve 24 saat sonra KB ölçümü yapıldı ve kan örnekleri alındı, 3) Kronik düşük doz L-NNA ana grubu (dL-NNA, n=19). Bu grubun deneklerine 2 hafta süreyle L-NNA (içme suyunda ≈16 mg/kg) uygulandı ve süre sonunda, L-NNA uygulamasının sona erdirilmesinden hemen sonra, 24 ve 48 saat sonra KB ölçümü yapıldı ve kan örnekleri alındı, 4) Kronik yüksek doz L-NNA grubu (yL-NNA, n=28) Bu grubun deneklerine 2 hafta süreyle L-NNA uygulandı (içme suyunda ≈47 mg/kg) süre sonunda hemen KB ölçümü yapıldı ve kan örnekleri alındı. Kronik düşük ve yüksek doz L-NNA uygulanan gruplarda L-NNA uygulamadan önce ve L-NNA uygulamasının 7 ve 14 üncü günlerinde tail-cuff yöntemi ile KB ölçüldü.

dL-NNA ve yL-NNA gruplarında 14.gün KB ve plazma NO_x düzeyleri anlamlı olarak yüksek iken, NO_x düzeyleri dL-NNA grubunda ilaç uygulaması sona erdikten 24 ve 48 saat sonra anlamlı olarak düşüktü. aL-NNA ana grubunda tek doz L-NNA uygulaması 1 ve 3.cü saatte KB' ını artırırken plazma NO_x düzeylerini ise 3. saatte anlamlı olarak düşürmüştür. Yirmidört saat sonra ise hem KB hemde NO_x

değerleri geri dönmüştür. NO_x değerlerinde, spektrofotometrik ve NO metrik ölçümler arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı.

Anahtar kelimeler: L-NNA, Kan basıncı, Plazma NO_x, Spektrofotometre, NO metre,



2. ABSTRACT

The relationship between the nitric oxide synthase (NOS) inhibition mediated blood pressure (BP) elevation and changes in plasma nitric oxide (NO) levels is not determined yet. Aims of this study were 1) to determine BP and plasma NO levels in normal and the NOS inhibitor N^ω-Nitro-L-arginine (L-NNA) administered rats and evaluate the relationship between the changes in BP and NO₂⁻+ NO₃⁻ (NO_x) levels and 2) to compare the results of NO level measurements obtained by spectrophotometer and NO meter.

Adult male Wistar rats were divided into four groups: First group served as controls (n=10). 2) Rats in the acute dose of L-NNA main group (aL-NNA, n=19) were administered a single dose of L-NNA (25 mg/kg i.p.) and BP were measured 1 hour 3 hour and 24 hour, later respectively and blood samples were collected. 3) Animals in the chronic low dose of L-NNA main group (lL-NNA, n=19) were administered L-NNA (≈16 mg/kg in drinking water) for 2 weeks and after final dose, BP was measured immediately after the final dose, 24 hours and 48 hours after and blood samples were also collected. 4) Chronic high dose of L-NNA group (hL-NNA) was given L-NNA as 47 mg/kg/day in drinking water for 2 week (n=28), and after the final dose, BP was immediately measured and blood samples obtained. In chronic low dose and chronic high dose groups, BP measured before L-NNA administration and 7th and 14th days after L-NNA administration with tail-cuff method, respectively.

In lL-NNA and hL-NNA groups, while BP and plasma NO_x levels significantly higher on the day 14, NO_x levels significantly lower 24 and 48 hours after administration of L-NNA in the dL-NNA group. In aL-NNA main group, single dose

L-NNA administration, while BP increased at 1 and 3 hours, plasma NO_x levels significantly reduced 3 hours following the drug administration. After 24 hours, both BP and NO_x levels were recovered. There was no significant difference between the values of NO_x measured with spectrophotometer and NO meter.

Key words:L-NNA, Blood pressure, Plasma NO_x, Spectrophotometer, NO meter,



3.GİRİŞ

Nitrik oksit (NO), L-arjinin aminoasidinden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi olarak bilinen bir enzim grubu tarafından oluşturulur. Kısa ömürlü bir molekül olan NO'nun vazodilatör, anti-bakteriyal, anti-viral özelliklerinin olduğu bilinmektedir (94). NOS inhibisyonu yapmak için yaygın olarak N^ω-nitro-L-arjinin metilester (L-NAME), N^ω Nitro-L-arjinin (L-NNA) gibi kimyasal maddeler kullanılmaktadır (27). Akut ve kronik NOS inhibisyonunun kan basıncını artırdığı iyi bilinmektedir. Özellikle NOS inhibitörlerinin uzun süreli uygulamaları hipertansiyon çalışmalarında yeni bir deneysel model oluşturabileceği öngörülmektedir. Ancak, NOS inhibisyonu- aracılı hipertansiyon çalışmalarında farklı NOS inhibitörleri kullanıldığı gibi, bu inhibitörlerin farklı dozlarda ve sürelerde uygulanmaları sonucu standart bir model henüz geliştirilememiştir. Düşük dozlarla yapılan NOS inhibisyonunda organ hasarı ve gelişme bozukluğu meydana gelmezken, yüksek dozlarla yapılan NOS inhibisyonunda özellikle böbreklerde parankim ve damar hasarı ve malign hipertansiyon geliştiği belirtilmektedir (93). Akut ve kronik NOS inhibisyonu sonucu oluşan kan basıncı (KB) artışları ve plazma NO değerleri değişimleri arasındaki ilişkiler henüz açıkça belirlenmemiştir. NO vücut sıvılarında doğrudan veya dolaylı olarak ölçülebilmektedir. Dolaylı ölçümlerde nitrat (NO₃) ve nitrit (NO₂) gibi metabolitleri kullanılmaktadır. Dolaylı ölçümler ya NO₃ molekülü NO₂ molekülüne indirgenerek ya da NO₂ molekülü NO₃ molekülüne yükseltgenerek yapılır. Ölçümlerde spektrofotometre, NO metre cihazı, florimetre gibi cihazlar kullanılmaktadır (114).

Organizmada kan dolaşımı, sinir sistemi ve immün sistemin düzenlenmesi ve çalışmasında çok önemli bir mekanizma olan L-arjinin-NO yolağının NO salıverme

yeteneği fizyolojik, patolojik ve patofizyolojik süreçlerde değişmektedir. Vücut sıvılarında ve dokularında NO düzeyinin tespiti önem arz etmektedir. Bu nedenle NO düzeylerinin sağlıklı ve rantabl lm faydalı olacaktır.

Bu çalışmada, akut ve uzun süreli NOS inhibisyonu sonucu oluşan kan basıncı ve plazma NO düzeylerindeki değişimler tespit edilerek, aralarındaki ilişkinin araştırılması ve $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (NO_x) lmlerinde spektrofotometrik ve amperometrik yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

3.1. NİTRİK OKSİT

Endotelyumdan türeyen gevşeme faktörünün (EDRF) NO olduğu 1987 de tanımlanmıştır (82). NO, L-arjinin'in L-sitrulline dönüşümünden sentezlenir (71). NO sentezi için gerekli olan arjininin büyük çoğunluğu diyetle, protein sentezi ve metabolizmasıyla ve Krebs Henseleit re devriyle arjinosksinik asit senteziyle meydana gelir. Arjininin membran karşısına taşınmasını sağlayan bir kaç taşıyıcı sistem vardır. Bunların en önemlisi endotel hücre si içinde yer alan y^+ sistemidir. Yine insan vasküler hücreleri içinde yer alan doyurulamayan komponentleri vardır. Fizyolojik konsantrasyonlarda L-arjininin yaklaşık % 70 i y^+ sistemi ile taşınır. İnsan endotelyumunda 1mM dan yüksek konsantrasyonlar doyurulamayan taşıyıcı sistemiyle taşınır (2).

L-arjiniinden NO oluşumunu katalizleyen  izoenzim vardır. Endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) kalsiyum bağımlıdır ve yapısal olarak adlandırılır. Yapısal NOS' tan türeyen NO'nun bazal salınımı vardır. Asetilkolin (Ach) gibi bazı sinyallere cevap olarak NO' nun konsantrasyonu kısa bir zaman boyunca artabilir (75). Endotelial hücrelere morfin uygulandığında eNOS tarafından üretilen NO miktarı değişir ve bu birkaç saat sürebilir (66). İndüklenebilir NOS (iNOS)

kalsiyumdan bağımsız olup, sitokin ve endotoksinler tarafından indüklenir, patolojik şartlarda aktive olur (22). eNOS, nNOS, iNOS sırasıyla 7,12 ve 17.kromozomlar üzerinde üç farklı gen tarafından kodlanır (17). eNOS tarafından NO üretilebilmesi için: 1.Hem grubu ve NADPH, 6(R)-5,6,7,8 tetra hidrobiopterin (BH₄) flavin adenindinükleotid ve flavinmononükleotid ile birleşmelidir. BH₄ ile eNOS birleştiğinde enzim stabilize olur. L-arjinin varlığında kompleks daha stabil bir hale gelir. Öncelikle eNOS fosforile olur. Sonra sinyal yolları ile sinyal iletimi olur. G proteini aktifleşir, glikoprotein ile birleşir, inozitoltrifosfat üretilir, Ca⁺² hücre içine girer, hücre içi Ca⁺² miktarı artar, kalmodulin aktive olur, sonunda da Akt (protein kinaz B) isimli bir protein aktifleşir ve NO üretilir (2).

nNOS'tan türeyen NO'nun glial hücrelerde interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekroze edici faktör (TNF- α) gibi birkaç proinflamatuvar mediatörün transkripsiyonunu düzenlediği gösterilmiştir (100). Hem ve demir gruplarının bağlanmasıyla nNOS monomerleri gevşek bir şekilde dimerleşir. Hem'nin bağlanmasından sonra hücre içi Ca⁺² seviyesi artar. nNOS protein kinaz C tarafından ve cGMP bağımlı protein kinazlar ayrıca Ca⁺²/ kalmodulin cAMP ile fosforilasyonu sonucu inaktive edilir (20,19). iNOS proinflamatuvar sitokinler gibi çeşitli sinyal molekülleriyle indüklenebilir (76). iNOS'un uyarılması genel olarak 3-4 saatlik bir süre sonunda görülür ve bir defa uyarıldığında 24-48 saat boyunca NO üretilir (86).

Oluşan NO sonra NO₂⁻, NO₃⁻ iyonlarına ve S- nitrozotiyol (RSNO) bileşiklerine dönüşür (69). NO'nun su ve gaz fazındaki bozunma hızı ve modu çok değişiktir. Sulu çözeltide NO'dan en fazla NO₂⁻ oluşur. Sulu çözeltilerde ki NO'nun otooksidasyon kinetiği NO'nun konsantrasyonuna bağlıdır (25). NO'nun fizyolojik konsantrasyonu 1 μ M ile 10nM arasındadır ve yarı ömrü oksijen ile olan reaksiyonuna bağlıdır. Bu süre yaklaşık 9 ile 900 dakika arasındadır (7). NO

üretildikten sonra çevreye difüze olabilir. NO'nun difüzyonu, biyolojik yarı ömrünün belirlenmesi ve lokal modülatör olarak hareket eden NO'nun yeteneğinin anlaşılması için temeldir (7). NO'nun dokularda uzun mesafelere difüze olma kapasitesi, salinle perfüze edilmiş kalbin koroner dolaşımına infüze edilen gerçek NO'nun standart sulu çözeltileri kullanılarak gösterilmiştir. Hemoglobine yokluğunda NO hızlı bir şekilde damarsal yapı boyunca difüze olur ve yeterli bioaktif miktarı kardiyomiyositlerin mitokondri ve vasküler düz kas hücrelerine ulaşarak koroner kan akımı ve sol ventriküler fonksiyonu etkiler (50). Miyokardiyal doku içinde endotelial NO 0.1-0.3 μM konsantrasyonlarında bulunur. Burada miyoglobine bağlanarak mitokondride respiratuvar zincirin elektron transferi ve sitokrom oksidaz üzerinde inhibitör etkileri vardır (84). Ayrıca NO parakrin mediyatör olarak görev yaparak komşu hücrelere doğru hareket eder. Bu hareket sırasında moleküler oksijen, tiyol ve indirgenmiş hemoproteinlerle etkileşebilir. Bu reaksiyonların herbirinin büyüklüğü mikroçevresel şartlara ve diğer biyoreaktanların konsantrasyonuna bağlıdır (48). Yine son zamanlarda membranın hidrofobik bölgelerinde su medyumuna çevresindekine oranla 300 kat daha hızlı olarak NO ile moleküler oksijene dönüştüğü gösterilmiştir (109). NO, O_2^- peroksinitrit oluşturmak üzere reaksiyona girer. Peroksinitrit oluşumu sadece NO'nun görünen hızında meydana gelir ve süperoksit oluşumuna eşittir (72). Peroksinitrit oluşumu alkali çözeltide stabildir ve hızlı bir şekilde protonlanır (7). İn vivo şartlarda peroksinitrit stabil olmayan nitrozoperoksi karbonat anyonuna yaklaşır ve ortamda bulunan CO_2 ile reaksiyon verir (106). O_2 varlığında NO, NO_3^- 'e dönüşür. Ayrıca endotelial hücre kültürlerinde bulunan süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit anyonunun dismutasyonun yanı sıra nitroksil anyonu NO^- ye indirger (78). NO'nun yarı ömrü oksijenden türemiş radikaller pO_2 , pH geçiş metallerinin konsantrasyonu, tiyollerin miktarı, NO_2 ve NO_3 konsantrasyonuna bağlıdır. Yoshida

ve arkadaşları erkek sıçanlara inhale ^{15}N (108ppm) ve ^{15}NO kana injekte ederek metabolik yolları araştırdılar (113). ^{15}N ile maruziyetten sonra sıçanların idrar, kırmızı kan hücreleri, serum ve kanında yüksek seviyede bulurlarken böbrek, kas, akciğer, karaciğer ve trakelerinde düşük miktarda işaretlenmiş N buldular. Yapılan bu çalışmalarda :

1. Hem inhale hem de injekte edilen NO 'nun hızlı bir şekilde kırmızı kan hücreleri dolaşımına girip oksitlendiğini sonra da idrarla atıldığını,
2. Ne NO ne de NO metabolitlerinin uzun peryodlarda çeşitli organlarda depolanmadığı gösterilmiştir (112). Tannenbaum ve arkadaşları memeli türlerinin idrarında NO_3 üretildiğini gösterdiler. Normal ve germ serbest sıçanlara $^{15}\text{NH}_3$ ü oral uyguladılar ve oluşan NO_3 'ün alınan NH_3 den daha fazla olduğu gösterilmiştir (31,107). Burada $^{15}\text{NH}_3$ şeklinde uygulanan ^{15}N un %50 si NO_3 'e dönüşüp idrarla atılırken azot nitratının geri kalan %50 si henüz belirlenmemiş bir kaynak tarafından oluşturulur. Sıçanlara $^{15}\text{NH}_3$ ile birlikte endotoksin uygulandığında NO_3 biyosentezi birkaç kat artmaktadır. Ayrıca NO biyosentez yolağının, retikuloendotelial sistemlerin aktive edilmesiyle üretilen oksijen radikalleri indirgenmiş azot bileşikleriyle yükseltgendiği gösterilmiştir (107). Green ve arkadaşları idrarla atılan NO_3 miktarının düşük NO_3 alımı şartları altında alınan miktarın 4 katı olduğunu gösterdiler. $^{15}\text{NO}_3^-$ ile yapılan çalışmalar NO_3 'ün endojen biyosentezinin idrardaki aşırı NO_3 'ün kaynağı olduğunu göstermişlerdir. $^{15}\text{NO}_3^-$ verilerinin analizi ağızdan alınan NO_3 'ün yarısının idrar NO_3 'üne dönüştüğünü göstermişlerdir (31). NO 'nun son metabolitleri bazı faktörler tarafından etkilenmektedir. Bunlar atmosfer NO_x bileşiklerinin inhalasyonla alınması (61) ve üre döngüsüdür (112). Yapılan bir çalışmada NO_x düzeylerinin yaşa bağlı olarak arttığı ve genç yaştaki kadınlarda aynı yaştaki erkeklere göre NO_x düzeyleri daha düşük olduğu gösterilmiştir (103).

3.1.1.Nitrik oksitin fizyolojik etkileri ve fizyopatolojik süreçlere katılımı

NO'nun vasküler, immün ve nöronal sinyal molekülü olmasının yanı sıra anti-bakteriyal, anti-viral davranışları da vardır ve proinflamatuvar olayları down- regüle eder (94) . NO platelet ve nötrofil aggregasyonunu inhibe eder (57). NOS inhibitörü olan N^G nitro L-arjinin metil esteri (L-NAME) ve L-arjininin platelet ve lökosit adhezyonunu artırdığı gösterilmiştir (87). Bu çalışmalar kedi postkapiller venülü (56) sıçan mezenterik venülleri ve kedi koroner damarları (9) gibi çeşitli dokularda çalışılmıştır. İnsan damarlarında monosit ve granülositlerin adhezyonunun yapısal NOS (cNOS)'un uyarılmasını takiben azaldığı gösterilmiştir (8). Santral sinir sisteminde ve de periferel sinirlerde NO katekolaminlerin salgılanmasından sorumludur (21). NO hem kendi başına hem peroksinitrit oluşturarak hem de süperoksit ile kombine olarak transmitter salınımındaki artışı etkileyebilir (52). NO'nun vasküler tonusun sağlanması platelet inhibisyonu, nötrofil agregasyonu ve adezyonun inhibisyonu düz kas hücrelerinin proliferasyonunun durdurulması gibi vazoreaktif özellikleri vardır (97). Ayrıca NO barsakta splanik kan akımını (41), motiliteyi (89) ve iyon transportunu da düzenlemektedir (88).

3.1.1.1. Nitrik oksit ve dolaşım sistemi

NO 100 mikrometreden daha uzaktaki dokulara difüze olmasına rağmen dolaşımdaki eritrosit hemoglobini ile birleştiği gösterilmiştir (59). Hemoglobinin hücre içinde NO'nun yeniden girmesini büyük oranda azaltacağı için NO üreten bir hücrede NO nun dahili konsantrasyonu azalabilir. İzole edilmiş hücrelere yerleştirilmiş mikroeletrotlarla ölçüldüğünde, endotelyumun guanilat siklazın

aktivasyonu için gerekenden 10-40 kat daha fazla NO üretilbildiği gösterilmiştir (100). Üretilen NO daha sonra düz kas hücrelerine difüze olur. NO'nun kandaki yarı ömrü 0.05-1.8 ms olarak hesaplanmıştır (63). *İn vitro* ortamda NO ile serbest hemoglobinin kombinasyonu hemen hemen anlıktır (13). 19 °C de NO'nun $Hb_4(NO)_4$ den disosiasyon yarı ömrü pH= 9 da yaklaşık 8 saat pH=6 da 3 saattir (28). Aynı zamanda S-nitrozohemoglobin oluşumu β subunitinin $\beta 93$ sistein ile NO'nun reaksiyonu O_2 ' ye bağlıdır ve oksijenlenmeyi kolaylaştırır. Halbuki deoksijenasyon S-NO-Hb de NO grubunun salgılanmasında allosterik bir transisyona eşlik eder (47). *İn vitro* oksihemoglobin küçük fraksiyonlarda NO metabolizmasının diğer ara ürünü peroksinitrit ile reaksiyona girer (94). NO_2^- methemoglobineminin etken bir faktörüdür. Plazmada NO' nun hemen hemen tamamı NO_2^- 'ye yükseltgenir ve birkaç saat boyunca dengede kalır (93,49). NO_2^- kanda hızlıca NO_3^- 'e dönüşür. Aerobik şartlar altında NO_2^- tarafından hemoglobinin oksidasyonu, hemoglobinin dioksijen bağlanmasıyla NO_2^- formundan yavaş bir şekilde tek elektron transferi yoluyla meydana gelir. Gerek süperoksit anyonu peroksit, azot dioksit, peroksinitrit iyonu gerekse serbest bir methemoglobin radikalinin sonradan ortaya çıkan hızlı bir otokatalitik mekanizmasını kapsadığı varsayılır (55). *İn vitro* araştırmalarda bu mekaniğin *in vivo* uygunluğu son yıllarda $^{13}NO_2^-$ 'nin intratekal uygulanan sıçan veya farelerde ^{13}N nin %70 lik kısmının $^{13}NO_3^-$ 'e dönüştüğü %27 sinin ise $^{13}NO_2^-$ olduğu doğrulanmıştır. Bu dönüşümün yeri eritrositlerin içidir ve tavşanlarda dönüşüm hızı farelerden daha yavaştır (83). $NaNO_2$ çözeltisi i.v. olarak tavşana injekte edildikten sonra tavşanlarda NO_2 konsantrasyonu hızla azalmıştır (81). İnsan kanına 5 μM NO_2^- ilave edildiğinde yaklaşık 10 dakika içinde NO_3^- e dönüşür (49). İnsanda NO_2^- 'nin yaklaşık yarı ömrü 110 sn dir. Bu dönüşüm pH a sıcaklığa bağlı iken serbest hemoglobin miktarına bağlı değildir (49,93). Plazma NO ve N-

oksitlerin metabolik yolağı kırmızı kan hücrelerinde oldukça farklıdır. İnsan plazmasına NO veya NO_2^- ekspozite edildiğinde askorbik asit, ürik asit ve en önemli olarak da protein tiyolleri gibi antioksidanların hızlı bir şekilde kaybı meydana gelir (37).

NO vasküler düz kas cGMP üretimini uyarır ve anjiyogenezini artırır. Çözülebilir guanilat siklazın doğrudan nitrozilasyonu, vasküler düz kas hücrelerindeki cGMP yi artırır. Ca^{+2} çıkışını artırır ve de Ca^{+2} girişini önleyerek vazodilatasyon yapar. Bu olaylar sonucunda periferik kan akımı artar ve hem sistemik hem de pulmoner vasküler yollarda hipertansiyonun zayıflamasına katkıda bulunur (2).

NO'nun antiateroskleroz özelliğı, hücre içi oksidatif stresi azaltması ayrıca aterogenezis sinyal prosesinin erken inhibisyonuyla meydana gelir. Bu sinyal prosesinin inhibisyonu oksidatif enzimlerin down-regülasyonuna, lökosit akümüülasyonunun azalmasına ve de vasküler düz kas hücre proliferasyonunun ve migrasyonunun inhibisyonuna yol açar (2).

Bu olay platelet içindeki cGMP'nin uyarılmasıyla meydana gelir. Platelet aktivasyonu ve yapışmasını regüle eden proteinler fosforillenir. Ayrıca plateletlerde de az miktarda NOS vardır (2).

Serum NO_x düzeyleri konjeksif kalp yetmezliğı (108) ve karaciğer şirozunda artar (36). Takashi ve ark. herhangi bir ilaç kullanmayan ofis çalışanlarında cinsiyet, yaş ve ateroskleroz faktörü ile plazma NO_x konsantrasyonunu araştırdıkları bir çalışmada NO_x düzeylerinin kadınlarda, erkeklere oranla daha düşük olduğunu ve sadece kadınlarda cinsiyete bağılı olarak NO_x düzeyinin arttığını gösterdiler (100).

Primer Reynauld fenomeninde, portal hipertansiyonlu hastalarda variceal ligasyon transesophageal den sonra serum NO_3^- de hızlı bir düşme vardır (30).

3.1.1.2. NO ve sinir sistemi

Beyinde nNOS birkaç nörotransmitterle ko-lokalizedir. Serebral kortekste bulunan nNOS; somatostatin, nöropeptit Y ve gama aminobutirik asit (GABA) içeren hücrelerle ko-lokalizedir. Oysa beyin sapının pedunculo pontie tegmental nükleusunda kolin asetil transferaz ile ko-lokalizedir. (20,19) Travma, serebral iskemide ve nöronal hastalıklar gibi patolojik durumlarda eNOS ve cNOS un arttığı; nöronal hastalıklarda da iNOS'un indüklendiği gösterilmiştir (20,19).

Beyin hasarı olan hastalarda serebrospinal sıvısındaki NO_x düzeylerinin arttığı fakat plazma ve idrar serum düzeylerinin intratekal NO üretiminin belirleyicisi olarak kullanılmayacağı gösterilmiştir (90).

3.1.1.3. Nitrik oksit ve gastrointestinal sistem

İnsan salyasında NO₃⁻ konsantrasyonu 200-600 µM aralığında NO₂⁻ konsantrasyonu da 30-210 µM aralığında bulunmuştur (33). İnsanda salya içindeki NO₃⁻ 'ün NO₂⁻ 'ye bakteriyel olarak indirgenmesi pH' ya, O₂ içeriğine ve bakteriyel floranın karakterine bağlıdır (65). Dil barınağının dorsal yüzeyinde birden fazla ortamda yaşayabilen anaerobik bakteriler bulunmuştur (70). Tükürük NO₂⁻ konsantrasyonu sindirimle alınan NO₃⁻ miktarıyla doğru orantılıdır. Ağızdan alınan NO₂⁻ midedeki asitle dimerizasyon ve dehidratasyonla N₂O₃'e dönüşür. Bu üründe potansiyel olarak NO ve NO₂⁻ 'ye dönüşür (65). Son yıllarda gastrik NO konsantrasyonunun yaklaşık 16 ppm olduğu gösterilmiştir. Bu değerin 2 mmol KNO₃' ün oral alınımından sonra yaklaşık 6 kat arttığı gösterilmiştir (70). Oral alınan NO₂⁻'nin bir kısmı ince barsağa taşınarak orada NO₃⁻ 'e oksitlenir (65). Mide de NO₃⁻ geri alımı ya çok az miktardadır yada hiç yoktur. Gastrointestinal lümende

NO_3^- ün geri alımı öncelikli olarak ince barsakta meydana gelir. Bununla birlikte NO_3^- ün bir kısmı intestinal tüp veya kana ters difüzyonla geçerek intestinal alana az miktarda ulaşabilmektedir (101). Oral alınan NO_3^- ün yaklaşık %45-50 si vücutta metabolize edilir (95).

Serum NO_x 'i tripanozomazisde artar. Plazma NO_x i collagenous kolitisli hastaların küçük bir kısmında artmıştır. Yine ülseratif kolitisli veya Crohn hastalığında NO_2^- üretimi yaklaşık 4-8 kat artmıştır. Kronik atrofik gastritisli hastaların mide sıvısında NO_2^- konsantrasyonunun arttığı bulunmuştur. Serum NO_2^- düzeyi romatoid artrit ve osteoartritisli hastalarda artmıştır (30).

İnfektif gastroenterisli hastalarda plazma NO_3^- miktarının anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (82). İnflamatuvar barsak hastalığı olan kişilerde (53) ve gutlu hayvan modellerinde NO ve metabolitlerinin arttığı bulunmuştur (73). Yapılan bir çalışmada akut dizanterili çocuklarda NOS aktivitesinde artma ve 7-10 gün sonra da bir azalma bulunmuştur (85). Yine kolitisli hastalarda sessiz peryod esnasından ziyade aktif hastalıkta serum NO_2^- düzeyinde anlamlı bir yükselme bulunmuştur (97). iNOS ve eNOS genlerinin dizanterili hastaların kolonik mukozasının epitelial hücre yüzeyinde eksprese edilir. Bu genin ekspresyonu nekahat döneminden ziyade akut hastalık esnasında daha fazla belirgindir (45). Kolerada da, akut hastalık esnasında NO_2^- ve NO_3^- konsantrasyonunda da anlamlı bir artma bulunmuştur (85).

Hirshprung hastalığı intestinal sinir liflerindeki düşük nNOS ile ilgilidir. Çeşitli durumlardaki hepatitler karşılaştırıldığında, serum NO_2^- kontrolden daha azdır.

3.1.1.4. NO ve solunum sistemi

Oda sıcaklığında NO ile O_2 hızla NO_2 oluşturmak üzere reaksiyona girerler. Bu reaksiyonun hızı sıcaklık düştükçe yavaşlar. Bu bulgular respiratuvar bölgede

NO'nun patofizyolojik ve farmakolojik uygunluğu için önemli sonuçlara sahiptir. N-oksitlerin inhalasyonla vücuda girdikten sonra akibetinin ne olduğunu anlamak için normal olarak suda ve oksijensiz ortamda verdiği reaksiyonları bilmek önemlidir. Oksijen yokluğunda NO_2 N_2O_4 'ü oluşturmak üzere dimerleşir sonra NO_2 ve NO_3 'e dönüşür. Oksijen varlığında NO_2 ortamda NO'nun aşırı bulunması nedeniyle N_2O_3 'ü oluşturur sonra da NO_2 'ye hidrolizlenir (51,24). NO'nun respiratuvar bölge ve pulmoner dolaşımında 3 büyük fizikokimyasal özelliği tanımlanmıştır. Bunlar yeni tanısal ve terapötik yaklaşımların gelişmesine yol açmıştır. Bunlar:

1. Düşük konsantrasyonlarda ve gaz fazında NO ve O_2 nin aşırı düşük kinetiği
2. Yüksek difüzyon kapasitesi
3. NO' nun HbO_2 ile hızlı reaksiyonu

Bu faktörlerin hepsi NO'nun sistemik yan etkilere neden olmadan hızla akciğerlerden uzaklaşmasına yol açar (68). Son veriler inhale olarak uygulanmış NO'nun sistemik yan etkilerinin platelet fonksiyonlarının inhibisyonu sol ventrikül performansının azalması gibi olayların meydana gelebileceğini göstermektedir (38). Bunun yanı sıra NO' nun yarı ömrü kısa olduğundan dolayı bu etkilerin direkt kendisi değil de S-nitroalbumin ve S-nitrozohemoglobin aracı olarak kullanabileceğini belirten çalışmalar da vardır (47). NO' yu; CO nun yerine alveoler kapiler difüzyonu test etmek için bir gaz olarak sunulmuş ve halen kullanılmaktadır (11,71).

3.1.1.5. NO ve üriner sistem

İnsan idrarında NO en son NO_3^- 'e dönüşür ve glomerulide filtre edilerek renal tubuluslarda reabsorbe edilir. İdrardaki NO_3^- konsantrasyonu yaklaşık 250-2000 μM arasındadır (33). Glomerular hasarda NO'nun kompleks bir rolü olduğunu gösteren

alışmalar vardır (26). NO, glomerular hemodinamiğin düzenlenmesine katkıda bulunur. NO retimi kronik olarak bloke edildiğinde glomerular sikleroz oluşur (6). Antiglomeruli temelli membran glomeruli nefritisindeki, glomerulide iNOS ekspresyonu artmaktadır. Burada iNOS un inhibisyonunun daha kötü sonuçlar doğuracağı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (64). Yapılan bir çalışmada proliferatif glomerulonefritisin anti THY-1 modelinde hasarın indüksiyonunu takip eden ilk 24 saat içinde NO₂⁻ atılımında artış bulunmuştur (79).

İdrarda NO₂⁻ konsantrasyonunun yükselmesi üriner bölgede infeksiyon olduğunu gösterir. Bunun için test stripleri uzun zamandan beri kullanılmaktadır.

3.1.1.6. NO_x ve immün sistem

Plazma NO₂ değerinin immün sistem aktivasyonu için önemli bir ipucu olduğu belirtilmiştir. Sitokinler, büyüme faktörleri ve endotoksinler gibi çeşitli immün faktörler tarafından uyarılabilen iNOS' un aktivasyonu ile makrofajlar (40), nötrofiller, hepatositler, düz kas hücreleri, endotelial hücreler ve kardiyomiyositlerde de önemli derecede NO sentezinin olduğu gözlemlenmiştir (12). Makrofajların bakterisid ve tmorosid etkinliği için NO gereklidir.

Endotoksin uygulanan deney hayvanlarında immün sistemin aktivasyonuna bağlı olarak plazma NO₂ değerleri yaklaşık 20 kat artmaktadır. Lipopolisakkaritlerin sıçan ve farelerde plazma NO_x değerlerini arttırdığı gösterilmiştir. İmmun sistemin uyarılması ile eklemlerdeki sinoviyal sıvıda NO₂ değeri serumdakinden daha yüksek olduğunun belirlenmesi, serum NO₂ düzeyinin bir kısmının eklemlerden orjin aldığını düşündürmektedir. Serum NO_x düzeyi bazı kanser terapileri sırasında interferon ve interlkinlerin etkilerinin belirlenmesinde yardımcı olabilir. İmmünolojik anomaliye bağlı sistemik bir hastalık olan Kawasaki hastalığında, idrar

NO_x değeri normalden daha yüksek bulunmuştur (30). iNOS aktivasyonuna bağlı olarak sentezlenen NO düzeyi artrit, greft reddi, diyabet, ateroskleroz ve septik şok gibi birçok hastalığın patofizyolojisine katkısı olan immünolojik cevaplarla da ilgili olduğu belirtilmektedir (76).

3.1.1.7. NOS İnhibisyonu

Parakrin bir vazodilatör olan NO'nun vasküler tonus ve miyokardiyal kontraktiletiği regüle ettiği ve platelet agregasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. Bununla beraber hipertansiyon ve aterosklerozun gelişmesinde kritik rolü olabilir. NO sentezi L-NAME, N^ω Nitro-L-arjinin (L-NNA) gibi çeşitli kimyasallarla inhibe edilebilir. L-NAME nin kronik uygulaması sistolik kan basıncını artırırken kalp ağırlığı ve böbrek fonksiyonları azaltır. Gebelik esnasında sıçanlara kronik L-NAME uygulanması insanlardaki pre-eklempi benzeri bir sendrom gelişmesine neden olabilir.

3.2. Ölçüm metodları

Vücut sıvılarında NO₃⁻ ve NO₂⁻ düzeyleri çeşitli yöntemlerle ölçülmektedir. Bunlar arasında elektron magnetik rezonans spektroskopisi, luminal/hidrojen peroksit kemiluminesans, lazer indüklü floresans, ozon-NO arasında gaz fazında gerçekleşen kemiluminesans reaksiyonuyla ölçüm vardır. (110).

NO₃⁻ ve NO₂⁻ 'i indirgemek için bakteriyel nitrat redüktaz (10) ın yanı sıra kadmiyum (14) ve vanadyum gibi metaller kullanılır (111).

3.2.1. NO metre cihazı

Bu cihazla kullanılan elektrotları yapılarına göre 3 başlık altında toplayabiliriz.

- 1.Klorofen, nitroseliloz ve silikon gibi gaz geçirgen membranlarla klark sensorlerinin kaplanmasıyla oluşur.
2. Elektrot yüzeyi selüloz asetat veya nafion gibi bir maddeyle kaplanır.
veya nafion/NO selektif membran kombinasyonu veya iletken olmayan modifiye polimerler kullanılır.
- 3.Diğer elektrotta metaloporfirin modifiye elektrot olup palladyum modifiye elektrotlardır (110).

3.2.2. Elektron paramanyetik rezonans spektrofotometresi

NO kanda bulunan hemoglobinle birleşerek nitrozohemoglobini oluşturur (Hb-NO) (29). Bu bileşik doğrudan elektronparamanyetik rezonans (EPR) ile ölçülür. Hb-NO bileşiğini EPR ile ölçmek için bir tuzak madde kullanılır. Bu tuzak madde dietilditiyokarbamat (DETC) ve demir iyonu kompleksidir (77). Burada DETC-demir ile NO reaksiyona girer ve mononitrozil-demir bileşiği oluşur. Bu bileşikte EPR de bir triplet sinyal ile karakterize edilir. Bu yöntemin dezavantajları ticari tuzakların eksikliği, özelleşmiş operatör ihtiyacı, bazı redoks türleri ile olan etkileşimleri sayabiliriz (114).

3.2.3. Ultraviyole görünür bölge spektrofotometresi

Temel: Lambert–Beer yasasına göre maddenin monokromatik ışığı absorblamasıdır.

$$\text{Log} I_0/I = A = \epsilon LC$$

I_0 : Başlangıç ışığının miktarı

I: Maddeyle etkileşen ışık miktarı

ϵ : Molar absorpsiyon katsayısı

L: Kullanılan küvetin uzunluğu

C: Çözeltinin konsantrasyonu

Spektrofotometrede NO_2^- 235 ve 274 nm de absorpsiyon yapar. Ölçümler NO_2^- nin çeşitli türevleri hazırlanarak yapılır.

3.2.3.1. Asit ölçümü

Fenol türü içeren bir çözelti (2 ml 20 mM) 1cm uzunluğunda bir kuvarz tüpe konur. 100 ml 0.1 M HCl ilave edilir. 10-100ml 1mM NaNO_2 eklenerek çözelti karıştırılır. Sonra uygun nitrozo fenol türevinin oluşmasından sonra 300-320 nm dalga boyu aralığında ölçüm yapılır. Burada üç çeşit fenol türevi kullanılır.

1. Floroglusinol ile reaksiyon reaksiyon 2 dakika içinde tamamlanırken fenolun kendisi için birkaç saati bulur. İdeal şartlarda en hızlı reaksiyon 3 hidroksi grubuyla olur.

3.2.3.2. Alkali ölçüm:

Nitrozo bileşiğinin üzerine 100 μ l 1M NaOH ilave edilir. Sonra nitrozo fenolat türevinde rezolsinol için 352 nm ve fenol için 400 nm dalga boyunda ölçülür. Nitrozo fenolat iyonunun sinyal büyüklüğü değişmeksizin 24 saat mükemmel bir denge gösterir.

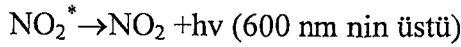
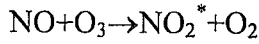
3.2.3.3. İyon kompleks ölçümü

Fenol grubuna orto pozisyonunda bağlı nitrozo fonksiyonelinin bulunması durumunda bu bileşik metallerle kompleks oluşturularak da spektrofotometreyle

ölçüm yapılabilir. Kullanılan metaller Cd^{+2} , Co^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Ni^{+2} , Zn^{+2} nin 0.1-1,5 mM ilavesiyle ölçüm yapılır (46).

3.2.4. Kemiluminesans:

Ozonda bulunan kemiluminesans ile hava örneğindeki NO ölçümü için dizayn edilmiştir.



Fotonlar 600 nm nin altında bir durdurucu ile kırmızı duyarlı fotomultipler ile belirlenir. NO içeren gaz giriş akımı doğrudan NO_2^* nin çarpışma ile deaktivasyonunu minimize etmek için, düşük basınç altında fotomultiplerin önünde O_3 ile karıştırılır. Bu teknik gaz fazındaki NO ölçümlerinde en büyük girişimci olan NO_2 ye duyarsızdır. Nitrozotiyol ve nitrozohemoglobin gibi NO nun kimyasal olarak bağlı olduğu bileşikler önce saflaştırılır, sonra kimyasal olarak NO serbest bırakılarak ölçüm yapılır. Bu yöntem gaz fazı için oldukça duyarlı ve hassastır. Fakat cihazın büyüklüğü, harcanan zaman, cihazın fiyatı, bazı kimyasallar gerektirmesi gibi dezavantajları vardır (114).

3.2.5. Elektroforez

Doğru akım uygulanan bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin diferansiyel göç hızına dayanan bir ayırma yöntemidir. İnorganik anyon, katyon, aminoasit, katekolamin, ilaçlar, vitaminler, karbonhidratlar, peptit, protein, nükleik asit, nükleotit, polinükleotit tayinlerinde kullanılır. Kapiller ve tabaka elektroforez olmak üzere ikiye ayrılır.

Kapiller elektroforez oldukça hızlı ve 0,1 ile 10 nanolitre hacmindeki numunelerde ayırım yapabilirken tabaka elektroforez mikrolitre düzeyinde ayırım yapabilir.

3.2.5.1. Misellar elektrokinetik kapiler kromatografisi

Bu yöntem yüksüz maddelerin ayrılmasını sağlamak amacıyla geliştirilmiştir. Misel oluşturacak bir derişimde çözeltiye sodyum dodesil sülfat gibi yüzey aktif maddelerin ilavesi gereklidir. Uzun hidrokarbon zincirli iyonların derişimi kritik misel derişiminin üstüne çıktığında misel oluşur. Sodyum dodesil sülfatla oluşturulan misellerin yüzeyi büyük oranda (-) yüke sahip olduğundan (+) elektroda doğru hareketi daha fazla olur. Tampon çözeltilerin çoğu (-) elektroda doğru yüksek bir elektroosmotik akışa sahiptirler. Anyonik misellerde daha düşük bir hızla aynı yöne hareket ederler. Bu sisteme numune ilave edildiğinde numune bileşenleri sulu faz ve miselin iç kısmı olan hidrokarbon fazı arasında dağılır. Kapiller elektroforezle serum, plazma ve idrarda NO_2^- ve NO_3^- ölçümü yapılmaktadır. NO_2^- ve NO_3^- 4-22 dakika gibi kısa bir sürede ölçülür. Her iki iyonda ultrafiltrasyon işleminden sonra tek injeksiyon ile belirlenir.

3.2.6. Kütle spektrofotometresi-gaz kromatografisi

Karışımındaki bileşenlerin nicel analizi için kullanılan bir yöntemdir. Örnek önce kromatografiden geçirilerek ayrılır sonra kütle spektrofotometresinde ölçüm yapılır. Yani kütle spektrofotometresi gaz kromatografisinin dedektörü olarak kullanılır.

Bir karışımında gaz halinde bulunan veya kolayca buharlaşabilen bileşenleri bir birinden ayırmak için kullanılır. Burada bir sabit faz birde hareketli faz vardır. Maddeler sabit faza bağlanmalarına göre ayrılırlar.

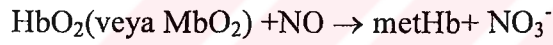
Kütle spektrofotometresiyle atom veya moleküllerden gaz fazında iyonlar oluşturulur. Bu iyonlar kütlelerine göre bir birinden ayrılarak kaydedilir.

3.2.7. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

Sabit fazın bir dolgu maddesi üzerine yayılmış bir sıvı film olarak uygulandığı kromatografi çeşididir. Kolonlara yüksek basınç uygulandığı (100-200 atm) sıvı sıvı kromatografi çeşidine de yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) denir. HPCL ile plazmada ölçüm yapılırken önce ultrafiltrasyon yapılması veya proteinlerin çöktürülmesi gerekir. Sonra kromatografiye özel hazırlıklar yapılır.

3.2.8. Kolorimetre

NO hemoglobinin (Hb) demir atomu merkezine bağlandığında ters soret bandı oluşur. Oluşan bu band NO' nun kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılır.



Oksihemoglobin veya oksimiyoglobinin nitrozasyonu, stok çözeltilerde NO konsantrasyonunu bazı özel örneklerde NO' nun direkt ölçümleri için kullanılabilir. Bu metodun en önemli sakıncası oksihemoglobin veya oksimiyoglobinin ticari saflığındaki eksikliklerdir. Bunun için ekstra saflaştırma gereklidir (114).

3.2.9. Florimetre

Floresan ajanları olarak en genel amino grup komşusu olan bileşikler kullanılır. NO, N-nitrozilleyici ajanlarla triazol oluşturmak için reaksiyona sokulur. İlk kullanılan ajan 2,3 diamino naftalendir (DAN). NO ile DAN reaksiyona girdiğinde 2,3 naftotriazol oluşur. Oluşan bu maddenin floresan değeri 100 kat daha fazladır. DAN kullanıldığında açığa çıkan NO sıvı kromatografisine bağlı floresan dedektörü

ile görüntülenir. DAN kullanılmasının en büyük sakıncası; ajanın hazırlanması, NO_2^- girişimlerine bağlı olarak düşük pH da selektivitenin kaybı ve zaman harcanmasıdır. Daha sonraları NO belirlemek için diaminofloresan kullanılmaya başlandı. Bu maddenin yüksek pH ya bağımlılığı ve ciddi girişimler yaptığı sonradan bulunmuştur (114).

3.2.10. Diğer metodlar

Burada raportör hücreler kullanılır. Bu hücreler NO' nun aktive ettiği guanilat siklaz içeren hücrelerdir. Bu hücreler plateletler, LLC-PK1(böbrek epitelyumu) RLF-6 (fibroblastlar) dır. Guanilat siklaz enzimi uyarılırsa hücreler cGMP üretir. Üretilen cGMP radyoimmünoassayla ölçülür.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Denekler

Bu çalışmada 76 adet erkek Wistar albino türü sıçan denek olarak kullanıldı. Bu çalışmanın prosedürleri ve protokolu Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul düzenlemelerine uygun olarak yapıldı. Sıçanlar 22-24 °C ve düzenli 12 saat ışık alan kontrollü sabit ortamda barındırıldı. Standart yem ve su serbest bırakıldı.

4.2. Gruplandırma ve deneysel prosedür

Denekler öncelikle 3 ana gruba ayrıldı. İlaç uygulamasından sonra farklı zamanlarda yapılan ölçümler dikkate alınarak ana gruplar tekrar alt gruplara ayrıldı.

1) Kontrol grubu(Grup C, n=10): KB ölçümü yapıldı ve kan örnekleri alındı,

2) Akut doz L-NNA ana grubu (aL-NNA, n=19) ve alt grupları. Bu ana grubda deneklere yapılan ilaç uygulaması aynıdır, ancak ölçümlerin zamanları farklıdır. Bu ana grubun deneklerine KB ölçümlerini takiben tek doz L-NNA (25 mg/kg i.p.) uygulamasından 1 (Grup aL-NNA₁, n=4), 3 (Grup aL-NNA₃, n=9) ve 24 (Grup aL-NNA₂₄, n=6) saat sonra tekrar KB ölçümü yapıldı ve kan örnekleri alındı,

3) Kronik düşük doz L-NNA ana grubu (dL-NNA, n=19) ve alt grupları. Bu ana grubda deneklere yapılan ilaç uygulaması aynıdır. Bu ana grubun deneklerine KB ölçümünü takiben 2 hafta süreyle her gün L-NNA (içme suyunda %0,014 konsantrasyonda) uygulandı. Deneklerin günlük su tüketimi ölçüldü ve günde yaklaşık 16 mg/kg L-NNA uygulandığı hesaplandı. Yedinci ve 14. günlerde KB ölçüldü. Ana grubun alt gruplarına süre sonunda (Grup dL-NNA₀, n=7), ilaç uygulaması kesildikten 24 (Grup dL-NNA₂₄, n=6) ve 48 (Grup dL-NNA₄₈, n=6) saat sonra tekrar KB ölçümü yapıldı ve kan örnekleri alındı,

4) Kronik yüksek doz L-NNA (Grup yL-NNA, n=28) grubu. Bu gruba KB ölçümünü takiben 2 hafta süreyle her gün L-NNA (içme suyunda ≈ 47 mg/kg, %0,0464 konsantrasyonda) uygulandı ve 7. ve 14. günlerde tekrar KB ölçümü yapılarak 14.günde kan örnekleri alındı.

4.3. Kan basıncı ölçümleri

Bilinci açık deneklerin sistolik kan basıncı (SKB), diyastolik kan basıncı (DKB) ve ortalama kan basıncı (OKB) kuyruktan indirekt tail-cuff metodu ile yapıldı (MAY BPHR 9610-PC TAIL-CUFF İndirect Blood Pressure Recorder). KB ölçümleri için denekler önce tek sıçanlık muhafaza edici kutulara (restainer) yerleştirildi. Restainerdeki sıçanın kuyruğuna KB ölçüm cihazının kaf ve sensörü bağlandı. Kuyruklar 38° C de 15-20 dakika ölçüm için düzenli sinyal sesi ve pulse (atım) alınana kadar MAY TWC 02 Tail Warming Controller ile ısıtıldılar. Ölçüm yapabilmek için deneğin rahat ve sakin olması beklendi. Bu yöntemle ölçüm sırasında kaftaki basınç arteriyel sistolik basıncın üzerine çıkarılır. Kaftaki basınç arteriyel basıncın üzerinde olduğu sürece arter kollabe durumda kalır ve basınç siklusu boyunca arterin alt kısmına kan akmaz. Daha sonra kaftaki basınç yavaş yavaş indirilir. Kaftaki basınç sistolik basıncın altına iner inmez kan sistolik basıncın tepe noktasında kafın altındaki damardan geçer. Bu esnada sensörden algılanan sinyal sistolik kan basıncıdır. Kafdaki basınç diyastolik basıncın altına inince damar üzerindeki basınç ortadan kalktığı için ritmik sisyal sesi alınır. Bu noktadaki basınçta diyastolik kan basıncıdır. Ortalama kan basıncı, sistolik kan basıncının %40 ile diyastolik kan basıncının %60'ının toplanması ile hesaplanır (5). Alınan tansiyon değerleri bilgisayara kaydedildi. Her denekten alınan 7 ölçümden en büyük ve en küçük değerler hesaba alınmadan 5 tansiyon değerinin ortalaması alındı.

4.4. Kan örneklerinin alınması

KB ölçümlerinden hemen sonra bütün grublardaki denekler ürethan ile (1,4 gr/kg i.p.) anesteziye edilerek sol ventrikülden kan örnekleri alındı. Anestezi altında önce abdomen sonra toraks açılarak enjektör ile apekten sol ventriküle girilerek kan alındı. Alınan kan örnekleri EDTA lı tüplere konularak 5000 g de 10 dakika süreyle santrüflendi. Plazmalar ayrılarak ölçüm yapılana kadar -20° de saklandı.

4.5. Çözeltilerin hazırlanması

Deneyler sırasında 0,1M sülfirik asit, 5mmol/lt bakır sülfat, N-naftiletilen diamin, sülfanilamid, glisin-NaOH tamponu, çinko sülfat, kör çözeltileri kullanıldı. Çözeltilerin hazırlanışı aşağıdaki belirtilmiştir.

0,1M Sülfirik asit çözeltisi: 2.8 ml derişik sülfirik asit alınıp 500 ml ye seyreltildi.

5mmol/lt Bakır sülfat çözeltisi: 1,234 gr bakır sülfat alınıp distile suda çözüldü. Sonra 1Lt ye tamamlandı.

N-naftiletilen diamin çözeltisi: 50 mg N-naftiletilen diamin alınıp bir miktar distile suda çözüldü. Son hacim 250 ml ye tamamlandı.

Sülfanilamid çözeltisi: 5 gr sülfanil amid 500ml 3M HCl de çözüldü.

Glisin-NaOH tamponu: 1,5 gr glisin hidroklorür bir miktar suda çözüldü. Sonra üzerine 2M NaOH çözeltisi ilave edilerek pH 9,7 ye ayarlandı. Sonra çözelti 1Lt ye seyreltildi.

Çinko sülfat çözeltisi: 2,156 gr çinko sülfat alınarak bir miktar distile suda çözüldü. Sonra hacim 100 ml ye tamamlandı.

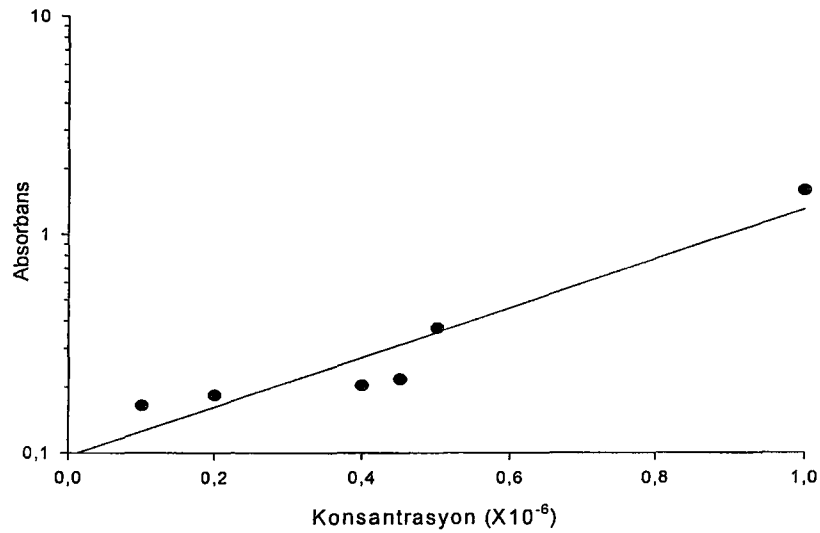
Kör çözelti: 2,5 ml distile su alındı. Üzerine 1ml sülfanil amid çözeltisi 1ml naftiletilendiamin hidroklorür çözeltisi ilave edildi.

4.6. Ölçümlere hazırlık

4.6.1. Ultraviyole ve görünür bölge Spektrofotometresi

Cihazın çalışması basamak basamak aşağıda belirtilmiştir.

1. Cihaz açıldı.
2. Dalga boyu 545 nm ye ayarlandı.
3. Kontrol panelinden transmittans 'T' seçildi.
4. Örnek haznesinin kapağı açılarak (T) değeri 0 a ayarlandı.
5. Kontrol panelinden absorbans (A) seçildi.
6. Kör çözelti ile A değeri 0 a ayarlandı.
7. Standart çözeltilerin absorbans değerleri ölçülerek kalibrasyon eğrisi hazırlandı.



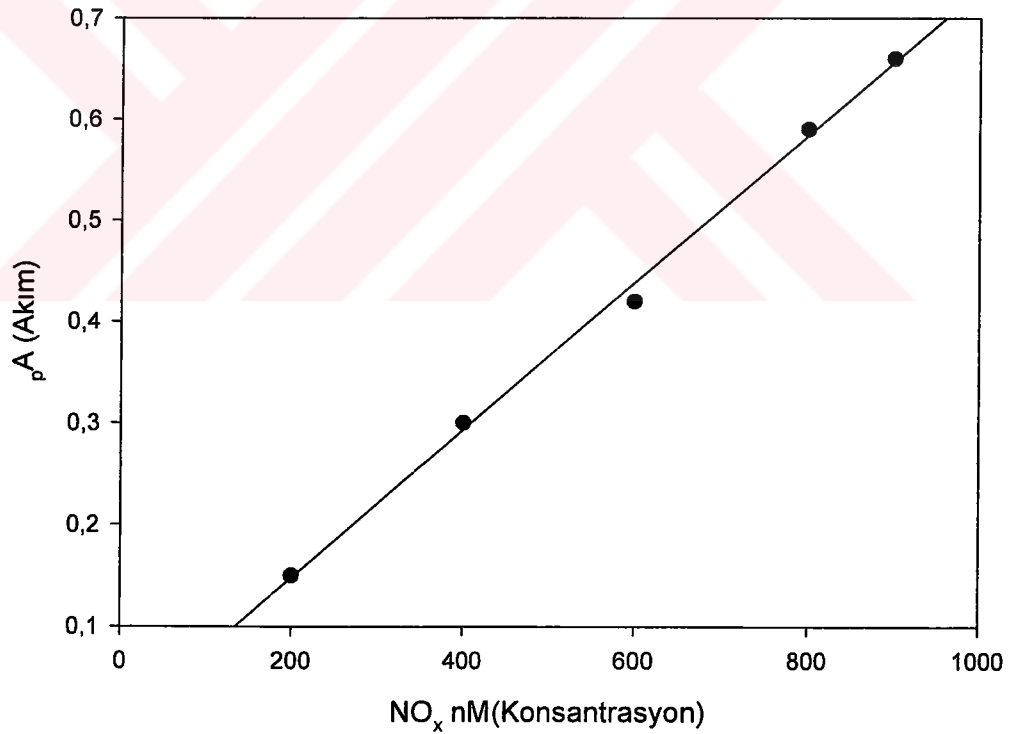
Şekil.1.1 Spektrofotometre cihazı için kalibrasyon eğrisi

$$R=0,91182098$$

4.6.2. NO metre cihazı

Cihazın çalışması basamak basamak aşağıda belirtilmiştir.

1. Cihaz açıldı.
2. Elektrot 1M doygun tuz çözeltisine konularak stabilize olması sağlandı
3. Sonra elektrot sülfirik asit+KI çözeltisine konularak dengeye gelmesi beklendi.
4. Cihazın akım değeri sıfırlandı.
5. Standart çözeltilerin akım değerleri pikoamper (pA) biriminden ölçüldü.
6. Kalibrasyon eğrisi hazırlandı.



Şekil.1.2 NO metre cihazı için kalibrasyon eğrisi

4.7. Spektrofotometre ile ölçümler

Plazmalardan 250 µl alınarak üzerine 1 ml çinko sülfat çözeltisi ilave edildi. Vortekslendikten sonra 1,250 µl (55 mmol/l) sodyum hidroksit çözeltisi ilave edildi. 3500 g de 10 dakika boyunca santrüflendi. Üstteki çözelti kısmı alınarak üzerine 2ml distile su 1 ml glisin tamponu eklenerek yıkanmış kadmiyum granüllerinin üzerine eklendi. 90 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi. 2 ml indirgenmiş numune alınarak üzerine 1 ml sülfanilamid 1 ml naftiletildiamin çözeltisi 0.5 ml distile su ilave edildi. 20-60 dakika bekletildikten sonra 545 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Numunelerin konsantrasyon değerleri, elde edilen absorbans değerlerinin kalibrasyon eğrisine yerleştirilmesiyle hesaplandı (18).

4.8. NO metre cihazı ile ölçümler

Plazmalardan 250 µl alınarak üzerine 1 ml çinko sülfat çözeltisi ilave edildi. Vortekslendikten sonra 1,250 µl (55 mmol/l) sodyum hidroksit çözeltisi ilave edildi. 3500 g de 10 dakika boyunca santrüflendi. Üstteki çözelti kısmı alınarak üzerine 2 ml distile su 1 ml glisin tamponu eklenerek yıkanmış kadmiyum granüllerinin üzerine eklendi. 90 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi. Numunelerin akım değerleri ölçüldü. Kalibrasyon eğrisinden konsantrasyonları hesaplandı.

4.9. Kullanılan kimyasal maddeler

N^o Nitro-L-arginine, N-(-1naphthyl)-etilendiamin dihidroklorid (Sigma Aldrich Inc.St. Louis, MO. A.B.D) dan; sülfirikasit, hidroklorik asit, potasyum iyodür, bakır sülfat pentahidrat, sodyum nitrit, sodyum hidroksit, sülfanil amid (Merk KGaA Almanya) dan; granül kadmiyum (Fluka Chemie, steinheim, İsviçre);

glisin hidroklorid (Sigma Aldrich İnc.St. Louis, MO. A.B.D); çinko sülfat heptahidrat Carlo Erbadan satın alındı.

4.10. İstatistik

Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak belirlendi. Ortalama kan basıncı 'Origin 5.0' istatistik programı kullanılarak Student T testi ile belirlendi. $p<0,05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



5. BULGULAR

5.1. L-NNA uygulamalarının deneklerin ağırlıkları üzerine etkileri

Deneklere L-NNA iki hafta süreyle her gün iki farklı konsantrasyonda içme suyu ile uygulandı. Deneklerin günlük su tüketimi her gün ölçülerek maruz kaldıkları L-NNA dozu hesaplandı. %0,014 ve %0,0464 konsantrasyonlarında L-NNA çözeltileri içme suyunda hazırlanarak deneklere verildi. Ertesi gün içilen su miktarı ölçülerek içilen sudaki L-NNA miktarı hesaplandı. Buna göre %0,014 konsantrasyonda L-NNA uygulanan deneklerin günde ≈ 16 mg/kg, %0,0464 konsantrasyonda L-NNA uygulanan deneklerin günde ≈ 47 mg/kg L-NNA aldıkları hesaplandı.

İki hafta sonunda kontrolle karşılaştırıldığında düşük doz L-NNA uygulanan grubun kilolarında istatistiki olarak bir farklılık meydana gelmezken yüksek doz L-NNA uygulanan grubun kilolarında anlamlı bir düşüş tespit edildi. Deneklerin ağırlıklarındaki artışlar kontrol grubunda $10,57 \pm 2,01$, dL-NNA grubunda $9,53 \pm 1,16$ ve yL-NNA grubunda ise $4,96 \pm 0,88$ olarak belirlendi.

Tablo 1. Kontrol dL-NNA ve yL-NNA gruplarının deney başlangıcı ve deney sonundaki ağırlık miktarındaki %artışlar.

Gruplar	Kontrol (n=10)	dL-NNA(n=19)	yL-NNA(n=28)
% artış	$10,57 \pm 2,01$	$9,53 \pm 1,16$	$4,96 \pm 0,88^*$

* Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$).

5.2. L-NNA uygulamasının kan basıncı üzerine etkileri

5.2.1. Sistolik kan basınçları

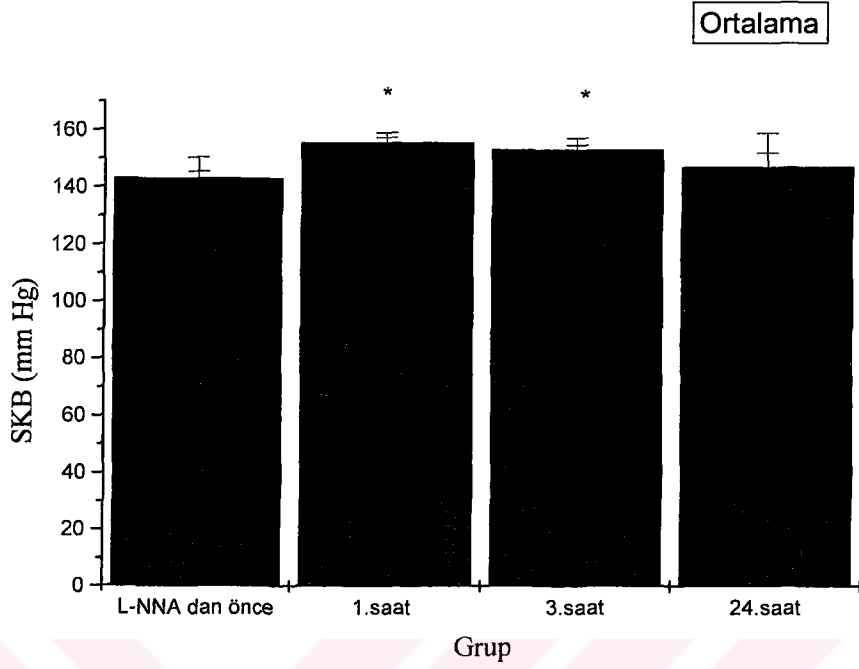
5.2.1.1. Tek doz L-NNA uygulamasının SKB üzerine etkileri

SKB, L-NNA uygulamasından 1 ve 3 saat sonra istatistiki olarak anlamlı bir şekilde yükselmiş, ancak 24 saat sonra tekrar normal değerlere gerilemiştir. Akut L-NNA grubunun 0. saatteki SKB $143 \pm 2,3$ mm Hg, 1. saatte (aL-NNA₁ grubu) $155,5 \pm 1,7$ mmHg, 3. saatte (aL-NNA₃ grubu) $153 \pm 1,5$ ve 24. saatte (aL-NNA₂₄ grubu) $147 \pm 4,8$ mm Hg olarak bulunmuştur (Tablo.2, Şekil.2.1) .

Tablo.2 Tek doz L-NNA uygulamadan önceki, uyguladıktan 1, 3 ve 24 saat sonraki SKB ve DKB değerleri

KB (mm Hg)	Grup	0.saat (n=19)	aLNNa ₁ (n=4)	aL-NNA ₃ (n=9)	aL-NNA ₂₄ (n=6)
	SKB	$143 \pm 2,3$	$155,5 \pm 1,7^*$	$153 \pm 1,5^*$	$138,8 \pm 4,8$
	DKB	$97,5 \pm 2,0$	$109 \pm 2,1^*$	$98 \pm 0,7$	$102,6 \pm 3,6$

* 0.saatte göre anlamlı olarak yüksek olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$)



Şekil.2.1 Tek doz L-NNA uygulamasının SKB üzerine etkileri

* Tek doz L-NNA uygulanmadan önceki ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$).

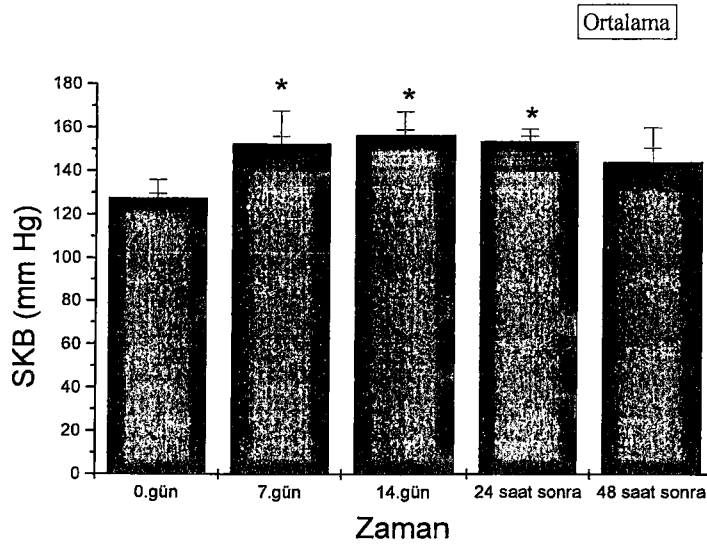
5.2.1.2. Kronik düşük doz L-NNA uygulamasının SKB üzerine etkileri

Kronik düşük doz L-NNA uygulamasının 0, 7 ve 14. günlerinde yapılan ölçümlerde SKB değerleri sırasıyla $127,9 \pm 1,9$ mm Hg, $152,5 \pm 3,5$ mm Hg, $156,6 \pm 2,5$ mmHg olarak bulunmuştur. Son doz L-NNA uygulamasından 24 saat sonra ise SKB düşmesine rağmen, bu düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Son doz L-NNA uygulamasından 48 saat sonraki SKB ise normal değerlere gerilemiş ve bu grubun başlangıç değerleriyle ve kontrol grubuyla istatistiki anlamlılık göstermemiştir. dL-NNA₂₄ grubunun SKB $153,7 \pm 2,3$ mm Hg ve dL-NNA₄₈ grubunun SKB değeri $144,2 \pm 6,4$ mm Hg olarak bulunmuştur (Tablo.4, Şekil.4.1).

Tablo.4 Düşük doz L-NNA uygulanan deneklerin 0., 7., 14. ve L-NNA uygulaması kesildikten 24 (dL-NNA₂₄ grubu) ve 48 (dL-NNA₄₈ grubu) saat sonraki SKB ve DKB değerleri.

KB (mm Hg)	Grup	İLAÇSIZ 0.gün	L-NNA 7.gün	L-NNA 14.gün	İLAÇSIZ dL-NNA ₂₄ 24.saat	İLAÇSIZ dL-NNA ₄₈ 48.saat
	SKB	127 ± 1,9	152 ± 3,5*	156 ± 2,5*	153 ± 2,3*	144 ± 6,4
	DKB	83 ± 1,5	104 ± 3,9*	114 ± 2,7*	112 ± 5,4*	98 ± 11,0*

* L-NNA uygulamaya başlamadan önceki ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğuna işaret etmektedir (p<0,05).



Şekil.4.1 Düşük doz L-NNA uygulamasının ve L-NNA uygulaması sona erdirildikten 24 ve 48 saat sonrasının deneklerin SKB üzerine etkileri

*0.gün ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğuna işaret etmektedir ($p<0,05$).

İki hafta süreyle düşük doz L-NNA uygulaması SKB' ını artırmakta, ancak bu artış son doz ilaç uygulamasından 48 saat sonra geriye dönmektedir.

5.2.1.3. Kronik yüksek doz L-NNA uygulamasının SKB üzerine etkileri

Yüksek doz L-NNA uygulaması SKB' ını 7. ve 14. günlerde istatistiki olarak artırmıştır. SKB değerleri 0.gün $137,4 \pm 2,6$ mm Hg, 7.gün $157,2 \pm 2,2$ mmHg, 14.gün $161,0 \pm 3,4$ mm Hg olarak ölçülmüştür. İlginç olarak yüksek doz L-NNA uygulanan bu grupta deneklerin SKB' ı bireysel olarak incelendiğinde 5 deneğin SKB' ının birinci haftada artmasına rağmen ikinci hafta sonunda bu artışın gerilediği ve başlangıç düzeylerinin de altına düştüğü tespit edilmiştir. SKB' ı beklenenin aksine gelişen bu 5 deneğin SKB' ları 0.gün $121,5 \pm 4,9$ mm Hg 7.gün $148,7 \pm 5,0$ mm Hg, 14.gün ise $138,7 \pm 3,2$ mm Hg olarak ölçülmüştür.

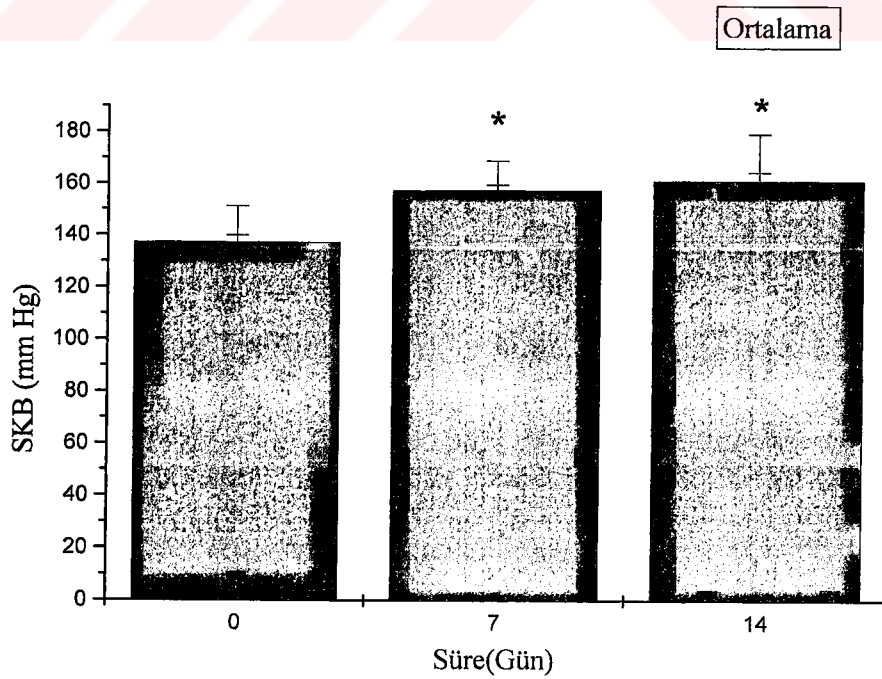
Hipertansiyon gelişen deneklerin SKB değerleri L-NNA uygulanmasından önce $141,7 \pm 2,3$ mm Hg L-NNA uygulamasından 7 gün sonra $159,5 \pm 2,2$ mm Hg ve 14 gün sonra $167,1 \pm 3,2$ mm Hg olarak bulunmuştur. Genel olarak grubun SKB değerleri arasında anlamlı bir yükselme tespit edilmiştir (Tablo6, Şekil 6.1).

Tablo.6 Yüksek doz L-NNA uygulanan grubun 0., 7., 14 günlerdeki SKB ve DKB değerleri

KB (mm Hg)	L-NNA uygulanmadan önce			L-NNA 7.gün	L-NNA 14.gün
	SKB	DKB			
	SKB		$137 \pm 1,9$	$157 \pm 2,2^*$	$161 \pm 3,4^*$
	DKB		$91 \pm 3,8$	$110 \pm 1,6^*$	$116 \pm 2,5^{**}$

* 0.güne göre anlamlı olarak yüksek olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$).

** 7.güne göre anlamlı olarak yüksek olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$).



Şekil.6.1 Yüksek doz L-NNA uygulamasının SKB üzerine etkileri

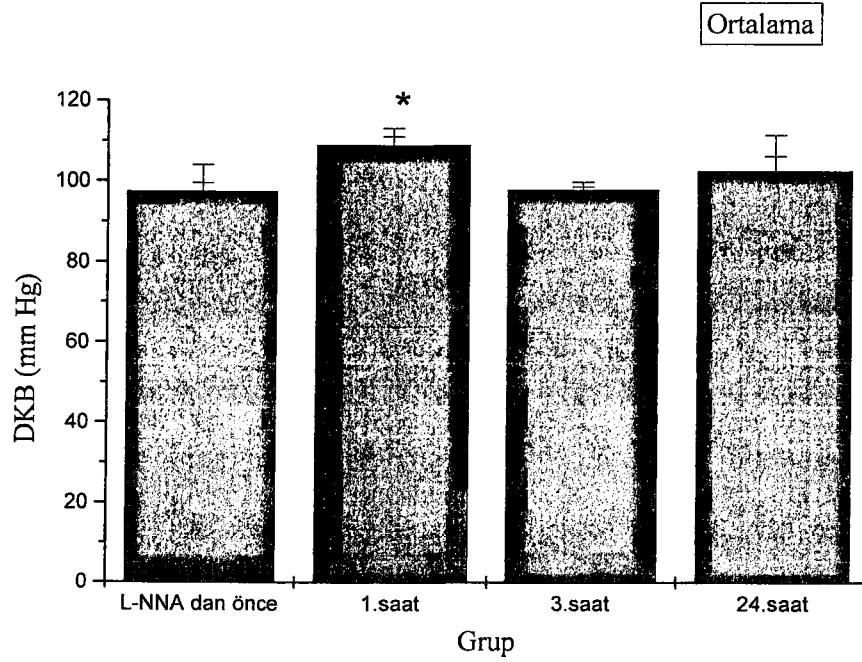
* 0.güne göre anlamlı olarak yüksek olduğuna işaret etmektedir ($p<0,05$).

İki hafta süreyle yüksek doz L-NNA uygulaması SKB' ını kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırmaktadır. Ancak 5 deneğin SKB değerlerinde 7. günden sonra bir düşüş gözlenmiştir.

5.2.2. Diyastolik kan basınçları

5.2.2.1. Tek doz L-NNA uygulamasının DKB üzerine etkileri

DKB, L-NNA uygulamasından 1 saat sonra istatistiki olarak anlamlı derecede yükselmiş, ancak 3. ve 24 saat sonra tekrar normal değerlere gerilemiştir. aL-NNA grubun DKB değeri 0. saat $97,5\pm2,0$ mm Hg, 1.saatte (aL-NNA₁ grubu) $109\pm2,1$ mm Hg, 3.saatte (aL-NNA₃ grubu) $98\pm0,7$ mm Hg ve 24.saatte (aL-NNA₂₄ grubunu) $102,7\pm3,6$ mm Hg olarak bulunmuştur (Tablo.2, Şekil.2.2).



Şekil.2.2 Tek doz L-NNA uygulamasının DKB üzerine etkileri

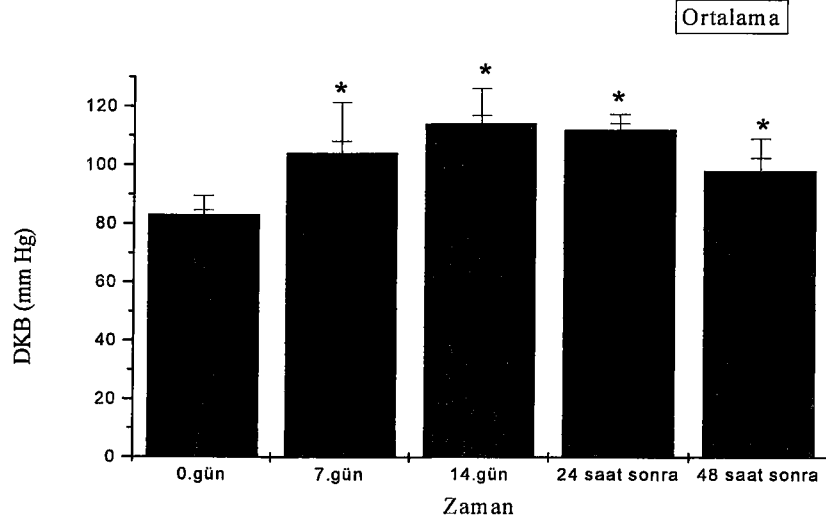
* L-NNA uygulanmadan öncekiyle karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğuna işaret etmektedir ($p<0,05$).

Akut doz L-NNA uygulamasından bir saat sonra DKB'ı yükselmiş fakat 3.ve 24. saatlerde normal değerlere gerilemiştir.

5.2.2.2. Kronik düşük doz L-NNA uygulamasının DKB üzerine etkileri

Kronik düşük doz L-NNA uygulamasının 0, 7 ve 14. günlerinde yapılan KB ölçümlerde DKB değeri 0. gün $83,1 \pm 1,5$ mm Hg, 7.gün $104,2 \pm 3,9$ mm Hg ve 14. gün $114,3 \pm 2,7$ mm Hg olarak bulunmuştur.

Son doz L-NNA uygulamasından 24 (dL-NNA₂₄ grubu) ve 48 (dL-NNA₄₈ grubu) saat sonra DKB düşmesine rağmen, bu düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. DKB değeri dL-NNA₂₄ grubu için $112 \pm 5,4$ mm Hg ve dL-NNA₄₈ grubu için $98 \pm 11,0$ mm Hg olarak bulunmuştur (Tablo.4, Şekil.4.2).



Şekil.4.2 Düşük doz L-NNA uygulamasının ve 24 ve 48 saat sonrasının deneklerin DKB üzerine etkileri

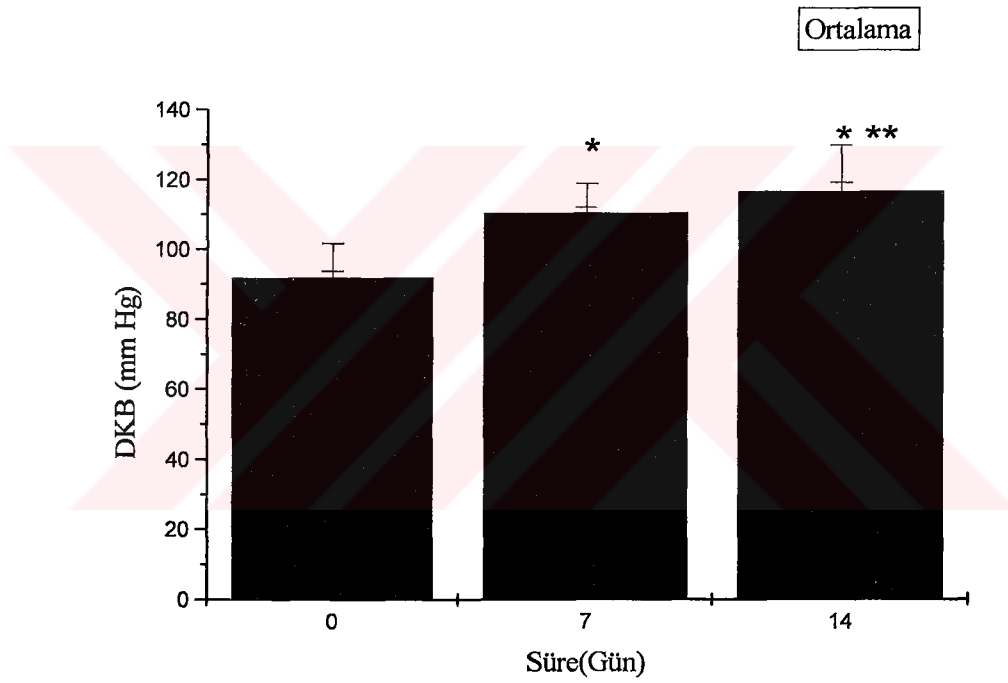
*0.gün ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğuna işaret etmektedir ($p<0,05$).

İki hafta süreyle düşük doz L-NNA uygulamasının DKB' ını istatistiki olarak anlamlı derecede artırdığı, iki haftanın sonunda ilaç uygulamasına son verildiğinde hemen düşme eğilimine girdiği ancak istatistiki olarak anlamlı bir düşüş göstermediği tespit edilmiştir.

5.2.2.3. Kronik yüksek doz L-NNA uygulamasının DKB üzerine etkileri

Yüksek doz L-NNA uygulaması DKB' ını 7. ve 14. günlerde istatistiki olarak artırmıştır. DKB değerleri 0.gün $91,8\pm1,8$ mm Hg, 7.gün $110,1\pm1,6$ mm Hg, 14.gün $116,2\pm2,8$ mm Hg olarak ölçülmüştür. İlginç olarak yüksek doz L-NNA uygulanan bu grupta deneklerin DKB' ı bireysel olarak incelendiğinde 5 deneğin SKB'da olduğu

gibi DKB' ının birinci haftada artmasına rağmen ikinci hafta sonunda bu artışın gerilediği ve başlangıç düzeylerinin de altına düştüğü tespit edilmiştir. DKB'ı beklenenin aksine gelişen bu 5 deneğin DKB' ları 0.gün $82 \pm 3,8$ mm Hg, 7.gün $104 \pm 3,6$ mm Hg ve 14.gün ise $100 \pm 2,7$ mm Hg olarak ölçülmüştür. Ancak genel olarak grubun DKB değerlerinde anlamlı bir yükselme vardır (Tablo.6, Şekil.6.2)



Şekil.6.2 Yüksek doz L-NNA uygulamasının DKB üzerine etkileri

* 0.güne göre anlamlı olarak yüksek olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$).

** 7.güne göre anlamlı olarak yüksek olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$).

5.2.3. L-NNA uygulamasının NO_x düzeyi üzerine etkileri

5.2.3.1. Tek doz L-NNA uygulamasının NO_x üzerine etkileri

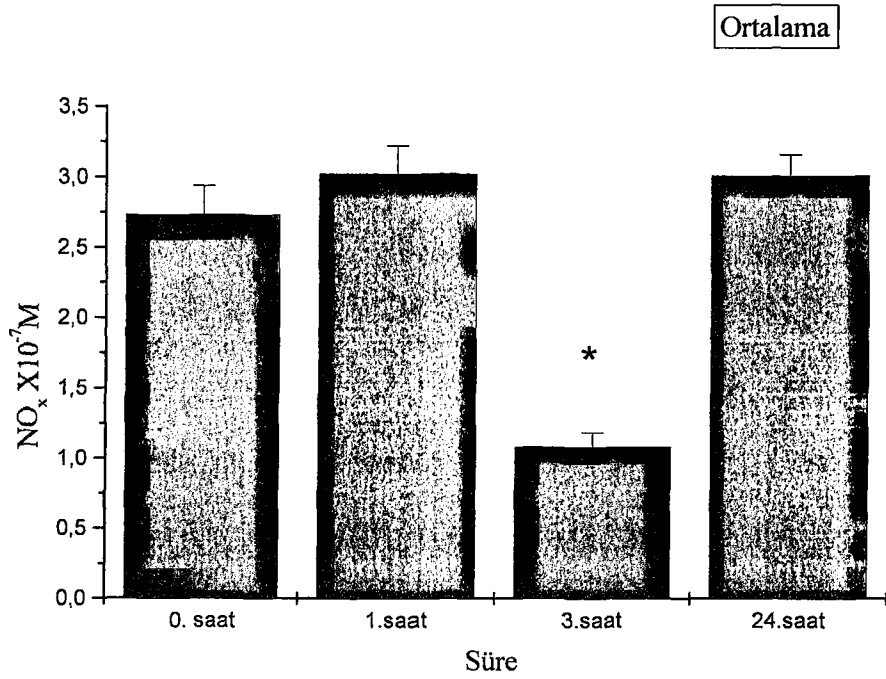
Plazma NO_x değerlerinde, L-NNA uygulamasından 1 ve 24 saat sonra alınan kan örneklerinde yapılan ölçümlerde istatistiki olarak bir fark tespit edilmemesine

rağmen 3.saatte alınan kan örneklerinde NO_x değerlerinin anlamlı olarak düştüğü görülmektedir. Kontrol grubunun NO_x değeri $2.9 \pm 0,1 \times 10^{-7} \text{M}$, L-NNA uygulamasından bir saat sonraki NO_x değeri $3,02 \pm 0,2 \times 10^{-7} \text{M}$, üç saat sonraki NO_x değeri $1,08 \pm 0 \times 10^{-7} \text{M}$ ve 24 saat sonraki NO_x değeri ise $3,01 \pm 0,2 \times 10^{-7} \text{M}$ olarak ölçülmüştür (Tablo.3, Şekil.3).

Tablo.3 L-NNA uygulamasından önce 1, 3 ve 24 sonraki plazma NO_x değerleri.

NO _x değerleri(10^{-7}M)	0. saat	L-NNA ₁	L-NNA ₃	L-NNA ₂₄
	$2.9 \pm 0,1$	$3,02 \pm 0,2$	$1,08 \pm 0,1^*$	$3,01 \pm 0,2$

* 0.saate, 1.saate, 24.saate ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$).



Şekil.3 Tek doz L-NNA uygulamasının plazma NO_x değerleri üzerine etkileri

* Hem aL-NNA₁, aL-NNA₂₄ gruplarıyla hemde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında NO_x değerlerinin anlamlı olarak düşük olduğuna işaret etmektedir. (P<0,05)

Tek doz L-NNA uygulaması sonrasında kan örneklerinde yapılan ölçümlerde, NO_x değerlerinde 1. ve 24.saatlerde istatistiki olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmezken 3.saatte istatistiki olarak anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir.

5.2.3.2. Kronik düşük doz L-NNA uygulamasının NO_x üzerine etkileri

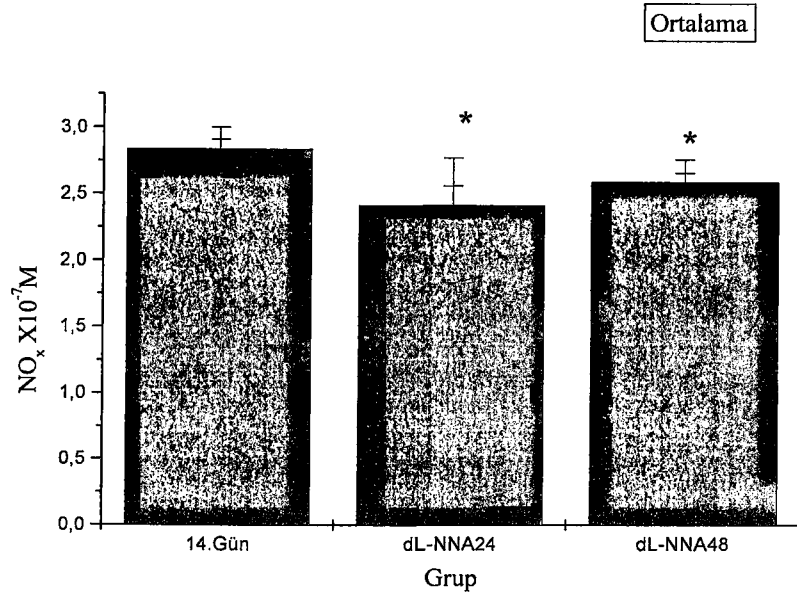
Plazma NO_x değerlerinde, L-NNA uygulamasının son gününde (14.gün, deneklerde halen L-NNA mevcuttur) alınan kan örneklerinde yapılan ölçümlerde kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik tespit edilmemiştir. Ancak, L-NNA uygulaması kesildikten 24 (dL-NNA₂₄ grubu) ve 48 (dL-NNA₄₈ grubu) saat sonra alınan kan örneklerinde NO_x değerlerinin istatistiki olarak anlamlı düşüş gösterdiği

tespit edilmiştir. dL-NNA grubunun NO_x değeri 14.gün için(halen L-NNA varken) 2,84±0,1X10⁻⁷M, 24 saat sonra 2,41±0,1X10⁻⁷M ve 48 saat sonra 2,59±0,1X10⁻⁷M olarak ölçülmüştür (Tablo.5, Şekil.5).

Tablo.5 Düşük doz L-NNA uygulanan grupta, L-NNA uygulandıktan hemen sonraki, 24 ve 48 saat sonraki plazma NO_x değerleri.

	Kontrol grubu	L-NNA uygulamasının 14.günü (dL-NNA)	İLAÇSIZ	
			24 saat sonra (dL-NNA24)	48 saat sonra (dL-NNA48)
NO _x değerleri (10 ⁻⁷) M	2,9± 0,1	2,84 ± 0,1	2,41 ± 0,1*	2,59 ±0,1*

* L-NNA uygulamasının 14.günü(son gün) ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük olduğuna işaret etmektedir (p<0,05).



Şekil.5 Düşük doz L-NNA uygulamasında plazma NO_x değerleri üzerine etkileri

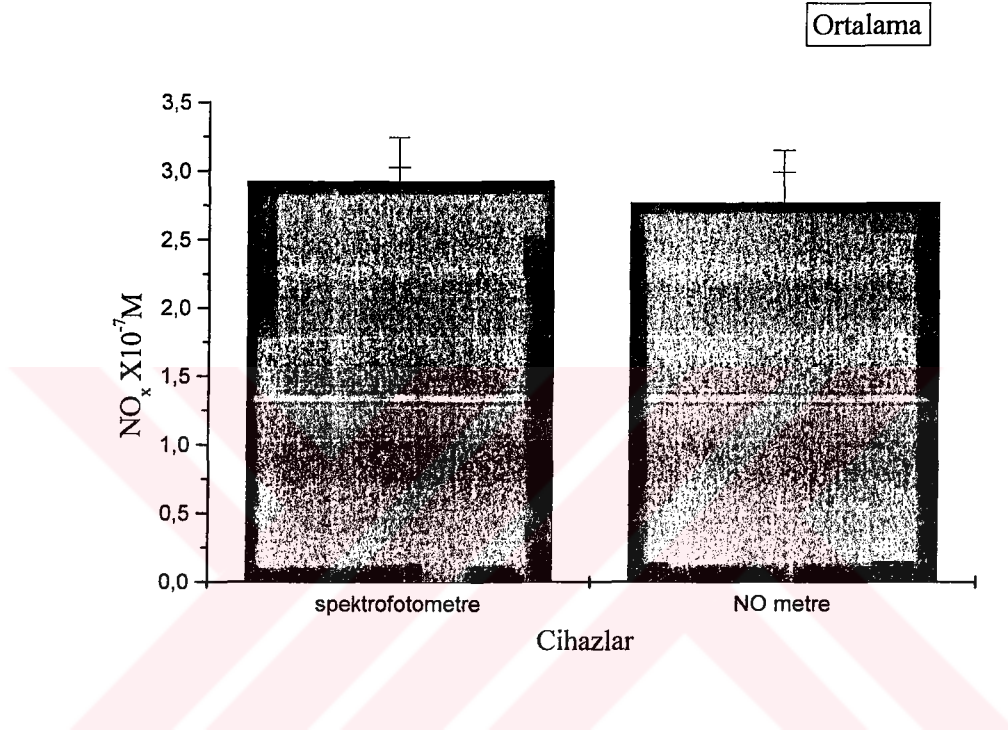
* L-NNA uygulamasının 14.günü(son gün) karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük olduğuna işaret etmektedir ($p<0,05$).

5.2.3.3. Kronik yüksek doz L-NNA uygulamasının NO_x üzerine etkileri

Yüksek doz L-NNA uygulanan grubun 14.gün (deneklerde halen L-NNA mevcuttur) plazma NO_x değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. (Kontrol grubunun NO_x değeri $2,9\pm0,1$ yL-NNA grubunun NO_x değeri $3,5\pm0,1$ olarak bulunmuştur) dL-NNA₁₄ ($2,84\pm0,1$) ile yL-NNA₁₄ ($3,5\pm0,1$) gruplarının NO_x değerleri karşılaştırıldığında, yL-NNA grubunun NO_x değeri istatistiki olarak daha yüksek bulunmuştur.

5.3. NO metre cihazı ile UV-GB spektrofotometresinin karşılaştırılması

Son olarak NO cihazı ile UV-GB spektrofotometre cihazları karşılaştırıldığında sonuçlar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil.7).



Şekil.7 Spektrofotometre ve NO metre cihazlarının sonuçları karşılaştırılması.

6. TARTIŞMA

Kronik NOS inhibisyonu ile gelişen hipertansiyon son yıllarda üzerinde çok çalışılan bir deneysel modeldir (92). NOS inhibisyonu-aracılı hipertansiyon sadece memelilerde değil aynı zamanda kuşlarda da çalışılmaktadır (1). NOS inhibisyonu yapmak için en çok L-NMMA, L-NAME, L-NNA kullanılmaktadır (30).

NOS inhibisyonu-aracılı hipertansiyon çalışmalarında farklı NOS inhibitörleri kullanıldığı gibi, bu inhibitörlerin farklı dozlarda ve sürelerde uygulanmaları sonucu henüz standart bir model geliştirilememiştir. Zatz ve Baylis NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyona üç farklı yaklaşımda bulunmuşlardır: Çok düşük, orta ve yüksek doz NOS inhibitörü uygulaması. Çok düşük doz NOS inhibitörü kullanılarak geliştirilen hipertansiyonda NOS inhibitörünün sistemik damar direnci üzerine bir etki yapmadığı ve hipertansiyonun volüm bağımlı olarak meydana geldiğini, yüksek dozda NOS inhibitörü kullanılarak geliştirilen hipertansiyonda ise tama yakın bir NOS inhibisyonu yapıldığını ve oluşan hipertansiyonun hem renal hem de sistemik vazokonstriksiyonu içerdiğini belirtmişlerdir. İlginç olarak orta dozlarla yapılan NOS inhibisyonunun kısmi bir inhibisyon olduğunu ileri sürerek, oluşan hipertansiyonun komponentlerine değinmemişlerdir. Düşük dozlarla yapılan NOS inhibisyonunda organ hasarı ve gelişme bozukluğu meydana gelmezken, yüksek dozlarla yapılan NOS inhibisyonunda özellikle böbreklerde parankim ve damar hasarı olduğuna ve malign hipertansiyon geliştiğine dikkati çekmişlerdir (93).

Bu çalışmada NOS inhibisyonu yapmak üzere L-NNA kullanıldı. L-NNA seçilmesinin nedeni içme suyu ile uygulanabilir olması, intestinal emiliminin yüksek

olması, iNOS' u inhibe etme potansiyelinin düşük ve özellikle ucuz olmasıdır (91). L-NNA akut uygulamalarda tek doz, kronik uygulamalarda ise iki farklı konsantrasyonda uygulandı. Kronik uygulamalarda farklı konsantrasyonlar seçilirken organ hasarı yapması dikkate alınarak çok yüksek doz uygulamasından kaçınıldı. Yüksek doz (%0,0464 konsantrasyonda) olarak nitelenen konsantrasyonun 1/3 konsantrasyon (% 0,014 konsantrasyonda) ise düşük doz olarak nitelendirildi. Bu şekilde L-NNA uygulamalarında meydana gelebilecek kan basıncı değişikliklerinin plazma NO düzeyleriyle ilişkilerini tespit etmek üzere uygulamaları takiben farklı zamanlarda da plazma NO düzeyleri ölçüldü.

Bu çalışmada, L-NNA tek doz 25 mg/kg (i.p) olarak uygulandığında SKB ve DKB birinci saatte anlamı olarak yükselmiştir ($155,5 \pm 1,7$ mm Hg; $109 \pm 2,1$ mm Hg) bu artış SKB da 3 saatte devam etmiş ($153 \pm 1,5$ mm Hg) fakat DKB ($98 \pm 0,7$ mm Hg) normale gerilemiş ve 24 saat sonra SKB da tekrar normal değerlere gerilemiştir ($147 \pm 4,8$ mm Hg). SKB ölçülen sürelerle ilişkili olarak alınan kan örneklerinde yapılan NOx ölçümlerinde ilginç olarak 1. saatte SKB artmasına rağmen plazma NOx değerleri değişmemiştir ($3,02 \pm 0,2 \times 10^{-7}$ M). Plazma NOx değerleri ancak 3. saatte anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($1,08 \pm 0 \times 10^{-7}$ M) ve SKB'nın normale gerilediği 24. saatte ise plazma NOx değerleri de normale gerilemiştir ($3,01 \pm 0,2 \times 10^{-7}$ M). Buna göre, 1. saatte SKB ve plazma NOx düzeyleri arasında tersine bir ilişki tespit edilememesine rağmen 3. saatte istatistiki olarak anlamlı bir ters ilişki tespit edilmiştir. Birinci saatte NOx düzeylerinin düşmemesi, eliminasyonun henüz yeterli düzeyde olmamasına bağlanabilir. Bu sonuçlara göre, tek doz L-NNA uygulamasının belirgin NOS inhibisyonu yaptığı ve bu inhibisyonun meydana gelen hipertansiyonla ilişkili olduğu ileri sürülebilir. Bu konuda literatürde bir bilgiye rastlanmamıştır.

İkinci seri deneylerde, düşük doz L-NNA (≈ 16 mg/kg/gün) 14 gün süreyle içme suyu ile uygulandığında (% 0,014 konsantrasyonda) deneklerin SKB ve DKB' ları anlamlı olarak yükselmiştir (sırasıyla, 0.gün $127,9 \pm 1,9$ mm Hg $83,1 \pm 1,5$ mm Hg, 7.gün $152,5 \pm 3,5$ mm Hg $104,2 \pm 3,9$ mm Hg ve 14.gün $156,6 \pm 2,5$ mm Hg $114,3 \pm 2,7$ mmHg). Bu dozda L-NNA uygulaması sonucu, SKB ve DKB'ındaki artışlar, meydana gelen hipertansiyona hem kalp debisi artışının hem de periferik damar direncinin birlikte katkı sağladığına işaret etmektedir. L-NNA uygulaması sona erdikten 24 saat sonra SKB ve DKB düşme eğilimine girmişler ($153,7 \pm 2,3$ mm Hg, $112 \pm 5,4$ mm Hg) ve 48 saat sonra ise sadece SKB başlangıç değerine dönmüş ve fakat DKB hala anlamlı olarak yüksek kalmıştır ($144,2 \pm 6,4$ mm Hg, $98 \pm 11,0$ mm Hg). Buna göre, bu dozda iki hafta süreyle L-NNA uygulaması kalıcı bir hipertansiyona neden olmadığı gibi SKB 48 saat içinde normale gerileyebilmiştir. DKB 48. saatte istatistiki olarak anlamlı gerileme göstermese bile azalmıştır ve birkaç gün içinde geriye döndüğü bilinmektedir (105). SKB' nın ilaç uygulaması kesildiğinde hızla geriye dönmesi, bu doz ve sürede L-NNA uygulamasının kalıcı hasar yapmadığına işaret etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar bu bulguları desteklemektedir (105). Kan basınçlarının ölçüldüğü sürelerle ilişkili olarak alınan kan örneklerinde yapılan NOx ölçümlerinde 14. gün plazma NOx değerlerinin anlamlı bir değişiklik göstermediği tespit edilmiştir. Buna göre, bu dozda 2 hafta süreyle yapılan L-NNA uygulaması kan basınçlarını yükseltmesine rağmen plazma NOx düzeylerini etkilememiştir (14.gün halen L-NNA varken plazma NO_x değeri $2,84 \pm 0,1 \times 10^{-7}$ M dır). Ancak, L-NNA uygulamasının sona erdirilmesinden 24 ve 48 saat sonra yapılan ölçümlerde plazma NOx değerlerinde kontrole göre anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir (sırasıyla, $2,41 \pm 0,1 \times 10^{-7}$ M ve $2,59 \pm 0,1 \times 10^{-7}$ M). İlginç olarak, yüksek doz L-NNA uygulaması yapılan grubun

plazma NOx değerleri de 14. gün kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($3.5 \pm 0.48 \times 10^{-7} M$). L-NNA uygulamasıyla plazma NOx düzeylerinin düştüğü bildirilmiştir, ancak bu çalışmalarda kan örneklerinin alınma zamanları açıkça belirtilmemiştir (99,43). On dördüncü günde kan basıncıları yükselirken plazma NOx değerlerinin paradoksal olarak azalmaması ve hatta yüksek doz L-NNA uygulanan grupta daha yüksek çıkması çelişkili gibi görünmektedir. Ancak, bu çalışmadaki bulgularla uyumlu olarak L-NAME ile NOS inhibisyonu yapıldığında NO miktarında paradoksal bir artış olduğunu gösteren çalışmalar vardır; Burada, L-NAME kullanımının iNOS' u aktive ettiği gösterilmiştir (74). Yine Nava ve L scher' in 1999 yılında yaptıkları bir çalışmada deneysel hipertansiyon modellerinin bazılarında NO üretiminin arttığını bazılarında ise azaldığını göstermişlerdir (80). Bu paradoksal bulguları açıklamak kolay değildir, farklı çalışmalarda ilaç uygulama süresi ve özellikle kan örneklerinin alınma zamanı önem arz etmektedir. L-NNA mevcudiyetinde plazma NOx değerlerinin etkilendiği de düşünülebilir. Nitekim, yüksek doz L-NNA uygulaması plazma NOx değerlerini anlamlı olarak daha da artırmıştır. Ancak, L-NNA uygulamasının sona erdirilmesinden 24 ve 48 saat sonra tespit edilen plazma NOx değerleri önemli bilgi vermektedir. Bu sürelerde kan basıncıları düşme eğilimine girmesine rağmen hala başlangıç değerlerinden yüksektir ve plazma NOx değerleri ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktür. Yirmi dördüncü saatte kan basıncıları hala yüksek ve plazma NOx değerleri düşüktür ve 48. saatte kan basıncı daha da düşerken plazma NOx değerleri yükselmektedir. Bu bulgular kan basıncı ile plazma NOx değerleri arasında tersine olan ilişkiyi destekler niteliktedir. Bu bulgular Ikeda ve ark. 5 hafta boyunca 17 mg/kg ve de 14 mg/kg L-NNA uyguladıkları sıçanlarda buldukları KB yükselmesi ile uyumludur (42). Yapılan bir çalışmada L-NNA nın altı haftalık kronik uygulanmasının sıçanların

sistemik KB yi artırdığı ve renal kan akımı ile glomerular filtrasyon hızını azalttığını L-NNA ve SR 49059 kimyasallarının kombine uygulanmasından sonra hipertansiyon meydana getirdiği gösterilmiştir (15). Kazım Husain yaptığı bir çalışmada 8 hafta boyunca kronik L-NAME uygulamasının plazma NO düzeyini baskıladığını, KB ve kalp hızında bir artma gözlemlemiştir (43). Yapılan bir çalışmada inhale olarak uygulanan ^{15}N un %93 ünün 48 saat içinde nitrata dönüştüğü gösterilmiştir (112). Bu bulgu, bu çalışmada L-NNA uygulaması kesildikten 48 saat sonra neden NO_x değerlerinin kontrol grubunun değerlerine yükselmediği sorusunu açıklayabilir.

Yapılan bir çalışmada düşük doz L-NAME nin kronik uygulamasının hayvanların vücut ağırlığında yaklaşık %15 lik bir azalma meydana getirdiği bulunmuştur (16). Bizim çalışmada ise kronik düşük doz L-NNA uygulaması vücut ağırlığında anlamlı bir değişiklik meydana getirmez iken kronik yüksek doz L-NNA uygulanan sıçanların kilolarında anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir (tablo1).

Bu çalışmada ayrıca, plazma NO_x düzeyleri NO metre cihazı ve UV-GB spektrofotometresiyle de karşılaştırmalı olarak ölçülmüştür. Mevcut plazma NO_x konsantrasyonu aralığında sonuçlar arasında bir fark tespit edilmemiştir. Fakat NO metre cihazının duyarlılığını yüksek olması (10 nM-1 μM), ölçüm yaparken Griess Reaktifi gibi ek bir kimyasala ihtiyaç duymaması, ölçümlerin çok kolay ve çok kısa sürede yapılması bu cihazın avantajları arasında sayılabilir. NO metre cihazının kullanılması daha kolay, ucuz ve güvenilirlerdir. Ancak, sensörünün koruyucu membranının kırılgan ve pahalı oluşu, sensorün mekanik olarak geç stabilize olması, şiddetli sıcaklığa duyarlılığı ve kirlenme bu cihazın sakıncaları arasında sayılabilir. Bu gözlemler mevcut çalışmada da vurgulanmaktadır (114).

UV-GB spektrofotometresinde ise NO_3 'ün indirgenmesinde Cd kullanımı ekstra zaman gerektirmektedir, Cd' un toksik bir madde olması Griess reaktifi ile

yapılan ölçümlerin duyarlılığının NO metre cihazına göre düşük olması (1 μ M) bu yöntemin sakıncaları arasındadır (109). Ayrıca indirgeme işleminde enzimatik yöntem kullanıldığında Griess reaktifi ile NADPH/ NADP⁺ arasında bir girişim meydana geldiği, bu girişimin önüne geçebilmek için ferrisiyanidin indirgemeyi katalizlemesi için aşırı NADPH tüketiminin gerektiği ve ikinci bir enzim sistemi olan resiklik NADP⁺/NADPH ın uygulandığında ise piruvat ve laktat dehidrogenazın aşırısı ile NADPH'ın oksidasyonunun gerekli olduğu da ilgili literatürde belirtilmiştir (60).

Sonuç olarak:

- 1) Tek doz 25 mg/kg (i.p) L-NNA uygulandığında 1 ve 3 saatte SKB ve DKB' ı yükselirken plazma NO_x değerinin 1. saatte değil ve fakat 3. saatte düşmekte ve 24 saat sonra hem KB hem de plazma NO_x değerlerinin tamamen geriye dönmektedir.
- 2) İki hafta süreyle 16 mg/kg/gün dozunda L-NNA uygulaması sıçanların büyümesi üzerine olumsuz etki yapmazken, 47 mg/kg/gün dozunda L-NNA uygulamasının sıçanların büyümelerini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Bu durumda, yüksek doz L-NNA uygulamasının kalıcı hasar oluşturabileceği ve muhtemel metabolizma bozulmasının NOS inhibisyonu-aracılı hipertansiyon oluş mekanizmalarının araştırılmasında olumsuz sonuçlar verebilir.
- 3) İki hafta süreyle 16 mg/kg/gün ve 47mg/kg/gün L-NNA uygulaması hem SKB hem de DKB' larını yükseltir. 16 mg/kg/gün L-NNA dozunun uygulamasına son verildikten hemen sonra plazma NO_x düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak değişmemekte, ancak ilaç uygulamasından 24 saat ve 48 saat sonra düşmektedir. SKB 24 ve 48 saat sonra düşme eğilimi gösterir ve 48 saat sonra başlangıç değerine döner. Ancak DKB düşme eğilimine girse de bu düşüş anlamlı

değildir. Plazma NO_x değerlerindeki düşüş meydana gelmiştir. Son dozdan 48 saat sonra ise SKB anlamlı bir şekilde düşerken DKB'ında bir anlamlı bir düşüş tespit edilmemiş ve plazma NO_x değeri 24.saatte göre yükselme tespit edilse de bu yükselme anlamlı değildir. 47 mg/kg L-NNA dozunda ise SKB ve DKB' ında yükselme tespit edilmiş fakat plazma NO_x düzeyi beklenenin aksine kontrol grubundan yüksek bulunmuştur.

4) Plazma NO_x değerleri NO metre cihazı ve UV-GB spektrofotometresi ile ayrı ayrı ölçüldüğünde ise sonuçlar arasında istatistiki olarak bir fark bulunamamıştır. Fakat mevcut şartlarda NO metre cihazı daha avantajlıdır.



7. KAYNAKLAR

1. Aksulu HE, Bingöl I, Karataş F, Üstündağ B.(2000). Changes in plasma angiotensin –converting enzyme activity and noradrenaline responses to long-term nitric oxide inhibition vary depending on their basal values in chicken. *Physiol Res.* 49:175-182
2. Andrew JM, (2002) Mechanism of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases, *NİTRİC OXİDE: biology and chemistry.* 2: 101-124
3. Anilkumar KR, George ET, Sridhar M, Lloyd H. Michael et.al. (2003), Noninvasive blood pressure measurement in mice using pulsed Doppler ultrasound, *Ultrasound in medicine biology.* 3: 379-385
4. Austin AT, (1967) The chemistry of the higher oxides of nitrogen as related to the manufacture, storage and administration of nitrous oxide. *Br. J. Anaesth.* 39: 345-350.
5. Baydal DK, Lata H, .Dadhich AP. (2003) Animal models of hypertension and effect of drug, *Indian journal of pharmacology.*35; 349-362
6. Baylis C, Mitruka B, Deng A, (1992) Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 90: 278–281.
7. Beckman JS, Koppenol WH. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly, *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)* 271: 1424-1437.
8. Bilfinger TV, Hartman A, Liu Y, Magazine HI, Stefano GB (1997). Cryopreserved veins used for myocardial revascularization: a 5 year experience and a possible mechanism for their increased failure. *Ann. Thorac. Surg.* 63: 1063-1069.
9. Bodnar A, Pasternak, GW. (1993). Aging and analgesic mechanisms. In: Makman, M.H., Stefano, G.B. (Eds.), *Neuroregulatory Mechanisms in Aging.* Pergamon Press, Oxford, pp. 137-158
10. Bories PN, Bories C. (1995) Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem.* 41: 904– 907
11. Borland C, (1990) NO and CO transfer, *Eur. Respir. J.*3: 977-978
12. Brady AJ, Warren JB, Poole-Wilson PA. (1993) Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol.* 265:176–182

13. Carlsen E, Comroe JH. (1958) The rate of uptake of carbon monoxide and of nitric oxide by normal human erythrocytes and experimentally produced spherocytes, *J. Gen. Physiol.* 42: 83-107.
14. Casey TE, Hilderman RH.(2000) Modification of the cadmium reduction assay for detection of nitrite production using fluorescence indicator 2,3-diaminonaphthalene. *Nitric Oxide*.4: 67– 74
15. Cecile L, Catherine C, Michele G, Wybren De Jong, Dino N. et.al. (1997) Vazopresin does not effect hypertension Caused by Long-Term Nitric Oxide Inhibition *Br.J.Pharmacol*;122:203
16. Claudia F. de Oliveira , Karine AC, Simone AT, Iara MS, De L, Edson A, et.al.. (2000) Development of cardiomyocyte hypotrophy in rats under prolonged treatment with a low dose of a nitric oxide synthesis inhibitor, *European Journal of Pharmacology* 391: 121–126
17. Cooke, JP, Dzau VJ. (1997). Nitric oxide synthase: role in the gen-esis of vascular disease. *Ann. Rev. Med.* 48: 489-509
18. Cortas NK, Wakid NW (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium method . *Clin chem* 36; 1440-1443
19. Dawson TM, Dawson, VL. (1996). Nitric oxide synthase: role as a transmitter/mediator in the brain and endocrine system. *Ann. Rev. of Med.* 47: 219-227.
20. Dawson, VL, Dawson, TM. (1996). Nitric oxide neurotoxicity. *J. Chem. Neuroanatomy* 10: 179-190.
21. Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid et.al. (1997). Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J. Clin. Invest.* 100: 1538-1546.
22. Dinerman JL, Lowenstein CJ, Snyder SH. (1993) Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease. *Circ Res*;73: 217– 222.
23. Dykhuizen RS, Masson J, McKnight G, Mowat ANG, Smith CC et.al. (1996) Plasma nitrate concentration in infective gastroenteritis and inflammatory bowel disease, *Gut* 39: 393-395.
24. Feelisch M. (1991) The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17: 25-33.
25. Ford PC, Wink DA, Stanbury DM. (1993) Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide, *FEBS Lett.* 326: 1-3

26. Furusu A, Miyazki M, Abe K, Tsukasaki S, Shioshita K. et.al. (1998) Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 53: 1760–1768,
27. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RJM, Moncada S.(1990) Control of regional blood flow by endothelium- derived nitric oxide. *Hypertension* 15: 486-492
28. Gibson QH, Roughton FJW. (1957) The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin, *J. Physiol.* 136: 507-526.
29. Gow A.J, Stamler JS. (1998) Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions, *Nature* 391: 169-173
30. Graham ellis, Ian Adatia, Mehrdad Yazdanpanah, Sınıkka.K.Makela, (1998) Nitrite and nitrate analyses:A clinical biochemistry perspective, *clinical biochemistry*, Vol.31, No.4,195-220,
31. Green LC, Luzuriaga KR, Wagner DA, Rand W, Istfan N. et.al. (1981) Nitrate biosynthesis in man, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 7764-7768.
32. Green LC, Tannenbaum SR, (1981) Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat, *Science* 212: 56-58.
33. Green LC, Wagner DA, Glogowski , Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.* 126: 131-138
34. Gries A, Bode C, Peter K, Herr A, Bo' hrer H. et.al. (1998) Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo, *Circulation* 97: 1481-1487.
35. Grube R, Kelm M, Motz W, Strauer BE, Moncada S. et.al. (1994), *The Biology of Nitric Oxide. Enzymology, Biochemistry and Immunology*, Portland Press, 4: 201-204.
36. Guarner C, Soriano G, Tomas A et al. (1993) Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology*;18: 1139–1143
37. Halliwell B, Hu ML, Louie S, Duvall TR, Tarkington B.K. et.al. (1992) Interaction of nitrogen dioxide with human plasma, *FEBS Lett.* 313: 62-66
38. Hayward CS, Kalnins WV, Rogers P, Feneley MP, MacDonald PS. et.al. (1997) Effect of inhaled nitric oxide on normal human left ventricular function, *J. Am. Coll. Cardiol.* 30: 49-56.

39. Heslop RB, Jones K. (1976) *Inorganic Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, pp.424-432
40. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, et al. (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophages effector molecule. *Biochem Biophys Res Comm*;157: 87-94.
41. Holzer P, Livingston EH, Saria A et al. (1991) Sensory neurones mediate protective vasodilatation in rat gastric mucosa. *Am Jphysiol*. 260:363-370
42. Huang PL, Huang Z, Mashimo H. Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 377: 239-242
43. Husain K. (2003) Interaction of exercise training and chronic NOS inhibition on blood pressure, heart rate, NO and antioxidants in plasma of rats *journal pathophysiology* 10: 47-56.
44. Ikeda K, Gutierrez OG Jr, Yamori (1992). Dietary NG-nitro-L-arginine induces sustained hypertension in normotensive Wistar-Kyoto rats. *Clin.Exp.Pharmacol Physiol*. 19: 583-586
45. Islam D, Veress B, Bardhan PK, et al. (1997) In situ characterization of inflammatory responses in the rectal mucosae of patients with shigellosis. *Infect Immunol*. 65: 739-749.
46. James D, Kenneth J, McKeegan , Marco F, Cardosi D. Huw Vaughan , (1999) Evaluation of phenolic assays for the detection of nitrite, *Talanta* 50: 103-112
47. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, . Stamler JS. (1996) S-Nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control, *Nature* 380: 221-226.
48. Kelm M, Dahmann R, Wink D, Feelisch M. (1997) The nitric oxide-superoxide assay: insights into the biological chemistry of the O₂/NO-interaction, *J. Biol. Chem*. 272: 9922-9932.
49. Kelm M, Feelisch M, Grube R, Motz W, Strauer BE. et.al. (1992) *The Biology of Nitric Oxide. 1 Physiological and Clinical Aspects*, Portland Press . 319-322
50. Kelm M, Feelisch M, Krebber T, Deussen A, Motz W. et.al. (1995) Role of nitric oxide in the regulation of coronary vascular tone in hearts from hypertensive rats. Maintenance of nitric oxide-forming capacity and increased basal production of nitric oxide, *Hypertension* 25: 186-193.
51. Kelm M, Schrader J. (1990) Control of coronary vascular tone by nitric oxide, *Circ. Res*. 66: 1561-1575

52. Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ru CE, Hirth CG. (1992). The d-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 12048-12052
53. Kimura H, Hokari R, Miura S, et al. (1998) Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 42: 180 –187
54. Kimura T., Ota K., Matsui K., Iitake K, Shoji M. Et.al. (1985). The presence of methionine-enkephalin in plasma and urine in normal human subjects and various patients. *Endocrinol. Jpn.* 32:
55. Kosaka H, Uozumi M, Tyuma I. (1989) The interaction between nitrogen oxides and hemoglobin and endothelium-derived relaxing factor, *Free Radical Biol. Med.* 7: 653-658.
56. Kubes P, Granger DN, (1992). Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am. J. Physiol.* 262: 611-615.
57. Kubes P, Suzuki MM, Granger DN. (1991). Nitric oxide an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 4651-4655
58. Kurose I, Kubes P, Wolf R. (1993). Inhibition of nitric oxide production: Mechanisms of vascular albumin leakage. *Circ. Res.* 73: 164-171
59. Lancaster JR. (1997) A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide, *Nitric Oxide: Biol. Chem.* 1: 18-30
60. Lancaster JR., Batie CJ, Kamin H, Knaff DB (1982) In *methods chloroplast molecular biology* Elsevier p.27345
61. Lee K, Greger JL, Consaul JR, K Graham L, Chinn BL. (1994) Nitrate, nitrite balance, and de novo synthesis of nitrate in humans consuming cured meats, *Am. J. Clin. Nutr.* 44: 188-194.
62. Liu X, Miller MJS, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster JR. (1998) Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes, *Proc. , Natl. Acad. Sci.* 95: 2175-2179
63. Liu X, Miller MJS, Joshi MS, Sadowska-KH, Clark DA. et.al. (1998) Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes, *J. Biol. Chem.* 273: 18709-18713.

64. Lianos EA, Huglielmi K and Sharma M, (1998.) Regulatory interactions between inducible nitric oxide synthase and eicosanoids in glomerular immune injury. *Kidney Int* 53: 645–653,
65. MacCarty M. (1981) The Health Effects of Nitrate, Nitrite, and Nnitroso Compounds, National Academy Press, Washington, DC,
66. Magazine HI, Liu Y, Bilfinger TV, Fricchione GL, Stefano GB. (1996). Morphine-induced conformational changes in human monocytes, granulocytes, and endothelial cells and in invertebrate immunocytes and microglia are mediated by nitric oxide. *J. Immunol.* 156: 4845-4850.
67. Malinski T, Taha Z. (1992) Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor, *Nature* 358: 676-677.
68. Malte Kelm. (1999) Nitric oxide metabolism and breakdown, *Biochimica et Biophysica Acta* 1411: 273-289
69. Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, Marzinzig E, Barthlen W, Nussler NC, et al. (1997) Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols. *Nitric Oxide* 1:177–89.
70. McKnight GM, Smith LM, Drummond RS, Duncan CW, Golden M. et.al. (1997) Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans, *Gut* 40: 211-214.
71. Meyer M, Piiper J. (1989) Nitric oxide (NO), a new test gas for study of alveolar-capillary diffusion, *Eur. Respir. J.* 2: 494-496.
72. Miles A.M. , D.S. Bohle, P.A.Glassbrenner, B. Hansert, D.A. Wink et.al. (1996) Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide, *J. Biol. Chem.* 1: 40-47.
73. Miller MJS, Sadowska-Krowicka H, Chotinaruemo S, et al. (1993) Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther*;264:11.
74. Miller MJ, Thompson, J H, Liu, X, Eloby-Childress S, Sadowska-Krowicka, H et.al. Failure of L-NAME to cause inhibition of nitric oxide synthesis: role of inducible nitric oxide synthase ,*Inflamm Res.* 45: 272-276
75. Moncada S, Higgs A. (2002) The L-arginine– nitric oxide pathway. *N Engl JMed* 27: 2002-2012
76. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. (1991) Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*;43: 109–142.

77. Mordvintcev P, Mulsch A, Busse R, Vanin A. (1991) On-line detection of nitric oxide formation in liquid aqueous phase by electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Anal. Biochem.* 1: 142-146.
78. Murphy ME, Sies H. (1991) Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 23: 10860-10864
79. Narita I, Border WA, Ketteler M and Noble NA, (1995.) Nitric oxide mediates immunologic injury to kidney mesangium in experimental glomerulonephritis. *Lab Invest* 72: 17-24,
80. Nava E, Lüscher TF. (1999) Hypertension in: Pathophysiology and clinical application of nitric oxide GM Rubany,(ed), Horwood academic Publisher, Amsterdam 251-266
81. Noda H, Minemoto M, Eto S, Noda A, Matsuyama K. (1984) Nitrite ion, its stability in an aqueous solution and disappearance from rabbit blood, *Yakugaku Zasshi* . 104: 409-412
82. Palmer RJM, Ferrige AG, Moncada S (1987) *Nature* 327: pp 326
83. Parks NJ, Krohn KA, Mathis CA, Chasko JH, . Geiger KR et.al. (1981) Nitrogen-13-labeled nitrite and nitrate: distribution and metabolism after intratracheal administration, *Science* 212: 58-61.
84. Poderoso JJ, Peralta JG., Lisdero CL, Carreras MC, Radisic M. et.al. (1998) Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart, *Am. J. Physiol (Cell Physiol.)* 274: 112-119.
85. Rabbani GH, Sufia I, Asish K, Chowdhury, Amal K. Mitra, M, et.al. (2001) Increased Nitrite and Nitrate Concentrations in Sera and Urine of Patients With Cholera or Shigellosis *The American Journal of Gastroenterology* . 2: 467-472.
86. Radomski, MW, Palmer RMJ, Moncada S. (1990) Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 10043-10047.
87. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 2: 1057-1058.
88. Rao RK, Riviere PJM, Pascaud X, et al. (1994) Tonic regulation of mouse ileal ion transport by nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2: 626-631

89. Rattan S, Chakder S. (1992) Role of nitric oxide as a mediator of internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol*;262: G107
90. Rejdaka K, Petzold A, Sharpe MA, Smithd M, Keir G. et.al. (2003) Serum and urine nitrate and nitrite are not reliable indicators of intrathecal nitric oxide production in acute brain injury , *Journal of the Neurological Sciences* 208: 1 – 7
91. Ress DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo.*Br.J.Pharmacol.* 101:746-752
92. Ribeiro MO, Antunes E, Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R.(1992) Chronic inhibition of nitric oxide synthesis.A new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 20: 298-303
93. Roberto Zats, Christine Baylis (1998) Chronic Nitric oxide inhibition model six years ago *Hypertension .* 32: 958-964
94. Schmidt K, Klatt P, Mayer B. (1995) Reaction of peroxynitrite with oxyhaemoglobin: interference with photometrical determination of nitric oxide, *Biochem. J.* 301: 645-647
95. Schultz DS, Deen WM, Karel SF, Wagner DA, Tannenbaum SR. (1985) Pharmacokinetics of nitrite in humans: role of gastrointestinal absorption and metabolism, *Carcinogenesis* 6: 847-852.
96. Simon DI, Stamler JS, Jaraki O, et al. (1993). Antiplatelet properties of protein S-nitrosothiols derived from nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor. *Arterioscler. Thromb.* 13: 791-799
97. Simonsen U, Wadsworth RM, Buus NH, Mulvany MJ. (1999) In vitro simultaneous measurements of relaxation and nitric oxide concentration in rat superior mesenteric artery. *J Physiol.* 1: 271–282.
98. Singer II, Kawka DW, Scott S, et al. (1996) Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 111: 871–885
99. Takahashi. H, Hara K, Komiyama Y, Masuda M, Murakami T et.al. (1995) Mechanism or hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide in rats *Hypertension Res* 4: 319-324
100. Takahashi H, Nakanishi T, Nishimura M, Tanaka H, Yoshimura M. (1992) Measurements of serum levels of nitrate ions in men and women: implications of endothelium-derived relaxing factor in blood pressure regulation and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 12: 214–216.
101. Tannenbaum S. (1994) Nitrate and nitrite: origin in humans, *Science* 205: 1333-1335.

102. Togashi H, Sasaki M, Frohman E, Taira E, Ratan RR et.al. (1997). Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappa B activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 2676-2680
103. Tokumitsu W, Masahiro A, Kenji T, Koichi K, Masato E et.al. (2000) Influence of sex and age on serum nitrite / nitrate concentration in healthy subjects *Clinica Chimica Acta* 301: 169–179
104. Tribulova N, Okruhlicova L, Bernatova I, Pechanova O, (2000) Chronic disturbances in NO production results in histochemical and subcellular alterations of the rat heart, *Pysiol. Res.* 49: 77–88.
105. Tuğrul İ, Oktar S, Deniz E, Yılmaz E, Aksulu HE. (2003) NOS Inhibition mediated hypertension: High and low doses of L-NNA administration, Turkish pharmacological society, 17th national congress of pharmacology, 1st clinical pharmacology symposium october 17-21, Antalya/Turkey.
106. Uppu RM, Squadrito GL, Pryor WA. (1996) Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide, *Arch. Biochem. Biophys.* 327: 335-343.
107. Wagner DA, Young VR, Tannenbaum SR. (1983) Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of ¹⁵NH₃ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 4518-4521.
108. Winlaw DS, Smythe GA, Keogh AM, Schyvens CG, Spratt PM et.al. (1994) Increased nitric oxide production in heart failure. *Lancet*. 344: 373–374.
109. Wishnok JS, Glogowski JA, Tannenbaum SR (1996). Quantitation of nitrate, nitrite and nitrosating agent. *Meth. Enzymol.* 268: 131-140
110. Xueji Z, Jie L, Levis C, Mark B and Victor Darley-Usmarb, (2002) A Novel Microchip Nitric Oxide Sensor with sub-nM Detection Limit, *Electroanalysis*. 10: 697-703
111. Yang F, Troncy E, Francoeur M, Vinet B, Vinay P, et.al. (1997) Effects of reducing reagents and temperature on conversion of nitrite and nitrate to nitric oxide and detection of NO by chemiluminescence. *Clin Chem.* 43: 657– 662.
112. Yoshida K, Kasama K, Kitabatake M, Imai M. (1983) Biotransformation of nitric oxide, nitrite and nitrate, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 52: 103-115.
113. Yoshida K, Kasama K, Kitabatake M, Okuda M, Imai M. (1980) Metabolic fate of nitric oxide, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 46: 71-77.

114. Ziad H. Taha, (2003) Nitric oxide measurements in biological samples, *talanta* 61: 3-10



8.ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Elazığ'da doğmuşum. Salkaya İlkokulunu bitirdikten sonra Elazığ Mezre Orta Okulunu ardından Elazığ Atatürk Lisesini bitirdim.1998 yılında Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandım. 2002 yılında menzun oldum. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açtığı sınavı kazanarak Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitime başladım. Halen Tıbbi Farmakoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitime devam etmekteyim.

