

TEMEL TIP BİLİMLERİ

Farmakoloji

Endotel-Kaynaklı Gevşetici Faktör (EDRF)

*Dr.Sami EREN**
*Prof.Dr.Z.Sevim ERCAN**

1980 yılında Furchgott ve Zawadzki izole tavşan aort şeritlerinde asetilkolin (ACh) ile oluşturulan gevşemelerin endotelial hücrelerin varlığına bağlı olduğunu gösterdiler (1). ACh ile oluşturulan vasküler gevşemede endoteliumun rolünün anlaşılması ve bu etkiden humoral bir faktörün sorumlu olduğunun gösterilmesi, endotel-bağımlı gevşemeye neden olan bir çok şümulüsün ortaya çıkarılmasına, bu mekanizmanın çok sayıda inhibitörünün tanımlanmasına ve "Endotel-kaynaklı gevşetici faktör (Endothelium-derived relaxing factor - EDRF)" olarak isimlendirilen bu son derece labil vazodilatör maddenin yapısı hakkında yoğun spekülasyonlara yol açmıştır.

Endotel-kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) birçok değişik madde aracılığıyla vasküler endoteliumdan salınan, prostanooid olmayan, labil (yarılanma ömrü 3-10 saniye) bir humoral madde olup, oksijen ve süperoksit anyonları (O_2^{2-}) tarafından yıkılır. Damar düz kaslarını gevşetir, trombositlerin damar duvarına yapışmasını ve trombosit agregasyonunu inhibe eder (2). EDRF düz kas hücrelerinde (ve trombositlerde) solubl guanilat siklaz enzimini aktive etmekte, böylece hücre içinde artan cGMP (siklik guanözün 3', 5'-monofosfat), olasılıkla Ca^{2+} 'un dışarıya atan pompanın uyarılmasına ya da hücre içi Ca^{2+} 'un sekestrasyonunun aktive edilmesine veya miyozin zincirinin fosforilasyonunun azalmasına yol açarak gevşemeye (ya da trombositler üzerindeki etkilerine) neden olmaktadır (3). cGMP fosfodiesteraz inhibitörleri MB 22948 ve izobutilmetilksantin'de izole sıçan aortunda, hücre içi

cGMP düzeylerini artırarak endotel-bağımlı gevşemelere yol açmaktadırlar (4). Rapoport ve ark. ise cGMP'nin vasküler düz kas kontraksiyonunu, fosfotidil inozitol hidrolizini inhibe etmek suretiyle baskıladığını ileri sürmektedirler (5). Vasküler gevşemede rol alan solubl guanilat siklaz'dan başka membraner bir guanilat siklaz daha mevcuttur. Bu enzim atriumlardan salınan ANF (atrial natriuretic factor) tarafından aktive edilmekle ve endotel varlığından bağımsız olarak vazodilatasyonda rol almaktadır (6).

EDRF'nin yapısı ve kimliği hakkında geniş ve çok boyutlu tartışmalar yapılmaktadır. Bazı araştırmacılar EDRF'nin nitrik osit (NO) ya da NO-benzeri bir madde olduğunu ileri sürmektedirler. EDRF-aracılı cevaplarda olduğu gibi NO da guanilat siklazı aktive etmekte ve hücre içi cGMP düzeylerini yükseltmektedir. Hem EDRF hem de NO'nun vasküler preparatlardan geçici salınımı aynı hızda gittikçe azalmaktadır ve NO'nunda yarılanma ömrü 10 saniyenin altındadır. Saf NO gazı ise son derece kararsız bir bileşik olup, saniyeler içinde NO₂ ve diğer nitrojen oksitlere dönüşür (7). Endotel-kaynaklı nitrik osit (EDNO) Furchgott tarafından tanımlanan EDRF'nin biyolojik özelliklerinin çoğunu taşımaktadır. Ancak EDNO'nun serbest NO'dan çok daha labil bir bileşik olabileceği olasılığında güncelliğini korumaktadır. Yine de, hangi biçimde olursa olsun, vasküler düz kas hücreleri ve trombositlerle etkileşime girenin NO'nun bizzat kendisi olduğu varsayımı bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir (2,7). Ancak Myers ve ark. EDRF'nin biyolojik aktivite ve özellikleri gözönüne

*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD, ANKARA

alındığında, bu maddenin NO değil, bir nitrozoliyol bileşiği olan S-ni(rozosistcin olduğu görüşünü savunmaktadırlar (8).

Endotelyal hücre kültürü ortamına L-arginin eklenmesinin NO, NO₂ ve NO₃ oluşumunu artırdığı, L-arginin kullanan değişik enzimlerin bir inhibitörü olan L-Canavanin'in ise NO oluşumunu önlediği ve arginin'in nöroblastoma hücre kültürü süpernatant fraksiyonunda solubl guanilat siklazı aktive ettiği bulgularından hareketle, L-arginin'in EDNO'nun fizyolojik prekürsörü olduğu sanılmaktadır (9). N-nitro-L-arginin ise EDRF salınımına bloke eden spesifik güçlü bir inhibitör olup, ortama L-arginin eklenmesiyle, oluşan inhibisyon giderilmektedir (10). İnsanlarda da, yine L-arginin'in etkisini inhibe eden N-mnometil L-arginin'in el sırtından i.v. infüzyonu EDRF-araeih lokal venodilasyonu önlemiş, venokonstriktörlerin etkisini ise potansiyalize etmiştir (11).

Değişik hayvan türlerinde ve değişik yapılar da Ach (12), P maddesi, ATP (3), kalsiyum iyonoforu A23187(13,14) ve bradikinin (15,16,17,18) EDRF salınımına yol açarak endotel-bağımlı gevşeme ve etkilere neden olmaktadır. Bunların dışında; vazodilatör intestinal peplid sıçan aortasında, trombin köpek femoral, pulmoner ve koroner arterlerinde, araşidonik asit sıçan ve tavşan aortasında, mellitin tavşan aortasında, histamin sıçan aortasında endotel bağımlı gevşemeler oluşturmuşlardır (3). Serotonin'in izole tavşan kalbinde oluşturduğu koroner vazodilatasyon ise EDRF inhibisyonundan sonra ortadan kalkmıştır (19). İzole vasküler dokularda A II (anjiotensin II)'nin ve izole tavşan böbreğinde değişik vazodilatör maddelerin etkilerinde EDRF'nin modüle ettiği gösterilmiştir (20,21). Timolol, propranolol ve labetolol gibi beta-blokörlerin sıçan aortasında oluşturdukları gevşeme ise endotel uzaklaştırıldığında anlamlı biçimde azalmaktadır (22). Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan bazı vazodilatörlerinde (sodyum nitroprussid, nitrogliserin, izosorbiddiniral) EDRF oluşumuna yol açarak etki gösteritileri bilinmektedir (6).

Endotelyal hücrelerden EDRF salınımının Ca²⁺-bağımlı bir süreç olduğu kabul edilmektedir (23). Gerçekte, ekstrasellüler Ca²⁺'un kaldırılması ya da ortama kalsiyum-kanal blokörlerinin eklenmesi, EDRF-araeih gevşemeler oluşturan Ach ve A23187'in etkisini inhibe etmek-

tedir (3). Benzer biçimde, Ca²⁺'suz ortamda bradikininine karşı oluşan duyarsızlık CA²⁺'un ortama eklenmesi ile ortadan kalkmaktadır (24). İlginç olarak ise, Allura ve Allura köpek koroner arterlerinde Ach ile oluşturulan gevşeme cevabının ortamdaki Mg²⁺ uzaklaştırıldığında ortadan kalktığı ve kısmen kontraktile cevaba dönüştüğünü göstermişler, hipornagnezeminin koroner arter spazmı ve iskemik kalp hastalığına bağlı ani ölüme neden olan vazokonstriksiyona katkıda bulunabileceği hipotezini ileri sürmüşlerdir (25).

Venlerde EDRF salınımı olduğu ve venöz EDRF'nin özellikleri açısından arteryel EDRF'ye çok benzediği görülmüştür (26). İnsanlarda in vivo yapılan çalışmalarda ise bazı vazodilatörlerin oluşturduğu venodilatasyonda EDRF salınımının aracılık ettiği gösterilmiştir (11).

Öte taraftan, etkinliği her ne kadar az olsada, adenlisizyadaki kolinerjik sinirlerden serbestleşen Ach'inde özellikle mediyal tabakanın ince okluğu küçük arter ve arteriyollerde endotelyumu etkileyip EDRF salınımına neden olabileceği varsayılmaktadır (27). Bu arada, Wood ve ark., endoleli giderilmiş sıgır pulmoner arterlerinde özellikleri NO'ya çok benzeyen ve damar düz kas hücrelerinden salındığı sanılan labil bir gevşetici maddeyi de MDRF (smooth muscle-derived relaxing factor) adıyla tanımlamışlardır (26). Fizyopatolojik olaylarda önemli rol oynadığı sanılan MDRF ile ilgili çalışmalar halen sürmektedir.

Araşidonik asit veya melabolitlerinin EDRF oluşumunda rol oynayıp oynamadıkları konusu tartışmalıdır. Değişik fosfolipaz A₂ inhibitörleri endotel bağımlı gevşemeyi inhibe etmekte, bir fosfolipaz A₂ aktivatörü olan mellitin ise endotel-bağımlı gevşemeye neden olmakla beraber bu maddelerin özgüllüğü özellikle yüksek konsantrasyonlarda şüphelidir ve EDRF oluşumunda fosfolipaz A₂'nin rolünün olmadığı düşünülmektedir (2). Ancak, her ikiside güçlü vazodilatör ve anti-agregatuar özelliklere sahip olan EDRF ve PGB₂ (prostasiklin)'nin trombosit agregasyonunu ve damar düz kaslarının kontraksiyonunu inhibe etmekte sinerjistik etkileşimle girdikleri değişik araştırmacı grupları tarafından gösterilmiştir (28,29). Ayrıca Shimokawa ve ark. PGL'nin arteryel dokularda üç farklı biçimde gevşetici etki oluşturduğunu ileri sürmektedirler. Bunlar; i) (Düz damarın direkt gevşemesi, ii) Bazal EDRF ile siner-

jistik etkileşme ve iii) EDRF salınımının uyarılmasıdır. Araştırmacılar son iki mekanizmanın daha önemli olduğunu söylemekte ve FG12 ile EDRF arasındaki etkileşim yetersizliğinin vazospazm, trombozis ve aterosklerozis gibi patolojik durumlarda önemli bir rol oynayabileceğini belirtmektedirler (30). Oysa bu çalışmalardan farklı olarak, Doni ve ark. aort endotelial hücre kültürlerinde FG12 salınımının yüksek konsantrasyonlardaki NO ile inhibe edilebildiğini göstermişlerdir ancak bu inhibisyonun mekanizması bilinmemektedir (31).

Hidrokinon (20), fenidon, BW 755C (2), nor-dihidroguairctik asit, Gossipol (32), piyosiyinin (33) gibi maddeler EDRF'nin etkilerini inhibe etmektedirler. Bu maddelerin bazılarının inhibitör etkisi beraberlerinde SOD (süperoksit dizmutaz) ve bakır klorid verildiğinde azaldığından, sözkonusu maddelerin serbest oksijen radikalleri (*O₂*) üretmek EDRF'yi inaktive ettiklerini aklı getirmektedir (34). Bununla birlikte bütün EDRF inhibitörlerinin bu mekanizma yoluyla etkili oldukları pek olası görülmemektedir. Örneğin EDRF etkisinin hemoglobin (Hb) ile inhibisyonunda başlıca mekanizmanın EDRF ile kimyasal bağlanma olduğu sanılmaktadır (35). İnsan eritrosit süspaniyonunda Hb'e benzer biçimde EDRF aktivitesini inhibe etmektedirki bu da, EDRF'nin salındığı yerden uzaklarda etkisinin olmadığı (ya da çok az olduğu) ve daha çok lokal bir otakoid gibi davrandığı görüşünü desteklemektedir (36). Metilen mavisi (MM) ise solubl guanilat siklaz inhibisyonu yaparak EDRF'nin etkilerini bloke etmektedir (37,38). İlginç olarak, MM'nin diğer majör vazodilator olan FG12 ile de etkileşime girip, guanilat siklaz inhibisyonundan bağımsız bir mekanizma ile bu prostanoidin üretiminde engellediği gösterilmiştir (37,39).

1987 yılında Komori ve Suzuki, tavşan femoral arterinde Ach ve oxotremorin'in M₂-tnuskarinik reseptörlerinin aktivasyonu ile EDRF salınımına yol açtıklarını ve yalnızca Ach'nin M₁-muskarinik reseptörler aracılığıyla hiperpolarizasyon yapıcı bir madde salınımında yolaçarak endotel-bağımlı hiperpolarizasyona neden olduğunu gösterdiler (40). Bu maddeye EDHG (endothelial-dependent hyperpolarizing factor) adı verilmekte ve (en azından bazı arteriyel dokularda) Ach ile oluşan gevşemelere hem EDRF hem de EDHF salınımının neden olduğusanılmaktadır (6,40,41).

EDRF'nin Patolojik Olaylardaki Rolü

Endotel-bağımlı vasküler gevşemeler çok değişik normal dokularda gösterilebilirken, spontan veya deneysel hipertansiyonu olan sıçanlarda (17,42,43) ve diyetle ateroskleroz oluşturulmuş tavuklarda (44) bu cevapların azaldığı gözlenmektedir. Hipertansiyonda subendotelial kalınlaşma olduğundan, EDRF'nin endoteliumdan düz kaslara azalmış difüzyonunun ya da düz kasların bu faktöre azalmış cevabının patogeneizde rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (45). NO oluşturan NaNO₂'nin ortama eklenmesi ile atrosklerotik vasküler preparatlarda vazorelaksan maddelere gevşeme cevabının ortaya çıkması, hiperkolesterolemide vasküler düz kasların EDRF'ye yanıtında bir bozukluk olmadığı, endotelium hücrelerinin EDRF oluşturmada yetersiz oldukları olasılığını güçlendirmektedir (46). Ayrıca, koroner arter hastalığı veya aterosklerozisi olan hastalardan alınan dokularda da endotel-bağımlı gevşemeleri inhibe ettiği gösterilmiştir (48).

İn vitro çalışmalarda, hipoksinin vasküler dokularda EDRF üretimini azaltmasına bakarak, hipoksik vazokonstriksiyona azalmış EDRF üretiminin katkıda bulunabileceği bildirilmektedir (49). Gerçekte, EDRF inhibitörlerinden MM izole sıçan pulmoner arterlerinde hipoksinin oluşturduğu kontraksiyonları artırmaktadır (50). Doğumdan hemen sonra deney hayvanlarının pulmoner ve sistemik arterlerinde EDRF üretiminin başladığının gösterilmesi sonucunda, akciğer EDRF yapımının bölgesel stimülasyonu veya ekzojen EDRF uygulamasının, yenidoğanların pulmoner hipertansif hastalıklarının tedavisinde yararlı olabileceği ileri sürülmektedir (51). Piyosiyinin, *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi tarafından üretilen bir pigmenttir ve bu bakteriyle enfekte olmuş kistik fibrozis'li hastaların balgamında çok yüksek miktarlarda bulunmaktadır.

Piyosiyinin'in vitro çalışmalarda EDRF aktivitesini inhibe edebildiğinin gösterilmesi, bu pigmentin sözkonusu hastalarda EDRF ile in vivo etkileşebileceği ve pulmoner hipertansiyon oluşumuna katkıda bulunabileceği olasılığını aklı getirmektedir (33).

EDR inhibitörlerinden Hb'nin veya hemoliz ürünlerinin bir çok türde serebral arter kontraksiyonuna yolaçtığı rapor edilmiş ve subaraknoid

kanamayı takiben oluşan serebral vazospazmada koagülüm içindeki IIB'nin etkisinin olabileceği ileri sürülmüştür (41). Beyin cerrehisinde oldukça sık başvuru mikrovasküler geçici klip uygulaması sonrasında görülen vazokonstriksiyonda da EDRF salınımındaki azalmanın rolü olabileceği gösterilmiştir (52).

• Bunların dışında, EDRF'nin inflamasyondaki rolüde incelenmiş ve sıçanların ekstremiteğinde değişik inflamatuvar maddelere oluşturulan vazodepresyona EDRF'nin aracılık etliği bildirilmiştir. Buna bağlı olarak, EDRF'nin inflamasyon

bölgesinden dolaşıma salınan 1. haberci aracılığıyla serbestleşen 2. bir aracı veya haberci olabileceği varsayımı ileri sürülmektedir (53). Peplik ülser patogeneğinde EDRF'nin rolü olduğuna dair deneysel hayvan çalışmaları mevcuttur (54).

Sonuç olarak, EDRF'nin özellikle kardiyovasküler sistemde önemli etkilerinin olduğunun anlaşılması, bu otakoidin saf olarak eldesi ya da stabil analoglarının sentez, edilmesinin, patolojik durumlarda terapotik veya prevantif açıdan önemli olabileceği olasılığını gündeme getirmektedir.

KAYNAKLAR

1. Furchgott RE, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelium cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980, 288: 373-6.
2. Moncada S, Radomski MW, Palmer MJ: Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function *Biochem Pharmacol* 1988, 37: 2495-501.
3. Angus JA, Cocks TM: Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther* 1989, 41: 303-52.
4. Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D: Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1986, 237: 539-47.
5. Rapoport RM: Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta. *Circ Res* 1986, 58: 407-10.
6. Berdcaux A: Vasodilatateurs et endothelium vasculaire. *Ann Cardiol Angéiologie* 1989, 38: 611-15.
7. Ignarro LJ: Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB Journal* 1989, 3: 31-6.
8. Myers PR, Minor RL, Guerra R, Bates J, Harrison DG: Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 1990, 354: 161-63.
9. Schmidt HHW, Nau H, Wittfoht W: Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1988, 154: 213-16.
10. Ishi K, Chang B, Kerwin JF, Huang J, Murad F: N-nitro-L-arginine: A potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur J Pharmacol* 1990, 176: 219-23.
11. Vallance P, Collier J, Moncada S: Nitric oxide synthesized from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. *Cardiovasc Res* 1989, 23: 1053-57.
12. Furchgott RF: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983, 53: 557-73.
13. Luscher TF, Vanhoutte PM: Endothelium-dependent responses in human blood vessels. *TIPS* 1988, 9: 181-184.
14. Rivers RJ, Loeb AL, Izzo NJ, Peach MJ, Duling BR: Microcirculatory responses to exogenous endothelial cell-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1990, 258: H606-H609.
15. Schmidt K, Mayer B, Kukovetz WR: Effect of calcium on endothelium-derived relaxing factor and cGMP levels in endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1989, 170: 157-66.
16. Sung CP, Arhath AJ, Shikano K, Potapovich B, Berkowitz BA: Effect of trypsinization in cell culture on bradykinin receptors in vascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 1989, 38(4): 696-99.
17. Thomas GR, Walder CE, Thiemermann C, Vane JR: Regional vascular resistance and haemodynamics in the spontaneously hypertensive rat: The effect of bradykinin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990, 15: 211-17.
18. Schini VB, Baulanger C, Regoli D, Vanhoulle PM: Bradykinin stimulates the production of cyclic GMP via activation of B₂ kinin receptors in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1990, 252(2): 581-5.
19. Stewart EDJ, Miinzcl T, Bassegne E: Reversal of acetylcholine-induced coronary resistance vessel dilatation by hemoglobin. *Eur J Pharmacol* 1987, 136: 239-42.
20. Yilmaz G, Aksulu HE, Demirel I, Ercan ZS, Zengil H, Turker RK: Modulation by endothelium of the vascular effects of angiotensin II. *Agents Actions* 1987, 21: 184-90.
21. Ercan ZS, Soydan AS, Turker RK: Possible involvement of endothelium in the responses of various vasoactive agents in rabbit isolated perfused kidney. *Gen Pharmacol* 1990, 21(2): 205-9.
22. Mostaghim P, Maddox YT, Ramwell PW: Endothelial potentiation of relaxation response by beta-adrenoceptor blocking agents. *J Pharmacol Exp Ther* 1986, 239: 797-801.

23. Lasky E, Adams DJ, Johns A, Rubanyi G M, Brccmen C: Membrane potential and Na⁺-K⁺ pump activity modulate resting and bradykinin-stimulated changes in cytosolic free calcium in cultured endothelial cells from bovine atria. *J Biol Chemistry* 1990, 265(5): 2613-14.
24. Morgan-Boyd R, Stewart JM, Vavret RJ, Ilassid A: Effects of bradykinin and angiotensin II on intracellular CA²⁺ dynamics in endothelial cells. *Am J Physiol* 1987, 253: C588-C598.
25. Altura BT, Altura BM: Endothelium-dependent relaxation in coronary arteries requires magnesium ions. *Br J Pharmacol* 1987,91:449-54.
26. Wood KS, Buga GM, Byrns RE, Ignarro IJ: Vascular smooth muscle-derived relaxing factor (MORF) and its close similarity to nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 170(1): 80-8.
27. Toda N, Minami Y, Gnaue II: Extraluminally applied acetylcholine and oxy hemoglobin on the release and action of EDRF. *Eur J Pharmacol* 1988,151: 123-6.
28. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S: The antiaggregating properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987, 92: 639-64.
29. Shimokawa II, Aarhus EE, Vanhoutte PM: Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have areduced endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Circ Res* 1987, 61: 256-70.
30. Shimokawa II, IHavahan NA, Ixirenz RR, Vanhoutte PM: Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br J Pharmacol* 1988,95: 1197-1203.
31. Doni MG, Whittle B,IR, Palmer RMJ, Moncada S: Actions of nitric oxide on the relasc of prostacyclin from bovine endothelial cells in culture. *Eur J Pharmacol* 1988, 151: 19-25.
32. Marin J, Sanchez-Ferrer CF: Role of Endothelium-formed nitric oxide on vascular responses. *Gen Pharmacol* 1990, 21(5): 575-87.
33. Warren JB, İçi R, Rendell NB, Taylor GW: Nitricoxide is inactivated by the bacterial pigment pyocyanin. *Biochem J* 1990, 266: 921-23.
34. Giyglewski RI: The role of oxygen-free radicals in the destruction of endothelium-derived relaxing factor. *Agents AClions* 1987, 22(3/4): 351-52.
35. Martin W, Smith JA, White DG: The mechanism by which haemoglobin inhibits the relaxation of rabbit aorta induced by nitrovasodilators, nitric oxide or bovine retractor penis inhibitory factor. *Br J Pharmacol* 1986,89:563-71.
36. Evans HG, Ryley HC, Iallett I, Ixwis MI: Human red blood cells inhibit endothelium-derived relaxing factor activity. *Eur J Pharmacol* 1989,163: 361-64.
37. Martin W, DRazan MK, Newby AC: Methylene blue but not changes in cyclic GMP inhibits resting and bradykinin-stimulated production of prostacyclin by pig aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1989, 97: 51-6.
38. Randall MD, Hiley CR: Detergent and methylene blue affect endothelium dependent vasorelaxation and pressure/flow relations in rat blood perfused mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol* 1988, 95: 1081-8.
39. Okamura T, Pashida K, Toda N: Suppression by methylene blue of prostaglandin 12 synthesis in isolated dog renal arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1990, 254: 198-203.
40. Komori K, Suzuki II: Heterogenous distribution of muscarinic receptors in the rabbit saphenous artery. *Br J Pharmacol* 1987,92:657-64.
41. Nishiye E, Nakao K, Itoh T, Kuriyama H: Factors inducing endothelium-dependent relaxation in the guinea-pig basilar artery as estimated from the actions of haemoglobin. *Br J Pharmacol* 1989, 96: 645-55.
42. Van de Voorde J, Eeusen I: Endothelium-dependent and independent relaxation of aortic rings from hypertensive rats. *Am J Physiol* 1986, 250: H711-H717.
43. Ijckette W, Otsuka Y, Carretero O: The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 1986, 8(Suppl.11) 61-66.
44. Aksulu HE, Celtek S, Türker RJC: Cholesterol feeding attenuates endothelium dependent relaxation response to acetylcholine in the main pulmonary artery of chickens. *Eur J Pharmacol* 1986, 129: 397-400.
45. Vanhoutte I'M, Liischer TP: Vascular endothelium and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987, 10(Suppl.4): S19-S24.
46. Osborne PM, Siegman MJ, Sedar AW, Moores SU, Lefcr AM: lack of endothelium dependent relaxation in coronary resistance arteries of cholesterol-fed rabbits. *Am J Physiol* 1989, 256: C591-C597.
47. Eudmer PI., Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P: Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Eng J Med* 1986, 315: 1046-51.
48. Andrews HE, Bruckdorfer KR, Dunn RC, Jacobs M: Low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Nature* 1987, 327: 237-9.
49. Warren JB: Maltby Nil, MacCormack D, Barends PJ: Pulmonary endothelium-derived relaxing factor is impaired in hypoxia. *Clin Science* 1989, 77: 671-6.
50. Rodman DM, Yamaguchi T, O'Brien RF, McMurtry IF: Methylene blue enhances hypoxic contraction in isolated rat pulmonary arteries. *Chest* 1988,93: 93-4.
51. Davidson D, Eldermerdash A: Endothelium-derived relaxing factor: Persistence in pulmonary and systemic arteries of the newborn guinea-pig. *Pediatr Res* 1990, 27: 128-32.
52. Orbay T, Ercan ZS, Seçkin Z, Göksel M: Pharmacologic response of endothelium to microvascular temporary clip application. *Surg Neurol* 1990,33: 192-4.
53. Bekmeier II, Kuhn C, Hirschelmann R: Role of EDRF in inflammation-induced vasodepression in the rat leg. *Agents Actions* 1989, 26(1/2): 219-21.
54. Kilagawa II, Takeda E, Kohci II: Effect of endothelium-derived relaxing factor on the gastric lesion induced by HCE in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1990, 153(3): 1133-7.