

Enterik Sinir Sistemi: Nitrik Oksit ve Vazoaktif İntestinal Polipeptid Arasındaki İlişki

Yrd.Doç.Dr.Yusuf ERGÜN

1.Giriş

Gastrointestinal kanalın tonus ve motilitesinin düzenlenmesi temel olarak otonom sinir sisteminin kontrolü altındadır. Otonom sinir sistemi parasempatik sistem, sempatik sistem ve non-adrenerjik non-kolinerjik (NANK) sistemden oluşur. Sayılan bu sistemlerin organizasyonu gastrointestinal sistemin duvarında diğer sistemlere göre bazı farklılıklar gösterir ve bu özelliğinden ötürü *enterik sinir sistemi* diye adlandırılır. Kolinerjik ve adrenerjik sistemin ucundan salınan nörotransmitterler sırasıyla asetilkolin ve noradrenalindir. Bu klasik sistemlerden ayrı olan NANK sinirlerin ucundan salınan inhibitör nöromedyatörlerin kimliği uzun zamandan beri araştırılmaktadır^{1,2}. Nitekim 1970'lerin başında adenozin ve ATP gibi pürinler³, ardından seksenli yıllarla birlikte vazoaktif intestinal peptid (VIP) ve P maddesi gibi nöropeptidler⁴ ve 90lı yıllarda nitrik oksit (NO) nöromedyatör adayları olarak ortaya atılmıştır⁵. NO *L-arjinin* aminoasidinden O₂ molekülünün de yer aldığı bir reaksiyonla *NO sentaz (NOS)* enzimi aracılığı ile sentezlenir⁶. Üç tip NOS enzimi mevcuttur: (1) Nöronal NOS (nNOS; tip-I), (2) indüklenebilen NOS (iNOS; tip-II) ve (3) endotelial NOS (eNOS; tip-III)⁶. NO'ya bağlı etkiler NO'nun kendisinden, hedef dokudaki reseptörü olan *solübl guanilat siklazı* aktive ederek açığa çıkardığı *cGMP*'den veya cGMP ile aktive olan *protein kinaz G (PKG)*'den kaynaklanabilir⁶.

Yapılan birçok immünohistokimyasal çalışmada enterik sinir sistemindeki nöronlarda NOS ve VIP'in birlikte lokalize olduğu gösterilmiştir. Ancak NO ile

*Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı,
KAHRAMANMARAŞ

VİP arasındaki ilişkinin boyutu konusunda görüş birliği oluşmamıştır. Araştırmacılar elde ettikleri bulgulara göre iki hipotez ileri sürmüşlerdir: (1) Paralel yolaklar hipotezi ve (2) seriyal-kaskad hipotezi.

Birinci hipotezde NO ve VİP'in sinirsel uyarı sonucu presinaptik bölgeden ayrı salıverildiği ve gevşeme cevaplarını birbirlerinden bağımsız olarak kendilerine has farklı ikinci ulak mekanizmalar ile meydana getirdikleri iddia edilmiştir. İkinci hipotezde ise, söz konusu olan memeli türüne göre değişmekle birlikte, NO veya VİP'in primer nörotransmitter olduğu, primer nörotransmitterin diğerinin salıverilmesini ya da üretimini presinaptik ve/ya da postsinaptik bölgede regüle edebileceği ve çeşitli tür ve dokularda farklılık gösteren bir etkileşme kalıbı olabileceği önerilmiştir.

Aşağıda her iki hipotezi destekleyen çalışmalar tarihsel gelişime göre sıralanmış, bu yapılırken gastrointestinal kanalın değişik bölümleri (özofagustan internal anal sfinktere kadar) detaylı bir şekilde incelenmiştir.

2.Özofagus ve alt sfinkteri

Özofagus ve alt sfinkteri sindirim sisteminin ağızdan sonra gelen ilk kısmını oluşturur ve en önemli işlevi besinlerin ağızdan mideye ulaştırılmasını sağlamaktır. Özofagusun duvarındaki çizgili ve düz kaslar oluşturdukları peristaltik hareketlerle besinlerin aşağıya doğru kaymasını sağlarlar; alt özofagus sfinkterine ulaşan besinler bu bölgenin gevşemesi ile mideye ulaşırlar. Günümüze kadar yapılan araştırmalar özofagusun bu fonksiyonunda adrenerjik ve kolinerjik sistemin klasik nörotransmitterleri kadar NO⁷ ve VİP'in (aşağıya bakınız) de rolünün olduğunu göstermiştir.

2.1. Özofagus

Sıçanda özofagusu da kapsayacak şekilde tüm gastrointestinal sistemde NOS ve VİP'in birlikteliği histokimyasal olarak gösterilmiştir; bu çalışmada spesifik bir nNOS belirteci olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-diaforaz (NADPH-diaforaz) boyama tekniği kullanılmıştır⁸. Aynı şekilde, *insan* özofagusunda NOS enziminin varlığı immünohistokimyasal ve NADPH-

diaforaz varlığı ile gösterilmiş, ayrıca VIP ve galanin gibi nöropeptidlerle birlikteliği anlamlı olarak tespit edilmiştir⁹. *Opozumda* yapılan başka bir çalışmada düz kas hücrelerinde NADPH-diaforaz tayini ile birlikte çeşitli nöropeptidlerin birlikteliğine bakılmış ve sonuç olarak NADPH-diaforaz aktivitesine calcitonin gene-related peptide (CGRP) (%59), galanin (%54) ve VIP (%53) gibi medyatörlerin eşlik ettiği saptanmıştır¹⁰. Benzer olarak *domuz* gastrointestinal kanalında NO içeren nöronlarla birlikte VIP ve galaninin varlığı gösterilmiştir¹¹.

Bu bulgular ışığında özofagusta NO ve VIP'in fonksiyonel bir rolü olabileceği sonucuna varılabilir; ancak paralel yollar ve seriyal-kaskad hipotezlerinin varlığını sorgulayan klasik farmakolojik çalışmalar bulunmamaktadır. Bu nedenle bu hipotezlerin özofagusta geçerliliğinin kanıtlanması araştırılması gereken açık bir alandır.

2.2.Özofagus alt sfinkteri

Opozum özofagus alt sfinkter şeritlerinde VIP (1 nM-1 µM) ile in vitro şartlarda oluşturulan gevşemeler bir NOS inhibitörü olan N ω -Nitro-L-arginine (L-NNA) tarafından değiştirilmemiştir¹². Benzer olarak *köpek* özofagus alt sfinkterinde VIP ile oluşturulan gevşemeler L-NNA tarafından etkilenmemiştir¹³. Aynı şekilde *opozum* alt özofagus sfinkterinde VIP ve CGRP ile oluşturulan gevşeme cevapları L-NNA varlığından etkilenmemiştir¹⁴. *Kedi* alt özofagus sfinkterinde histokimyasal olarak NADPH diaforaz ve VIP birlikteliği gösterilmiştir¹⁵. Aynı deney hayvanı türünde özofagus alt sfinkterinde kısa süreli elektriksel stimulus (ES) ile oluşturulan nöron kaynaklı gevşemeler L-NNA ile tümüyle ortadan kaldırılırken, L-NNA varlığında uzun süreli ES uygulandığında gevşeme yanıtları oluşmuş ve bunlar VIP-antiserumu ile inhibe edilmiştir¹⁶. *Kedi* özofagus alt sfinkterinde yapılan başka bir çalışmada, düşük frekans ve kısa süreli elektriksel gevşemelerden NO, yüksek frekans ve uzun süreli gevşemelerden ise VIP sorumlu bulunmuştur¹⁷. *Opozum* sfinkterinde ES ile oluşturulan gevşemeler bir solubl guanilat siklaz inhibitörü olan [1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one] (ODQ) ile bloke

olmuş ancak eksojen VİP gevşemeleri etkilenmemiştir: Sonuçta VİP'in NO-cGMP üzerinden etki yapmadığı ifade edilmiştir¹⁸. Aynı dokudaki başka bir çalışmada, VİP gevşemeleri L-NNA, ODQ ve bir adenilat siklaz inhibitörü olan SQ22536 ile inhibe olmuş ve VİP gevşemelerinden cAMP ve NO-cGMP aksınının sorumlu olabileceği önerilmiştir¹⁹. Öte yandan *domuzda* yürütülen bir çalışmada sodyum nitroprussid (SNP; NO donörü), VİP, Pituitary Adenilat Siklaz Aktive edici Peptid (PACAP) ve ATP gevşemeleri L-NAME ve ODQ ile bloke olmamıştır²⁰. ES'ye bağlı gevşemeler ise L-NAME ve ODQ ile anlamlı olarak inhibe edilmiş, non-nitrojenik ES gevşemeleri ise apamin (ATP duyarlı potasyum kanal inhibitörü) tarafından güçlü bir şekilde, alfa-kimotripsin (peptidaz) ile ise hafif bir şekilde önlenmiştir²⁰. Bu bulgular ışığında özofagus alt sfinkteri gevşemelerinden iki bileşenin sorumlu olduğu belirtilmiştir: İlki NO'nun rol aldığı nitrojenik bileşen, diğeri ise ATP ve kısmen VİP'in rol aldığı non-nitrojenik bileşendir²⁰. Bu nörotransmitterler arasında karşılıklı bir etkileşim tespit edilememiştir²⁰.

Özofagus alt sfinkterinde kısa süreli gevşemelerden NO, uzun süreli gevşemelerden ise VİP'in sorumlu olduğu söylenebilir. Ancak VİP ile NO arasındaki etkileşimi inceleyen altı çalışmadan sadece birinde ilişki bulunması fakat beşinde etkileşim saptanamaması bu dokuda seriyal-kaskad modelinden *paralel yollar hipotezinin* geçerli olduğunu telkin etmektedir (Tablo I).

Tablo I. Özofagus alt sfinkterinde VİP-NO etkileşimi

Metod	VİP-NO etkileşimi		Kaynak
	Var	Yok	
Opozum İzole organ		√	12
Köpek İzole organ		√	13
Opozum İzole organ		√	14
Opozum İzole organ		√	18
Opozum İzole organ	√		19
Domuz İzole organ		√	20

3. Mide

Mide fundusundaki NANK nöronlar besinlerin alınması esnasında ortaya çıkan, midenin akut olarak gevşemesine ve böylece lümen içi basıncın sabit kalmasına olanak sağlayan adaptif gevşemeden sorumludur²¹. Adaptif gevşemeden sorumlu gastrointestinal nörotransmitterlerin tespiti ve bunların etki prensipleri önemli bir araştırma alanı olmuştur ve bu konudaki araştırmalar halen devam etmektedir. Mide fundusunun NANK innervasyonunda rol alan gastrointestinal mediyatörlerden birinin VİP olduğu yönünde *kobayda*, *sıçanda* ve *kedide* yapılan çalışmalarda kanıtlar bulunmuştur^{22,23,24}. Bununla beraber NANK gevşemelerin VİP komponenti VİP-antiserumu ile bloke edildiğinde dahi rezidüel bir gevşeme kalmış ve bu, VİP'in dışında başka gastrointestinal nörotransmitterlerin de (Peptid Histidin İzolösin (PHI), ATP gibi) olabileceğini düşündürmüştür^{25,24}. Nitekim *sıçan* mide fundusunda oluşturulan NANK gevşemelerin bir PHI antiserumu ile azaltıldığı gösterilmiştir²⁶. Aynı dokuda NANK nöron kaynaklı gevşemeler α , β metilen ATP ile yapılan ATP desensitizasyonu ile inhibe olmuş, ayrıca ATP'nin ES'na bağlı olarak salıverildiği bulunmuştur²⁷. Daha sonra yapılan bir çalışmada, VİP'in ES (8, 16, 32 Hz, 2 dak) sonucu salıverildiği radyoimmünassay yöntemi ile *sıçan* mide fundusunda tespit edilmiştir²⁸.

Tüm bu gelişmelerin yanında damar endotelinde NO'nun asetilkoline bağlı gevşeme cevaplarından sorumlu olduğunun keşfedilmesi gastrointestinal sistemde de NO'nun rolünün olabileceği sorusunu gündeme getirmiştir. Bu görüşle paralel olarak *sıçan* mide fundusunda yapılan bir çalışmada NANK nöronların özellikle düşük frekans ve kısa süreli ES ile uyarılmasıyla açığa çıkan gevşemelerin N-monometil-L-arjinin (L-NMMA: NOS inhibitörü) ile güçlü şekilde inhibe olduğu ve NO'nun bu gevşemelerden ağırlıklı olarak sorumlu olabileceği tespit edilmiştir²⁹. Aynı çalışmada uzun süreli ES gevşemelerinin de L-NMMA varlığında daha az da olsa önlendiği, VİP-antiserumunun bu gevşemeleri kısmen bloke ettiği ve L-NMMA ile VİP-antiserumu kombinasyonunun inhibitör etkiyi daha da arttırdığı bulunmuştur²⁹. Üstelik VİP

(1 nM) ile oluşturulan gevşemelerin L-NMMA tarafından kısmen bloke edildiği, ancak 10 nM VİP gevşemelerinin ise etkilenmediği gösterilmiştir²⁹. Çalışmacılar kısa ve düşük frekanslı NANK nöron kaynaklı gevşemelerden NO'nun, yüksek frekanslı ve uzun sürelielerde ise VİP'in rol alabileceğini, bunların dışında ayrıca üçüncü bir medyatörün de katkısının olabileceğini ve nöronlardan salıverilen VİP'in NO üretimine sebep olarak gevşeme yanıtları ortaya çıkarabileceğini iddia etmişlerdir²⁹. Bu iki nörotransmitter adaylarından NO'nun solubl guanilat siklazı aktive ederek cGMP düzeylerini arttırdığı³⁰, VİP'in ise adenilat siklazı aktive ederek cAMP üzerinden etkilerini ortaya koyduğu başka çalışmalarda gösterilmiştir³¹. Ayrıca düşük frekanslardaki ES'nin cGMP üretimine ve VİP'in ve 5 Hz'lik ES'nin ise cAMP açığa çıkmasına neden olduğu *sıçan* mide fundusunda gösterilmiştir³². Aynı dokuda yapılan başka bir çalışmada ES (0.5, 1, 2, 4, 8 Hz, 20 s) ile oluşturulan NANK gevşemelerin L-NNA ile, rezidüel bir gevşeme kalmakla birlikte, önemli oranda inhibe olduğu, öte yandan VİP (0.1, 1 ve 10 nM) ve ATP (0.1 mM) gevşemelerinin bu NOS inhibitörü varlığında inhibe olmadığı bulunmuştur³³.

Kobay mide fundusunda, "bazal tonus"ta ES ile düşük frekanslarda ve yüksek frekanslarda elde edilen gevşeme yanıtları L-NNA tarafından sırasıyla tamamen ve orta derecede inhibe edilmiştir; ayrıca VİP (1, 10 ve 100 nM) ile oluşturulan gevşemeler L-NNA tarafından bloke edilmemiştir³⁴. Aksine *kobay* mide fundusu şeritlerinde elektriksel stimulusla (1, 8 Hz; 1 dk) "bazal tonus"ta oluşturulan gevşemelerin L-NNA ile kısmen inhibe olduğu, bu gevşemelere VİP salıverilmesi ile NO üretiminin eşlik ettiği, NO üretiminin L-NNA ile tamamıyla ortadan kaldırıldığı, VİP salıverilmesinin ise L-NNA ile kısmen inhibe olduğu gösterilmiştir³⁵. Ayrıca aksonal sodyum kanal blokleri olan tetrodotoksin VİP ve NO üretimini tamamıyla ortadan kaldırmıştır³⁵. Aynı dokuda düz kas şeritlerinde ve izole hücrelerinde tamamlanan deneylerde, VİP ile açığa çıkan gevşemelerin L-NNA ile anlamlı şekilde bloke olduğu, VİP'in etkisi sonucu üretimi artan NO'nun ise L-NNA varlığında tamamen ortadan kalktığı gösterilmiştir³⁵. Öte yandan izoprotorenol (beta-2 reseptör

agonisti, cAMP açığa çıkarır) VİP'in aksine sonuçlar vermiş ve NO üretimi ile alakası bulunamamıştır; bu da VİP'in NO üretimi üzerindeki etkisini cAMP aracılığıyla yapmadığını telkin etmektedir³⁵. Bu sonuçlar altında, VİP'in primer nörotransmitter olduğu, cAMP yolağıyla oluşturduğu gevşeme yanında, düz kas hücresinde üretimine neden olduğu NO sayesinde de gevşeme yanıtına katkı sağladığı ve NO'nun presinaptik uçtan VİP'in saliverilmesini arttırdığı ileri sürülmüştür³⁵.

Bu bulguların aksine *sıçan* mide fundusunda VİP (3 nM) ile ortaya çıkan gevşemeler bir NOS inhibitörü ile inhibe olmamıştır ve L-NNA nörondan VİP saliverilmesini de etkilememiştir³⁶. Aynı dokuda yapılan başka bir çalışmada, VİP gevşemelerinin L-NNA ile bloke olmadığı, NO gevşemelerinin de tripsin varlığında değişmediği tespit edilmiştir³⁷. Fonksiyonel farmakolojik bu çalışmaların yanında NOS enziminin varlığı immünohistokimya yöntemiyle *sıçan* mide duvarında ve vagal eferent sinirlerde gösterilmiştir; ancak VİP pozitif nöronlarda NADPH aktivitesine rastlanmamıştır^{38,39}.

Kobay mide fundusu düz kas hücrelerinde yapılan bir çalışmada, VİP'in cAMP yanında NO ve cGMP üretimine sebep olduğu, bu etkilerin L-NNA ve bir solubl guanilat siklaz inhibitörü varlığında engellendiği gösterilmiştir⁴⁰. Ayrıca, VİP ile açığa çıkan gevşeme cevaplarının L-NNA, solubl guanilat siklaz inhibitörü ve cGMP ile aktive olan PKG inhibitörü varlığında da azaltıldığı tespit edilmiş, öte yandan ekstraselüler NO yakalayıcısı olan oksihemoglobin etkisiz kalmıştır; bu nedenle VİP'in intraselüler NOS'u aktive ederek NO üretimine sebep olduğu sonucuna varılmıştır; ayrıca isoprenalin'in NO ve cGMP üretimine sebep olmadığı ancak maksimal gevşeme cevaplarının PKG inhibitörlerince azaltıldığı görülmüştür⁴⁰. Bu sonuçlar ışığında, VİP'in cAMP-PKA yolağına ek olarak NO-cGMP-PKG üzerinden de gevşemelere sebep olabileceği, isoprenalin'in ise yüksek dozlarında PKG aktive edebileceği sonucuna ulaşılmıştır⁴⁰.

Kedi mide fundusunda ES ile oluşturulan gevşemelerin kısa fazı L-nitro-arginine-methyl ester (L-NAME: NOS inhibitörü) ve daha az oranda tripsin ile

inhibe olmuş, uzun fazı ise tripsin ile bloke olmuş, bu iki ajan birlikte verildiğinde aditif bir etki ortaya çıkmıştır⁴¹. Sonuç olarak NO ve muhtemelen VIP'in bu gevşemelerde rol aldığı sonucuna varılmıştır⁴¹. Ayrıca VIP (100 nM) ile oluşturulan gevşemeler bu NOS inhibitörü ile etkilenmemiş, ancak aynı dokuda NO ile ortaya çıkan yanıtların plato kısmının bir peptidaz olan tripsin ile inhibe olduğu görülmüş ve bu fazda bir nöropeptid'in rolü olabileceği ileri sürülmüştür⁴¹.

Sıçan mide fundusunda nikotin gevşemeleri L-NAME ile azaltılırken eksojen NO ve VIP gevşemeleri etkilenmemiştir; metilen mavisi (guanilat siklaz inhibitörü) nikotin ve eksojen NO gevşemelerini azaltırken VIP gevşemelerine etki etmemiştir⁴². Ayrıca alfa-kimotripsin (bir peptidaz) VIP ile ortaya çıkarılan gevşemeleri tamamıyla ortadan kaldırırken nikotin gevşemelerinde kısmi inhibisyon yapmıştır; alfa-kimotripsin ile NOS inhibitörü kombinasyonu aditif etki göstermiş ama yine de rezidüel bir gevşeme kalmış ve buna dayanarak NO ve VIP'e ek olarak en az bir nörotransmitterin de rol alabileceği ifade edilmiştir⁴². Öte taraftan *kobay* mide fundusunda oluşturulan nikotin gevşemelerinden büyük oranda NO sorumlu bulunmuş, VIP ya da serotoninin katkısı yok denecek kadar az olduğu tespit edilmiştir⁴³.

Kobay mide fundusunda immünohistokimya yöntemiyle nöronal yapılarda (kas hücresinde negatif) NOS enziminin varlığı tayin edilmiş, vagal stimulusla oluşturulan gevşemeler L-NAME ile inhibe edilmiş, VIP ile oluşturulan gevşemeler L-NAME varlığından etkilenmemiş, ancak vagal stimülasyon, GTN ve SNP gevşemeleri VIP desensitizasyonu varlığında azalmıştır⁴⁴. Sonuç olarak VIP'in NO üretiminden bağımsız olarak gevşeme yaptığı, öte yandan NO ile VIP gevşemesinin cAMP-PKA ve cGMP-PKG düzeyinde etkileşebileceği önerilmiştir⁴⁴. Öte yandan, *tavşan* mide fundusu hücrelerinde yapılan deneylerde, nNOS ve eNOS'tan farklı olan bir NOS enziminin plazma membranındaki varlığı gösterilmiş, VIP'in bu enzimi G_{i1-2} proteinine bağlantılı reseptörüne bağlanarak ve Ca⁺⁺/kalmodüline bağımlı bir mekanizmayla aktive ettiği gösterilmiştir⁴⁵. Ayrıca, Ca⁺⁺ influksuna yola açan asetilkolin gibi

moleküllerin protein kinaz C'yi aktive edip NOS'u inhibe ettikleri için NOS'u aktive edemedikleri, ne zaman ki protein kinaz C enzimi bloke edilince bunlarında NOS aktivasyonuna sebep olduğu ifade edilmiştir⁴⁵. Üstelik in vitro şartlarda tonusu arttırmak için kullanılan ajanların protein kinaz C'yi aktive ederek NOS enzimini inhibe ettiğini, bu durumun da VIP'in NOS'u stimüle etmesini önlediği tavşan mide fundusunda yapılan bir çalışmada gösterilmiştir⁴⁶.

Domuz fundusunda ES ile oluşturulan kısa ve uzun süreli gevşemeler L-NAME varlığında belirgin bir şekilde inhibe olmuş, bir peptidaz olan alfa-kimotripsin ancak uzun süreli gevşemeleri az miktarda etkilemiştir⁴⁷. Dahası ES stimülasyonu ile cGMP üretimi tespit edilmiş ve cAMP üretiminin varlığı sadece uzun süreli stimuluslarda ortaya konmuştur⁴⁷. Ayrıca, sirküler ve longitudinal düz kasta VIP gevşemeleri L-NAME ile bloke olmamış, VIP'in ne cAMP ne de cGMP oluşumuna yol açmadığı, NO'nun ise sadece cGMP üretimine sebep olduğu gösterilmiştir⁴⁷. Öte yandan, NOS ve VIP'in enterik sinir ağında birlikte lokalize olduğu immünohistokimya ve histokimya yöntemleri ile tespit edilmiş ve yazarlar domuz mide fundusundaki nöron kaynaklı gevşemelerden NO ve VIP'in paralel olarak rol aldığını iddia etmişlerdir⁴⁷.

Tavşan ve *sıçan* mide fundusu şeritlerinde "bazal tonus"ta yürütülen bir çalışmada, eksojen NO'nun VIP saliverilmesine neden olduğu ve bu etkinin oksihemoglobin ile inhibe olduğu gösterilmiş ve bu nedenle NO'nun sinir ucundan VIP saliverilmesine yol açabileceği vurgulanmıştır⁴⁹. Aynı zamanda VIP'in L-NNA ve VIP-(10-28) (VIP reseptörü antagonisti) ile tamamen geri çevrilebilen NO üretimine ve bu ajanlarla kısmen bloke olan gevşemelere de sebep olduğu, oksihemoglobin ve tetrodotoksin (aksonal konduktans blokeri)'in etkisiz kaldığı tespit edilmiş ve bu bulgulara dayanarak yazarlar VIP'in düz kas hücrelerinde NO üretimine sebep olduğunu ve VIP gevşemesinde NO'dan ayrı bir mekanizmanın da çalıştığını belirtmişlerdir⁴⁸. Aynı çalışmada ES gevşemelerin VIP saliverilmesine, NO üretimine ve gevşemelere neden olduğu gösterilmiştir⁴⁸. Üstelik tüm elektriksel frekanslarla

oluşturulan NO üretimi L-NNA ve VİP-(10-28) tarafından neredeyse tamamen inhibe olurken, VİP saliverilmesi L-NNA ile düşük frekanslarda tamamen yüksek frekanslarda ise kısmen inhibe olmuş ve VİP-(10-28)'den etkilenmemiştir⁴⁸. Neticede VİP saliverilmesinin düşük frekanslarda tamamıyla NO'ya bağımlı olduğu ancak yüksek frekanslarda bu ilişkinin kısmen olduğu, NO üretiminin önemli bir bölümünün aksonda (presinaptik uç) değil düz kas hücresinde VİP aracılığıyla ortaya çıktığı ifade edilmiştir⁴⁸. Bununla paralel olarak düşük frekanslardaki düz kas gevşemeleri L-NNA ile belirgin olarak azaltılırken, VİP-(10-28)'den daha az fakat anlamlı olarak etkilenmiş ve yüksek frekanstaki gevşemeler ise L-NNA ile kısmen önlenmiştir⁴⁸. Sonuç olarak, tavşan ve sıçan mide fundusunda düşük frekanslı gevşemelerde NO'nun VİP saliverilmesine neden olduğu, bununda düz kas hücresinde NO üretimini tetiklediği, açığa çıkan NO'nun bir yandan gevşeme yanıtlarını ortaya çıkarırken diğer yandan VİP saliverilmesini arttırdığı iddia edilmiştir⁴⁸. Ayrıca, yüksek frekanslarda anlatılan yolağa ek olarak VİP'in NO'dan bağımsız olarak saliverilebileceği ve düz kas hücresinde NO üretimi yanında NO dışında bir yolla gevşemeye sebep olabileceği önerilmiştir⁴⁸.

Fare mide fundusunda yapılan bir çalışmada normal farelerin sirküler düz kas hücrelerinde ES ile oluşturulan inhibitör kavşak potansiyel (IKS)'nin tetradotoksine duyarlı olduğu, bu nedenle nöron kaynaklı maddelerin bu hiperpolarizasyondan sorumlu olduğu gösterilmiştir⁴⁹. Oluşan bu IKS'nin hızlı ve yavaş olmak üzere iki komponenti tespit edilmiştir: Hızlı bölümden ATP'nin yavaş bölümden ise NO ve VİP'in sorumlu olduğu düşünülmüştür⁴⁹. NNOS'u silinmiş mutant farelerde ise bu IKS'nin yavaş fazının ortadan kalktığı, kalan hızlı fazın ise NO ve VİP ile alakasız olduğu ve ATP'ya bağlı olarak ortaya çıktığı saptanmıştır⁴⁹. VİP normal farelerde L-NNA duyarlı hiperpolarizasyona neden olurken, nNOS knock-out farelerde hiperpolarizasyona sebep olmamıştır⁴⁹. Eksojen NO'in yaptığı hiperpolarizasyon VİP-(10-28)'den etkilenmediği gibi, bu hiperpolarizasyonun profili mutant farelerde farklılığa sebep olmamıştır⁴⁹. Bu sonuçlar altında, VİP'in NO üzerinden

hiperpolarizasyona sebep olduğu iddia edilmiştir⁴⁹. Son olarak, IKP, VİP ve NO ile ortaya çıkarılan hiperpolarizasyonlar nifedipin (L tipi Ca⁺⁺ kanal blokeri) ve ω-konotoksin (N tipi Ca⁺⁺ kanal blokeri) varlığında incelenmiş ve VİP'in etkisinin presinaptik olarak meydana geldiği sonucuna varılmıştır⁴⁹. Öte yandan, *kobay* mide fundusunda VİP'in neden olduğu hiperpolarizasyon L-NNA varlığından etkilenmemiştir⁵⁰.

Kobay mide fundusunda VİP, PACAP-27 ve PACAP-38 gevşemeleri L-NNA ile kısmen inhibe olmuştur⁵¹. Ayrıca ES'nin PACAP saliverilmesine sebep olduğu tespit edilmiştir: Sonuç olarak bu dokuda ES gevşemelerinden nöron kaynaklı VİP, PACAP ve NO ve düz kas kaynaklı NO'nun sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır⁵¹.

Mide fundusunda normal ve PKG I knockout farelerde VİP ve cAMP ile elde edilen gevşemelerde bir farklılık ortaya çıkmamış ve bu nedenle VİP ve cAMP'nin PKG I'den bağımsız olarak gevşeme yanıtlarına yol açtığına kanaat getirilmiştir⁵². *Sıçan* antrumunda in vivo yapılan bir çalışmada spontan gevşemelerin NO'ya bağlı olduğu ve bu gevşemelerin ATP gevşemelerini bloke eden P₂ reseptör antagonisti suramin ile bloke olmadığı görülmüş ve NO ile ATP arasında bir etkileşme olmadığı belirtilmiştir⁵³.

Köpek mide fundusunda "bazal tonus"ta oluşturulan VİP (1, 10, 100 nM) gevşemeleri L-NNA veya ODQ varlığında inhibe olmamış, adenilat siklaz inhibitörü olan MDL 12,330A SNP gevşemelerini etkilememiş, cGMP düzeyleri VİP ile arttırılmamış ve NO ve VİP'in karşılıklı etkileşmeden paralel olarak fundus gevşemesine yol açtıkları ifade edilmiştir⁵⁴. PKG I knock-out farelerde yapılan bir çalışmada eksojen VİP gevşemelerinin PKG I'dan bağımsız olduğu gösterilmiş ve bu peptide bağlı gevşeme yanıtlarının NO-cGMP-PKG I yolağının en azından son molekülünden bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır⁵⁵. Öte yandan aynı çalışmada 8 ve 16 Hz'lik elektriksel gevşemelerin uzun fazı (muhtemelen VİP'e bağlı) kısmen de olsa inhibe olduğundan PKG I'nin endojen VİP gevşemelerinde belli bir oranda rolünün olabileceğini düşündürmüştür⁵⁵.

İnsan mide fundusunda NOS ve VİP nöronlarının birlikte lokalizasyonu immünohistokimyasal olarak gösterilmiş, yapılan fonksiyonel organ banyosu deneylerine ES ile açığa çıkarılan gevşemelerde NO ve VİP'in rolünün olduğu ve VİP gevşemelerinin L-NNA ile inhibe olmadığı bulunmuştur⁵⁶. *Kobay* ve *domuz* mide fundus hücrelerinde VİP ile oluşturulan gevşemeler L-NNA, 1400W (iNOS inhibitörü), ODQ (solubl guanilat siklaz inhibitörü), R-p-cAMS (cAMP antagonisti, protein kinaz A inhibitörü) ve deksametazon (iNOS ekspresyon inhibitörü) tarafından inhibe edilmiştir; fundus şeritlerinde yapılan çalışmalarda ise bu ajanlardan L-NOARG, 1400W, ODQ ve deksametazonun VİP gevşemelerine etki etmediği tespit edilmiş ve yazarlar VİP gevşemelerinde NO'nun rolünün olmasını hücre izolasyonu esnasında aktive olan iNOS'dan kaynaklanan NO olduğu sonucuna varmışlardır^{57,58}.

Sıçan mide fundusunda "bazal tonus"ta yapılan bir çalışmada VİP (5 nM) gevşemeleri L-NNA, AMT (iNOS inhibitörü) ve ODQ ile inhibe olmamıştır⁵⁹. Zıt bir şekilde, *fare* mide fundusu "bazal tonus"unda VİP (50 nM) gevşemeleri L-NNA ve ODQ ile inhibe olurken, AMT ile bloke edilmemiştir ve VİP'in NO-cGMP üzerinden de gevşetici etkisinin olabileceği ileri sürülmüştür⁶⁰. Öte yandan *fare* mide fundusu düz kas hücrelerinde VİP ile açığa çıkan gevşemeler non-spesifik NOS inhibitörü olan L-NNA ve spesifik iNOS inhibitörü olan 1400W ile bloke olmuştur; ancak iNOS'a karşı oluşturulan antikorlarla deney hayvanlarındaki iNOS ortadan kaldırıldığında bu blokaj ortadan kalmış ve bu bulgular ışığında yazarlar VİP'e bağlı gevşemelerin hücre izolasyonu esnasında aktive olan iNOS enzimine bağlı olarak ortaya çıktığını iddia etmişlerdir⁶¹. *Fare* mide fundusunda yapılan başka bir çalışmada, izole düz kas hücrelerinde normal, eNOS knockout ve nNOS knockout farelerde VİP ile ortaya çıkan gevşemeler L-NNA ve 1400W ile inhibe olurken, iNOS knockout farelerdeki gevşemeler bu ajanlardan etkilenmemiştir⁶². Aynı çalışma klasik düz kas şeritlerinde yapıldığında normal ve knockout farelerde meydana getirilen VİP gevşemeleri L-NNA ve 1400W'dan etkilenmemiş ve VİP'in NO aracılığı ile yaptığı gevşemenin

sadece izole düz kas hücrelerinde meydana geldiği, izolasyon prosedürünün iNOS indüksiyonuna neden olduğu ve bu nedenle VİP'in NO aracılığıyla gevşemeye neden olduğu sonucuna varılmıştır⁶². Son olarak *insan* mide fundusu myenterik plexusunda NOS ve VİP veya P maddesi birlikte lokalizasyonu gösterilmiştir⁶³.

Yukarıda bahsi geçen NO-VİP etkileşimini araştıran çalışmaların majör sonuçları Tablo II'de özet olarak gösterilmiştir. NO-VİP etkileşiminin araştırıldığı çalışmalarda bulguların sağlıklı analiz edilmesini engelleyebilecek iki temel komplikasyondan bahsedilir. Bunlardan ilki "izole organ yerine izole hücre" metodu ile konunun araştırılmasıdır. Bazı yazarlara göre düz kas hücresinden hücre izolasyonu esnasında yapılan işlem iNOS aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu özel şartlarda VİP iNOS'u aktive ederek NO üretimine sebep olabilmektedir. Ancak iNOS aktivasyonu fizyolojik şartlarda mümkün görünmediğinden bu yazarlara göre gerçekte NO ile VİP arasında bir etkileşimin söz konusu değildir. Nitekim düz kas hücresi kullanılarak yapılan dokuz çalışmadan biri hariç hepsinde VİP-NO ilişkisi saptanmış, bunlardan da dördünde iNOS aktivasyonu belirlenmiştir. Her ne kadar bu ilişki fizyolojik şartlarda ve in vitro deneylerde mümkün görünmese de in vivo şartlarda ve birçok hastalık durumunda bu yolak devreye girebilir. Bu, patolojik hadisenin daha da kötüleşmesi yolunda çalışabileceği gibi aksi yönde bir kompensasyon mekanizması olarak da işlev görebilir. Örneğin diabetes mellitusta dejenere olan nitrerjik yolakların neden olduğu fonksiyon kaybı bu yolakla takviye edilebilir. Ancak bu görüş izole organ yöntemiyle yapılan ve seriyal-kaskad hipotezini destekleyen çalışmaları açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Denilebilir ki organ banyolarının kontaminasyonu iNOS aktivasyonuna sebep olabilir; ancak bizim yaptığımız çalışmalarda aynı organ banyosu ortamında iki farklı türde (fare ve sıçan) tamamen zıt sonuçlar bulunmuştur (bakınız, kaynak 59 ve 60). Farede VİP-NO etkileşimi tespit edilirken sıçanda bu sonuca varılamamıştır. Eğer organ banyosunda bir kontaminasyon ve buna bağlı iNOS aktivasyonu söz konusu olsaydı her iki

türde de etkileşim bulunurdu. Üstelik bu deneylerde kullanılan iNOS inhibitörü VİP gevşemelerine etki etmemiş ve iNOS aktivasyonuna bağlı bir etkileşimi ekarte etmiştir.

Verileri değerlendirmede sorun yaratabilecek ikinci komplikasyon “dokuya aktif tonus kazandırılması”dır. Fonksiyonel in vitro çalışmalarda düz kas hücresinde gevşeme yanıtlarının daha net elde edilebilmesi ve inhibitör nörotransmitterlerin değerlendirilebilmesi için izole edilen organa veya hücreye aktif tonus kazandırılır. Bunun için çeşitli kastırıcı ajanlar kullanılır. Bu ilaçların ortak özelliği intrasellüler kalsiyum düzeylerini arttırarak kasılmaya sebep olmalarıdır. Bunu yaparlarken protein kinaz C de aktive olur. Bazı yazarlara göre bu aktivasyon NOS enzimi üzerinde oluşan fosforilasyonla bu enzimin aktivite kaybına yol açar. Bu sonuncu etki de VİP’in NOS enzimini aktive etmesini önleyebilir. Bu nedenle bu görüşe göre aktif tonus kazandırılmış ve PKC etkisine maruz kalan dokularda VİP-NOS etkileşimi maskelenebilir ve yanlışlıkla etkileşim yokmuş sonucu çıkabilir. Bugüne kadar herhangi bir kontraktil ajan kullanmadan bazal tonusta yapılmış çalışmaların yarısından paralel yolaklar hipotezi diğer yarısından ise serial-kaskad hipotezini destekleyen bulgular elde edilmiştir. Üstelik seriyal-kaskad hipotezini destekleyen birçok çalışmada aktif tonus kazandırılmış olması da vurgulanması gereken önemli bir noktadır. Bu nedenle PKC’ye bağlı bir maskeleme her doku için geçerli olmayabilir. Bizim fare ve sıçanlarda yaptığımız çalışmada bazal tonusta çalışılmış ve yukarıda ifade edildiği gibi zıt sonuçlar elde edilmiştir.

Mide fundusunda yapılan araştırmalarda hangi hipotezin geçerli olduğu konusunda bir uzlaşma oluşmamıştır. Muhtemelen değişik türlerde VİP-NO etkileşimi farklılık göstermektedir. Öte yandan sorunun yanıtını bulmak adına, insan da dâhil olmak üzere belirli türlerde izole organ ve hücre metodlarını birlikte içeren, iNOS ve özellikle PKC knock-out farelerin kullanıldığı ve ayrıca bu moleküllerin farmakolojik olarak da bloke edildiği kapsamlı deneylerin tasarlanması yarar sağlayacaktır. Ancak bu şekilde VİP ve NO arasında ne

tür bir ilişki olduğu sağlıklı bir şekilde aydınlatılabilir. Ayrıca bu ilişkinin hastalık hallerindeki durumu da değerlendirilmeli ve olası tedavi seçeneklerine katkısı irdelenmelidir.

4. Duodenum

Her ne kadar *sıçan* duodenumunda NOS-pozitif nöronların VİP ile birlikte varlığı gösterilmişse de⁸ VİP ve ATP ile izole şeritlerde oluşturulan gevşemeler L-NAME ve L-NNA varlığından etkilenmemiştir⁶⁴. Bu son çalışmanın aksine *sıçan* duodenumunda VİP ile oluşturulan gevşemelerin L-NAME ile inhibe olduğu in vivo olarak yapılan bir çalışmada gösterilmiştir⁶⁵. *Sıçan* duodenumunda in vivo yapılan diğer bir çalışmada iki tip bağırsak aktivitesi kaydedilmiştir: Propulsif grup aktivite ve non-propulsif grup-arası aktivite⁵³. Grup gevşemeleri L-NAME ile artarken grup-arası gevşemeler bloke olmuştur⁵³. ATP gevşeme yanıtları oluşturmuş ve bunlar P₂ antagonisti suramin ile ortadan kalkmıştır⁵³. Suramin grup gevşemelerini inhibe ederken grup-arası olanlara etki etmemiştir⁵³. Grup içi gevşemeler P_{2X} grup-arası olanlar ise P_{2Y} desensitizasyonu ile azaltılmış ve P_{2Y} agonisti ile oluşturulan gevşemeler L-NAME ile bloke olmuştur⁵³. Sonuçta grup içi gevşemelerden P_{2X} vasıtasıyla ATP'nin, grup-arası gevşemelerden NO'nun sorumlu olduğu ve bu sonuncunun P_{2Y} aracılığıyla ATP'den etkilendiği iddia edilmiştir⁵³. *Sıçanda* ex vivo perfüze edilen duodenumda yapılan bir çalışmada VİP yanıtlarının L-NNA ile inhibe olduğu tespit edilmiştir⁶⁶. *Opozum* duodenumunda NOS ve VİP immünoaktivitesi myenterik pleksusta tespit edilmiştir⁶⁷. Üstelik insan dokusundaki myenterik nöronların da NOS ve VİP birlikte lokalizasyonu gösterilmiştir⁶⁸.

Mide ile karşılaştırıldığında, NO ile VİP veya diğer nörotransmitterlerin etkileşimini araştıran çalışmalar duodenumda oldukça seyrek (Tablo III). Sonuç olarak NOS ve VİP'in bağırsak duvarında birliktelik gösterdiği tespit edilmiştir; ancak NO-VİP etkileşmesi açısından in vitro yapılan bir çalışmada paralel yollar hipotezi desteklenirken in vivo ve ex vivo yapılan iki çalışmada seriyal-kaskad hipotezini destekleyen bulgulara ulaşılmıştır.

Tablo II.Mide fundusunda VIP-NO etkileşimi (BT: Bazal tonus)

Tür	Metod	VIP-NO etkileşimi		Kaynak
		Var	Yok	
Sıçan	İzole organ	√ (VIP: 1 nM)	√ (VIP: 10 nM)	29
Sıçan	İzole organ		√	33
Kobay	İzole organ (BT)		√	34
Kobay	İzole hücre-organ (BT)	√-√		35
Sıçan	İzole organ		√	36
Sıçan	İzole organ		√	37
Kobay	İzole hücre-organ	√-√		40
Kedi	İzole organ		√	41
Sıçan	İzole organ		√	43
Kobay	İzole organ	√ (NO-VIP)	√	44
Tavşan	İzole hücre	√		45
Domuz	İzole organ		√	47
Tavşan/Sıçan	İzole organ (BT)	√		48
Fare	İzole hücre	√		49
Kobay	İzole hücre		√	50
Kobay	İzole organ	√		51
Fare	İzole organ		√	52
Köpek	İzole organ (BT)		√	54
İnsan	İzole organ		√	56
Kobay	İzole hücre-organ	√ (hücre: iNOS)	√ (organ)	57
Domuz	İzole hücre-organ	√ (hücre: iNOS)	√ (organ)	58
Sıçan	İzole organ (BT)		√	59
Fare	İzole organ (BT)	√		60
Fare	İzole hücre	√ (iNOS)		61
Fare	İzole hücre-organ	√ (hücre: iNOS)	√	62

Ayrıca ATP ile NO arasında bir etkileşim de ihtimal dâhilindedir. Düodenumunda NO-VİP etkileşmesini aydınlatmak için daha detaylı çalışma yapmak gerekmektedir.

5.Oddi sfinkteri

Oddi sfinkteri safra ve pankreas enzimlerinin düodenuma dökülmesinde önemli bir role sahiptir. *Opozumda* ve *insanda* NOS ve VİP immünoaktivitesi myenterik pleksusta tespit edilmiştir^{69,70}. *Tavşan* oddi sfinkterinde NO-cGMP yolağının VİP salıverilmesine sebep olduğu, VİP'in etkisiyle açığa çıkan cAMP'nin de K_{ATP} 'yi stimüle edip gevşemeye neden olduğu ileri sürülmüştür⁷¹.

Açıkça görüldüğü gibi oddi sfinkterinde bu konuyu araştıran çalışma yok denecek kadar azdır (Tablo III) ve araştırmacılar için incelenmeyi bekleyen bakir bir alan olarak durmaktadır.

6.Jejunum

At jejunumunda myenterik pleksusta NADPH-diaforaz ve VİP birlieliği gösterilmiş ancak VİP gevşemeleri NO inhibisyonundan etkilenmemiştir⁷². *Fare* jejunumunda ES ile oluşturulan gevşemelerin L-NNA ve VİP antagonisti kombinasyonu ile tamamen ortadan kalktığı, nöron kaynaklı NANK gevşemelerden NO ve VİP'in sorumlu olduğu bulunmuştur; ancak bu iki transmitter arasında etkileşim olup olmadığına bakılmamıştır⁷³. Öte yandan *insan* jejunumunda NO'nun rolü olduğu gösterilirken VİP ve ATP'nin NANK gevşemelerden sorumlu olmadığını destekleyen bulgular elde edilmiştir⁷⁴. *Hamster* jejunumunda yapılan başka bir çalışmada ES ve eksojen NO sirküler düz kas hücrelerinde hızlı ve yavaş olarak iki komponentten oluşan bir hiperpolarizasyona yol açmışlar ve ES'ye bağlı bu etki L-NAME, oksihemoglobin ve ODQ ile ortadan kaldırılmıştır⁷⁵. Benzer olarak NO'ya bağlı hiperpolarizasyon oksihemoglobin ve ODQ ile tamamen önlenmiştir⁷⁵. Bu bulgulara dayanarak ES ile ortaya çıkan hiperpolarizasyona NO'nun yol açtığı ifade edilmiştir. Ayrıca bir VİP antagonisti ile ES ve NO'ya bağlı

hiperpolarizasyonun yavaş kısmının ortadan kalktığı ve ES ve NO ile düz kas şeritlerinde VIP saliverilmesi ve cAMP üretiminin tespit edilmesi ve bunların ODQ ile bloke edilmesi bu dokuda NO'nun enterik nöronlardan VIP saliverilmesini sağlayabileceği ve hiperpolarizasyonun hızlı fazından NO'nun yavaş fazından ise NO'nun salgılattığı VIP'in sorumlu olduğu sonucunun çıkarılmasına olanak tanımıştır⁷⁵. Her ne kadar VIP'e bağlı hiperpolarizasyon L-NAME ya da ODQ ile bloke olmamış ve VIP'in bu etkisinin NO'dan bağımsız olabileceği belirtilmişse de VIP'in cGMP üretimine sebep olduğu ve

Tablo III. İnce bağırsakta VIP NO etkileşimi (BT: Bazal tonus)

Tür (segment)	Metod	VIP-NO etkileşimi		Kaynak
		Var	Yok	
Duodenum				
Sıçan	İzole organ		√	64
Sıçan	İn vivo	√		65
Sıçan	Ex vivo	√		66
Oddi sfinkteri				
Tavşan	İzole organ	√ (NO-VIP)		71
Jejunum				
At	İzole organ		√	72
Hamster	İzole organ	√		75
Sıçan	İzole organ		√	77
İleum				
Kobay	İzole hücre	√		78
Kobay	İzole gangliyon	√ (NO-VIP)		79
Kobay	İzole hücre	√		82
Sıçan	İzole sinaps	√ (NO-VIP)		83
Sıçan	İzole organ		√	85
Sıçan	İzole sinaps	√ (NO-VIP)		86

bunun L-NAME ile innibe olduğu gösterilmiştir⁷⁵. Fare jejunumunda ES ile

oluşturulan gevşemeler L-NNA ile kısmen inhibe olmuş ve NO'nun rolü teyit edilmiştir; ayrıca L-NNA dirençli reziduel gevşemelerden ATP'nin sorumlu olduğu, P_{2Y1} başta olmak üzere P_{2X} reseptörlerinin bu etkiye aracılık ettiği ifade edilmiştir⁷⁶. Öte yandan ATP gevşemeleri L-NNA varlığından etkilenmemiş ve bu iki molekül arasında bir etkileşim olduğuna dair bir kanıt bulunamamıştır⁷⁶. *Sıçan* jejunumunda yapılan bir çalışmada, ES ile oluşturulan gevşemelerden sadece NO'nun sorumlu olduğu, eksojen NO gevşemelerinin VPAC1 ve 2 reseptör antagonistleri, PACAP reseptör antagonisti ve P_{2Y} reseptör antagonisti ile inhibe olmadığı, VIP gevşemelerinin de L-NAME varlığından etkilenmediği gösterilmiş ve neticede NO ile VIP arasında bir etkileşmeye rastlanmamıştır⁷⁷.

Jejunumda nöron kaynaklı gevşemelerde NO, VIP ve ATP'nin türe göre değişen oranlarda katkısı bulunduğu söylenebilir. Ancak kısıtlı sayıda çalışma bu medyatörler arasındaki ilişkinin kati temellere oturtulmasına bir engel teşkil etmektedir (Tablo III).

7. İleum

Kobay sirküler düz kas hücrelerinde ES hızlı IKP'ye neden olmuş, bunun ATP'ye bağlı olduğu gösterilmiş, ATP blokajı ve P maddesi desensitizasyonu varlığında yavaş IKP açığa çıkmıştır⁷⁸. IKP'nin yavaş fazı L-NNA ile ortadan kalkmıştır⁷⁸. Ayrıca, eksojen ATP ile beliren hiperpolarizasyon L-NNA ve P maddesi desensitizasyonundan etkilenmemiştir⁷⁸. Benzer olarak eksojen NO'ya bağlı hiperpolarizasyon da L-NNA, P maddesi desensitizasyonu ve tetrodotoksin varlığından etkilenmemiştir⁷⁸. Aksine VIP'e bağlı hiperpolarizasyon tetrodotoksin varlığından etkilenmese de P maddesi desensitizasyonu ile artarken L-NNA bu cevapları inhibe etmiştir⁷⁸. Sonuç olarak kısa süreli IKP'den ATP'nin, uzun olandan ise VIP ve NO'nun hangisinin primer olduğu net olmayan bir seri halinde sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır⁷⁸. *Kobay* ileumundan izole edilen myenterik gangliyonda, nikotinik reseptör agonisti olan DMPP L-sitrülin (NO üretimini yansıtır) ve VIP salıverilmesine neden olmuştur⁷⁹. NO üretimi

tetrodotoksin, heksametoniyum ve L-NNA ile tamamen ortadan kaldırılırken, VİP üretimi ek olarak guanilat siklaz inhibitörü ve protein kinaz G inhibitörü ile de önlenmiştir⁷⁹. Ayrıca eksojen NO VİP salıverilmesine sebep olurken VİP NO üretimine yol açmamıştır⁷⁹. Neticede gangliyon hücrelerinin DMPP ile uyarılması ile NO sentezinin arttığı, bunun da cGMP-protein kinaz G üzerinden VİP salıverilmesine neden olduğu ifade edilmiştir⁷⁹. *Sıçan* ileumu duvarında ATP ve NO'nun birlikte lokalizasyonu nöronların belli bir oranında gösterilmiştir⁸⁰.

Sıçanda ES gevşemelerinden NO ve ATP'nin sorumlu olduğu, ATP'nin dokuda cGMP kümülasyonuna neden olmadığı gösterilmiştir⁸¹. *Kobay* ileumu düz kas hücrelerinde VİP gevşemeleri adenilat siklaz inhibitörü N-etilmaleamid (NEM) ve somatostatin (SS) ve bir protein kinaz A (PKA) inhibitörü tarafından neredeyse tamamıyla bloke olurken, L-NMMA ve L-NAME ile %90 oranında inhibe olmuştur⁸². Benzer olarak adenilat siklaz aktivatörü forskolin ve bir cAMP analogunun yaptığı gevşeme yanıtları PKA inhibitörü ile ortadan kaldırılırken NOS inhibitörlerince %70 civarında bloke olmuştur⁸². Ayrıca VİP ve forskolin'in sebep olduğu cGMP üretimi L-NMMA ile tümüyle önlenmiştir⁸². Öte yandan VİP ve forskolin gevşemeleri bir iNOS inhibitörü olan deksametazonla engellenmiştir⁸². Sonuç olarak VİP'in cAMP-PKA üzerinden NOS'u aktive edip NO üretimine sebep olduğu, NO'nun da cGMP vasıtasıyla VİP gevşemelerine kısmen katkıda bulunduğu ifade edilmiştir; ancak iNOS inhibitörü deksametazonun etkisi dikkate alınmamış ve NO üretiminin iNOS'a bağlı olabileceği irdelenmemiştir⁸². *Sıçan* distal ince bağırsağında NO donörleri SNP ve SIN-1, bir cGMP analogu ve L-argininin izole edilmiş sinapslardan VİP salıverilmesine sebep olduğu gösterilmiştir⁸³. P maddesinin ileumda peristaltik hareketi inhibe etmesinde NK1 reseptörleri vasıtasıyla açığa çıkan NO'nun aracılık ettiği tespit edilmiştir⁸⁴. *Sıçan* ileumunda VİP ile oluşturulan gevşemeler L-NAME ile inhibe olmamıştır⁸⁵. *Sıçan* ince bağırsağından elde edilen sinaptozomlarda SNAP ve benzeri NO donörlerinin VİP salıverilmesine yol açtığı, bu etkinin oksihemoglobin, guanilat

siklaz inhibitörü ODQ ve protein kinaz G inhibitörü KT5823 ile bloke olduğu gösterilmiştir⁸⁶. Ayrıca L-arjinin ile stimüle edilen endojen NO üretiminin VİP salıverilmesine neden olduğu, bu etkinin oksihemoglobin ile inhibe olmazken, L-NNA, guanilat siklaz inhibitörü ODQ ve protein kinaz G inhibitörü KT5823 ile önlediği tespit edilmiştir⁸⁶. Öte yandan VİP'in NO salıverilmesine yol açmadığı da belirlenmiştir⁸⁶. Sonuç olarak NO'nun VİP salıverilmesine sinaps içinde sebep olduğu söylenmiştir⁸⁶.

İleumda yapılan çalışmalar göstermiştir ki NO, eksojen ya da endojen, VİP salıverilmesine neden olmaktadır (Tablo III).

8. İleokolonik bileşke

NO'nun NANK gevşemelerde rolü olduğu köpekte yapılan çalışmalarda gösterilmiş ve ATP gevşemelerinin NOS inhibitörleri ile bloke olduğu tespit edilmiştir^{87,88}.

9. Kolon

Köpek izole kolonunda yapılan bir çalışmada VİP fazik kontraktil aktiviteyi doza bağımlı olarak inhibe etmiştir; bu inhibisyon L-NNA, tetrodotoksin ve bu iki maddenin kombinasyonu ile aynı oranlarda önlenmiştir⁸⁹. Bu nedenle L-NNA'a duyarlı VİP gevşemesinin sinirde oluşan aksiyon potansiyeline bağlı olduğu ifade edilmiştir ve bir şekilde NO ile ilişkili bulunmuştur⁸⁹. Benzer olarak *sıçan* kolonunda VİP'in NO üretimine sebep olduğu ve VİP gevşemelerinin NOS inhibitörlerince kısmen inhibe olduğu bulunmuştur⁹⁰.

İnsan kolonunda PACAP-(1-38), PACAP-(1-27) ve VİP spontan fazik kontraktil aktiviteyi bloke etmiş ve karbakolle kastırılmış dokuda gevşeme yanıtlarına sebep olmuştur⁹¹. Bu yanıtlar NOS inhibisyonu ile kısmen ortadan kalkmıştır; ayrıca apamin PACAP yanıtlarını tetraetilamonyum da VİP yanıtlarını bloke etmiştir⁹¹. Bu bulgular ışığında NO ile bir etkileşme tespit edilmiş ve bu peptidlerin değişik K⁺ kanalları ile etki yaptıkları saptanmıştır⁹¹.

Sıçan kolonunda yapılan bir çalışmada kolon şeritleri 1 ve 8 Hz ES ile uyarılmış, ortaya gevşeme yanıtları, NO üretimi ve VİP üretimi çıkmıştır⁹². L-

NNA NO üretimini tamamen ortadan kaldırırken VİP üretimi ve gevşemeler kısmen inhibe olmuştur⁹². Bu bulgular ışığında VİP saliverilmesinin NO tarafından regüle edebileceği ve NO yokluğundaki gevşemelerin ise rezidüel VİP'e bağlı olabileceği söylenmiştir⁹². Ayrıca VİP izole şeritlerde ve düz kas hücrelerinde gevşeme yapmış ve NO üretimine sebep olmuştur; bu etkileri L-NNA tarafından sırasıyla kısmen ve tamamen önlenmiştir⁹². Üstelik VİP'in izole hücrelerde yaptığı gevşemeler bir PKA inhibitörü ile %76 PKG inhibitörü varlığında ise %35 oranında inhibe olmuş, ikisi birlikte verildiğinde ise tamamıyla ortadan kalkmıştır: Bu sonuçlar VİP'in direkt olarak cAMP-PKA üzerinden ve endirekt olarak NO-cGMP-PKG üzerinden gevşemeye sebep olduğu görüşünü ortaya koymuştur⁹². Neticede VİP'in presinaptik olarak saliverildiği, düz kas hücresinde NO üretimine yol açtığı, açığa çıkan bu NO'nun gerek düz kas gevşemesi gerekse presinaptik VİP saliverilmesini arttırdığı ileri sürülmüştür⁹².

İnsan kolonunda ES ile açığa çıkan gevşemeler L-NNA ile güçlü, apamin ile zayıf, ikisi ile beraber tamamen bloke olmuştur⁹³. Öte yandan ATP gevşemeleri L-NNA varlığından etkilenmemiş ve NANK gevşemelerden NO ve muhtemelen ATP'nin sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır⁹³.

Köpek ileum ve kolonunda NOS ve VİP'in aynı nöronlarda fakat farklı organellerde lokalize olduğu gösterilmiştir⁹⁴. *Sıçan* kolon duvarında ATP ve NO'nun birlikte lokalizasyonu nöronların neredeyse tamamında gösterilmiştir²⁷. Düz kas ve hücresinde yapılan bir çalışmada endojen ve eksojen VİP'e bağlı gevşemelerin NO'dan bağımsız meydana geldiği gösterilmiştir⁹⁵. Öte yandan başka bir çalışmada ES ve kolonik segmentlerin gerilmesiyle oluşan desendan gevşemelerden PACAP'ın sorumlu olduğu ve PACAP saliverilmesinin L-NNA ile önemli oranda bloke olduğu bulunmuştur⁹⁶.

Kobay proksimal kolonunda VİP (0.3-3 μ M) gevşemeleri L-NNA varlığından etkilenmezken ATP (10 μ M) gevşemeleri önlenmiştir⁹⁷.

İnsan kolonunda NOS ve VİP birlikteliği özellikle sirküler düz kaslara yayılan sinir liflerinde ve myenterik pleksusta immünohistokimyasal olarak

gösterilmiştir^{98,99}. Ayrıca insan intestinal düz kas hücrelerinde eNOS varlığı tespit edilmiştir¹⁰⁰.

Sıçan proksimal kolonunda ex vivo yapılan bir çalışmada VİP motor aktiviteyi inhibe etmiş, bu etki VİP reseptör antagonisti VİP(10-28) ve L-NNA ile tamamen bloke olmuş, ayrıca VİP'in NO üretimine sebep olduğu ve bunun da L-NNA ile önlediği tespit edilmiştir; bu nedenle VİP'in düz kas hücreesindeki reseptörü aracılığıyla bu etkiyi meydana getirdiği ve NO'nun buna aracılık ettiği söylenmiştir¹⁰¹.

Bu bulguların ışığında NO ve VİP arasında bir etkileşim olduğu söylenebilir (Tablo IV). VİP NO üretimine sebep olmakta, NO ise VİP saliverilmesini arttırmaktadır.

10. İnternal anal sfinkter

Opozum internal anal sfinkterinde VİP gevşemeleri bir NOS inhibitörü ile anlamlı olarak azaltılmıştır¹⁰². Bu bulguların tam tersi aynı dokuda yapılan başka bir çalışmada bildirilmiştir¹⁰³. Daha sonra aynı dokuda VİP'in NO saliverilmesine neden olduğu ve bunun L-NNA ile ortadan kalktığı gösterilmiştir¹⁰⁴. Dahası aynı çalışmacılar aynı dokuda ES, VİP ve NO'ya bağlı gevşemelere cAMP ve cGMP yükselişinin eşlik ettiğini bazal tonusta yaptıkları çalışmada göstermişlerdir¹⁰⁵. *Opozum* internal anal sfinkterinde NOS ve VİP'in nöronlardaki birlikteliği gösterilmiştir¹⁰⁶. *Opozumda* yapılan başka bir çalışmada betanokol ile kastırılmış düz kas hücrelerinde VİP ile açığa çıkan gevşemeler L-NNA ile inhibe olmamıştır; öte yandan bir nikotinik gangliyon reseptör agonisti olan DMPP myenterik gangliyonda NO üretimine sebep olurken düz kas hücrelerinde böyle bir etkiye yol açmamıştır¹⁰⁷. NO üretimindeki benzer bir artışa VİP de sebep olmuştur ancak VİP hem düz kas hücrelerinde hem de myenterik gangliyonda bu artışa sebep olmuş ve bu etkiler L-NNA ile ortadan kalkmıştır¹⁰⁷. Sonuçta VİP'in ağırlıklı olarak myenterik gangliyonda NO üretimi yaptığına karar verilmiştir¹⁰⁷. *Opozumdaki* benzer bir çalışmada PACAP'ın sırasıyla kasılma ve gevşemeye sebep olduğu, kasılmanın P maddesi nöronlarındaki PACAP reseptörleri vasıtasıyla

gevşemenin ise direkt düz kas etkisi ve kısmen de myenterik inhibitör nöronlara (nitretrjik) etki ederek oluştuğu bildirilmiştir¹⁰⁸. Aynı dokuda eksojen NO'nun nöronlardan PACAP ve VIP saliverilmesine yol açtığı gösterilmiştir¹⁰⁹.

İnternal anal sfinkterde VIP ile NO etkileşimini inceleyen çalışmaların hemen hemen hepsi opozumda yapılmış ve sonuçlar bir çalışma hariç seriyal-kaskad hipotezini desteklemiştir (Tablo IV).

11.Sonuç

Günümüzde NO ve VIP'in enterik sinir sisteminin NANK kısmının iki önemli medyatörü olduğu bilinmektedir. Bu iki nörotransmitterin gastrointestinal motiliteye katkısı türe, kanalın segmentine göre farklılık göstermektedir. Bu iki molekül arasındaki etkileşimi inceleyen yüzün üzerinde makale yayınlanmıştır. Sonuç olarak iki temel hipotez ortaya çıkmıştır.

Birincisi paralel yollar hipotezidir ve burada öngörülen senaryo şu şekildedir: NO ve VIP enterik sinir sisteminde birlikte lokalize olurlar, sinir uçları düşük frekanslarla uyarıldığında sadece NO, yüksek frekanslarla uyarıldığında ise NO'ya ek olarak VIP saliverilir. NO genellikle düz kas hücrendeki reseptörü olan solubl guanilat siklazı aktive edip cGMP açığa çıkararak ve ardından PKG'yi aktive ederek gevşeme ve benzeri etkilerini oluşturur. VIP de genellikle düz kas hücrendeki adenilat siklazı aktive edip cAMP açığa çıkmasına ve PKA aktivitesinin artmasına bağlı olarak etkilerini meydana getirir. Bu farklı iki yolak arasında hiçbir düzeyde etkileşme yoktur.

İkinci hipotez ise seriyal-kaskad'dır ve en sık kabul edilen etkileşme şu şekildedir: Enterik sinir sisteminin presinaptik uçlarında NO ve VIP birlikte lokalize olmuştur. VIP presinaptik uçtan saliverilen primer nörotransmitterdir ve sinaps boşluğunu geçip düz kas hücrendeki reseptörüne bağlanarak NOS'u aktive eder ve NO üretimine sebep olur. Üretilen NO da tekrar presinaptik bölgeden VIP saliverilmesini sebep olur. Sonuçta düz kastaki gevşemenin iki komponenti oluşur: Birincisi VIP-cAMP-PKA'ya, ikincisi VIP-NO-cGMP-PKG'ye bağlı olandır. Bu klasik hipoteze alternatif hipotezlerde vardır. Bunlardan bir tanesinde NO presinaptik bölgeden saliverilir; bu NO'nun bir

kısmı düz kasa geçer ve cGMP-PKG ile gevşeme yapar, kalan NO ise presinaptik bölgeden VİP saliverilmesini sağlar. Saliverilen VİP düz kasta gevşeme yaptığı gibi NO üretimine de sebep olur. Öte yandan VİP presinaptik olarak NO saliverilmesine de sebep olur.

Tablo IV. Kalın bağırsak ve internal anal sfinkterde VİP-NO etkileşimi

Tür (segment)	Metod	VİP-NO etkileşimi		Kaynak
		Var	Yok	
Kolon				
Köpek	İzole organ	√		89
Sıçan	İzole organ	√		90
İnsan	İzole organ	√		91
Sıçan	İzole hücre-organ (BT)	√-√		92
Kobay	İzole organ		√	97
Sıçan	İzole organ	√		101
İnternal anal sfinkter				
Opozum	İzole organ (BT)		√	103
Opozum	İzole organ (BT)	√		102
Opozum	İzole organ (BT)	√		104
Opozum	İzole organ (BT)	√		105
Opozum	İzole hücre	√ (BT)	√ (aktif tonus)	107
Opozum	İzole organ (BT)	√		108
Opozum	İzole organ (BT)	√ (NO-VİP)		109

Özofagus alt sfinkterinde yapılan çalışmalar daha çok paralel yollar hipotezini desteklemiştir (Bakınız tablo I). Öte yandan midede bir konsensus oluşmamış, her iki hipotezi destekleyen çalışmalar ortaya çıkmıştır (Bakınız tablo II). Düodenumda, oddi sfinkterinde ve jejunumda kesin yargıya

varabilecek kadar çalışma yoktur (Bakınız tablo III). Ancak ileumda daha ziyade seriyal-kaskad hipotezini destekleyen bulgular elde edilmiştir (Bakınız tablo III). Üstelik kalın bağırsak ve internal anal sfinkterde yapılan çalışmaların çoğunda VIP ve NO arasında etkileşme saptanmıştır (Bakınız tablo IV).

Sonuç olarak VIP ile NO arasındaki etkileşim türe göre ve söz konusu olan gastrointestinal segmente göre farklılık gösterebilir.

Kaynaklar

1. Furness JB, Costa M. The Enteric Nervous System. Churchill Livingstone. London. 1987
2. Taylor GS, Bywater RAR. Novel autonomic neurotransmitters and intestinal function. *Pharmacology and Therapeutics*. 1989; 40: 401-438.
3. Burnstock G, Campbell G, Satchell D G, et al. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol*. 1970; 40: 668-688.
4. Fahrenkrug J. VIP as a neurotransmitter in the peripheral nervous system. In: Said S (Eds). *Vasoactive Intestinal Polypeptide*. New York, Raven Press 1982: 361-372.
5. Lefebvre RA. Nitric oxide in the peripheral nervous system. *Ann Med*. 1995; 27: 379-388.
6. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43(2): 109-142.
7. Ergün Y. Özofagus tonus ve motilitesi: Nitirik oksidin rolü. *Arşiv*. 2005; 14: 507-525.
8. Aimi Y, Kimura H, Kinoshita T, et al. Histochemical localization of nitric oxide synthase in rat enteric nervous system. *Neuroscience*. 1993; 53(2): 553-560.
9. Singaram C, Sengupta A, Sweet MA, et al. Nitrinergic and peptidergic innervation of the human oesophagus. *Gut*. 1994; 35(12): 1690-1696.
10. Christensen J, Fang S. Colocalization of NADPH-diaphorase activity and certain neuropeptides in the esophagus of opossum (*Didelphis Virginia*). *Cell Tissue Res*. 1994; 278 (3): 557-62.
11. Vittoria A, Costagliola A, Carrese E, et al. Nitric oxide-containing neurons in the bovine gut, with special reference to their relationship with VIP and galanin. *Arch Histol Cytol*. 2000; 63 (4): 357-68.

12. Tottrup A, Svane D, Forman A. Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter. *Am J Physiol.* 1991; 260: G385-389.
13. De Man J G, Pelckxman P A, Boeckxstaens G E, et al. The role of nitric oxide in inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the canine lower oesophageal sphincter. *Br J Pharmacol.* 1991; 103: 1092-1096.
14. Yamato S, Saha JK, Goyal RK. Role of nitric oxide in lower esophageal sphincter relaxation to swallowing. *Life Sci.* 1992; 50(17): 1263-1272.
15. Ny L, Alm P, Ekstrom P, et al. Nitric oxide synthase-containing, peptide-containing, and acetylcholinesterase-positive nerves in the cat lower oesophagus. *Histochem J.* 1994; 26(9): 721-733.
16. Ny L, Alm P, Larsson B, et al. Nitric oxide pathway in cat esophagus: localization of nitric oxide synthase and functional effects. *Am J Physiol.* 1995; 268: G59-70.
17. Kortezova N, Mizhorkova Z, Milusheva E, et al. Non-adrenergic non-cholinergic neuron stimulation in the cat lower esophageal sphincter. *Eur J Pharmacol.* 1996; 304: 109-15.
18. Shahin W, Murray JA, Clark E, et al. Role of cGMP as a mediator of nerve-induced motor functions of the opossum esophagus. *Am J Physiol.* 2000; 279: G567-74.
19. Jun CH, Lee TS, Sohn UD. NO/cyclic GMP pathway mediates the relaxation of feline lower oesophageal sphincter. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2003; 23: 159-66.
20. Fare R, Auli M, Lecea B, et al. Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 316: 1238-48.
21. Abrahamsson H. Non-adrenergic non-cholinergic nervous control of gastrointestinal motility patterns. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1986; 280: 50-61.
22. Grider JR, Cable MB, Said SI, et al. Vasoactive intestinal peptide as a neural mediator of gastric relaxation. *Am J Physiol.* 1985; 248: G73-8.
23. Lefebvre RA. Study on the possible neurotransmitter of the non-adrenergic non-cholinergic innervation of the rat gastric fundus. *Arch Int Pharmacodyn.* 1986; 16 (suppl.): 110-36.
24. D'Amato M, De Beurme FA, Lefebvre RA. Comparison of the effect of vasoactive intestinal polypeptide and non-adrenergic non-cholinergic neurone stimulation in the cat gastric fundus. *Eur J Pharmacol.* 1988; 152: 71-82.
25. De Beurme FA, Lefebvre RA. Vasoactive intestinal polypeptide as possible mediator of relaxation in the rat gastric fundus. *Br J Pharmacol.* 1988; 40: 711-5.

26. D'Amato M, Curro D, Ciabattini G, et al. Is peptide histidine isoleucine an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter in the rat gastric fundus? *Arch Int Pharmacodyn*. 1990; 303: 216-231.
27. Belai A, Lefebvre RA, Burnstock G. Motor activity and neurotransmitter release in the gastric fundus of streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 1991; 194: 225-234.
28. D'Amato M, Curro D, Montuschi P, et al. Release of vasoactive intestinal polypeptide from the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol*. 1992; 105: 691-695.
29. Li C G, Rand M J. Nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide mediate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol*. 1990; 191: 303-309.
30. Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev*. 1987; 39: 163-96.
31. Gozes I, Brenneman DE. VIP: molecular biology and neurological function. *Mol Neurobiol*. 1989; 3: 201-36.
32. Ito S, Kurokawa A, Ohga A, et al. Mechanical, electrical and cyclic nucleotide responses to peptide VIP and inhibitory nerve stimulation in rat stomach. *J Physiol (London)*. 1990; 430: 337-53.
33. Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Bogers JJ, et al. Release of nitric oxide upon stimulation of nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991; 256: 441-447.
34. Lefebvre RA, Baert E, Barbier AJ. Influence of NG-nitro-L-arginine on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the guinea-pig gastric fundus. *Br J Pharmacol*. 1992; 106: 173-179.
35. Grider JR, Murthy KS, Jin J-G, et al. Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: prejunctional enhancement of VIP release. *Am J Physiol*. 1992; 262: G774-G778.
36. D'Amato M, Curro D, Montuschi P. Evidence for dual components in the non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the rat gastric fundus: role of endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide. *J Auton Nerv Syst*. 1992; 37: 175-86.
37. Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, De Man JG, Bogers et al. Evidence for a differential release of nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide by nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1992; 318: 107-15.
38. Schmidt HHHW, Gagne GD, Nakane M, et al. Mapping of neuronal nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneuronal functions for nitirergic signal transduction. *Histochem Cytochem*. 1992; 40: 1439-1456.

39. Forster ER, Southam E. The intrinsic and vagal extrinsic innervation of the rat stomach contains nitric oxide synthase. *Neuroreport*. 1993; 4: 275-278.
40. Jin JG, Murthy KS, Grider JR, et al. Activation of distinct cAMP- and cGMP-dependent pathways by relaxant agents in isolated gastric muscle cells. *Am J Physiol*. 1993; 27: G470-G477.
41. Barbier AJ, Lefebvre RA. Involvement of the L-arginine: Nitric oxide pathway in nonadrenergic noncholinergic relaxation of the cat gastric fundus. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 266: 172-178.
42. McLaren A, Li CG, Rand MJ. Mediators of nicotine-induced relaxations of the rat gastric fundus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1993; 20: 451-7.
43. Kojima S, Ishizaki R, Shimo Y. Investigation of nicotine-induced relaxation of circular smooth muscle of the guinea-pig gastric fundus. *Eur J Pharmacol*. 1993; 241: 171-5.
44. Desai KM, Warner TD, Bishop AE, et al. Nitric oxide, and not vasoactive intestinal peptide, as the main neurotransmitter of vagally induced relaxation of the guinea pig stomach. *Br J Pharmacol*. 1994; 113: 1197-1202.
45. Murthy KS, Makhoul GM. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide-dependent activation of membrane-bound NO synthase in smooth muscle mediated by pertussis toxin-sensitive G_{i1-2} . *J Biol Chem*. 1994a; 269: 15977-15980.
46. Murthy KS, Jin J-G, Makhoul GM. Inhibition of nitric oxide synthase activity in dispersed gastric muscle cells by protein kinase C. *Am J Physiol*. 1994b; 266: G161-G165.
47. Lefebvre RA, Smiths GJM, Timmermans J-P. Study of NO and VIP as non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the pig gastric fundus. *Br J Pharmacol*. 1995; 116: 2017-2026.
48. Jin J-G, Murthy KS, Grider JR, et al. Stoichiometry of neurally induced VIP release, NO formation, and relaxation in rabbit and rat gastric muscle. *Am J Physiol*. 1996; 271: G357-G369.
49. Mashimo H, He XD, Huang PL, et al. Neuronal constitutive nitric oxide synthase is involved in murine enteric inhibitory neurotransmission. *J Clin Invest*. 1996; 98: 8-13.
50. Ohno N, Xue L, Yamamoto Y, et al. Properties of the inhibitory junction potential in smooth muscle of the guinea-pig gastric fundus. *Br J Pharmacol*. 1996; 117: 974-978.
51. Katsoulis S, Schmidt WE, Schwarzhoff R, et al. Inhibitory transmission in guinea pig stomach mediated by distinct receptors for pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996; 278: 199-204.

52. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, et al. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 1998; 17: 3045-3051.
53. Glasgow I, Mattar K, Krantis A. Rat gastroduodenal motility in vivo: involvement of NO and ATP in spontaneous motor activity. *Am J Physiol.* 1998; 275: G889-896.
54. Bayguinov O, Keef KD, Hagen B, et al. Paralel pathways mediate inhibitory effects of vasoactive intestinal polypeptide and nitric oxide in canine fundus. *Br J Pharmacol.* 1999; 126: 1543-1552.
55. Ny L, Pfeifer A, Aszodil A, et al. Impaired elaxation of stomach smooth muscle in mice lacking cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Br J Pharmacol.* 2000; 129: 395-401.
56. Tonini M, De Giorgio R, De Ponti R, et al. Role of nitric oxide- and vasoactive intestinal polypeptide-containing neurons in human gastric fundus strip relaxation. *Br.J.Pharmacol.* 2000; 129: 12-20.
57. Dick JMC, Van Geldre LA, Timmermans JP, et al. Investigation of the interaction between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig gastric fundus. *Br J Pharmacol.* 2000; 129: 751-763.
58. Dick JMC, Lefebvre RA. Interplay between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in the pig gastric fundus smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 2000; 397: 389-397.
59. Ergün Y, Öğülen N, Dikmen A. Involvement of nitric oxide in non-adrenergic non-cholinergic relaxation and action of vasoactive intestinal polypeptide in circular of the rat gastric fundus. *Pharmacol Res.* 2001; 44: 221-228.
60. Ergün Y, Öğülen N. Evidence for the interaction between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in the mouse gastric fundus. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299: 945-950.
61. Dick JMC, Van Molle W, Libert C, et al. Antisense knockdown of inducible nitric oxide synthase inhibits the relaxant effect of VIP in isolated smooth muscle cells of the mouse gastric fundus. *Br J Pharmacol.* 2001; 134: 425-433.
62. Dick JMC, Van Molle W, Brouckaert P, et al. Relaxation by vasoactive intestinal polypeptide in the gastric fundus of nitric oxide synthase-deficient mice. *J Physiol.* 2002; 538: 133-143.
63. Pimont S, Bruley Des Varannes S, Le Neel JC, et al. Neurochemical coding of myenteric neurons in the human gastric fundus. *Neurogastroenterol Motil.* 2003; 15: 655-662.
64. Martins SR, Bicudo R, Oliveira RB, et al. Evidence for the participation of the L-arginine-nitric oxide pathway in neurally induced relaxation of the isolated rat duodenum. *Braz J Med Biol Res.* 1993; 26: 1325-1335.

65. Krantis A, Mattar K, Glasgow I. Rat gastroduodenal motility in vivo: interaction of GABA and VIP in control of spontaneous relaxations. *Am J Physiol.* 1998; 275: G897-903.
66. Yamamoto H, Kuwahara A, Fujimura M, et al. Motor activity of vascularly perfused rat duodenum. 2. Effects of VIP, PACAP27 and PACAP38. *Neurogastroenterol Motil.* 1999; 11: 235-241.
67. Simula ME, Brookes SJ, Meedeniya AC, et al. Distribution of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the sphincter of oddi and duodenum of the possum. *Cell Tissue Res.* 2001; 304: 31-41.
68. Brehmer A, Schrod F, Neuhuber W. Morphology of VIP/nNOS-immunoreactive myenteric neurons in the human gut. *Histochem Cell Biol.* 2006; 125: 557-565.
69. Simula ME, Brookes SJ, Meedeniya AC, et al. Distribution of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the sphincter of oddi and duodenum of the possum. *Cell Tissue Res.* 2001; 304: 31-41.
70. Zhang M, Shimojo H, Ehara T, et al. Decreased distribution of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide positive nerve cells in the sphincter of Oddi in humans with pancreatobiliary diseases. *Arch Histol Cytol.* 2005; 68: 121-131.
71. Sari R, Peitl B, Kovacs P, et al. Cyclic GMP-mediated activation of a glibenclamide-sensitive mechanism in the rabbit sphincter of oddi. *Dig Dis Sci.* 2004; 49: 514-520.
72. Rakestraw PC, Synder JR, Woliner MJ, et al. Involvement of nitric oxide in inhibitory neuromuscular transmission in equine jejunum. *Am J Vet Res.* 1996; 57: 1206-1213.
73. Satoh Y, Takeuchi T, Yamazaki Y, et al. Mediators of nonadrenergic, noncholinergic relaxation in longitudinal muscle of the intestine of ICR mice. *J Smooth Muscle Res.* 1999; 35: 65-75.
74. Murr MM, Balsiger BM, Farrugia G, et al. Role of nitric oxide, vasoactive intestinal polypeptide, and ATP in inhibitory neurotransmission in human jejunum. *J Surg Res.* 1999; 84: 8-12.
75. Matsuyama H, Unno T, El-Mahmoudy AM, et al. Peptidergic and nitrergic inhibitory neurotransmissions in the hamster jejunum: regulation of vasoactive intestinal peptide release by nitric oxide. *Neuroscience.* 2002; 110: 779-788.
76. De Man JG, De Winter BY, Seerden TC, et al. Functional evidence that ATP or a related purine is an inhibitory NANC neurotransmitter in the mouse jejunum: study on the identity of P2X and P2Y purinoceptors involved. *Br J Pharmacol.* 2003; 140: 1108-1116.
77. Vanneste G, Robberecht P, Lefebvre RA. Inhibitory pathways in the circular muscle of rat jejunum. *Br J Pharmacol.* 2004; 143: 107-118.

78. He XD, Goyal RK. Nitric oxide involvement in the peptide VIP-associated inhibitory junction potential in the guinea-pig ileum. *J Physiol.* 1993; 461: 485-499.
79. Grider JR, Jin J-G. Vasoactive intestinal peptide release and L-citrulline production from isolated ganglia of the myenteric plexus: evidence for regulation of vasoactive intestinal peptide release by nitric oxide. *Neurosci.* 1993; 54: 521-526.
80. Belai A, Burnstock G. Evidence for coexistence of ATP and nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) inhibitory neurones in the rat ileum, colon and anococcygeus muscle. *Cell Tissue Res.* 1994; 278: 197-200.
81. Smits GJ, Lefebvre RA. ATP and nitric oxide: inhibitory NANC neurotransmitters in the longitudinal muscle-myenteric plexus preparation of the rat ileum. *Br J Pharmacol.* 1996; 118: 695-703.
82. Rekik M, Delvaux M, Tack I, et al. VIP-induced relaxation of guinea-pig intestinal smooth muscle cells: sequential involvement of cyclic AMP and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1996; 118: 477-484.
83. Allescher HD, Kurjak M, Huber A, et al. Regulation of VIP release from rat enteric nerve terminals: evidence for a stimulatory effect of NO. *Am J Physiol.* 1996; 271: G568-574.
84. Holzer P. Involvement of nitric oxide in the substance P-induced inhibition of intestinal peristalsis. *Neuroreport.* 1997; 8: 2857-2860.
85. Ekblad E, Sundler F. Distinct receptors mediate pituitary adenylate cyclase-activating peptide- and vasoactive intestinal peptide-induced relaxation of rat ileal longitudinal muscle. *Eur J Pharmacol.* 1997; 334: 61-6.
86. Kurjak M, Fritsch R, Saur D, et al. Functional coupling between nitric oxide synthesis and VIP release within enteric nerve terminals of the rat: involvement of protein kinase G and phosphodiesterase 5. *J Physiol.* 2001; 543: 827-836.
87. Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Bult H, et al. Non-adrenergic non-cholinergic relaxation mediated by nitric oxide in the canine ileocolonic junction. *Eur J Pharmacol.* 1990; 190: 239-246.
88. Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Bult H, et al. Evidence for nitric oxide as mediator of non-adrenergic non-cholinergic relaxations induced by ATP and GABA in the canine gut. *Br J Pharmacol.* 1990; 102: 434-8.
89. Huizinga JD, Tomlinson J, Pintin-Quenzada J. Involvement of nitric oxide in nerve-mediated inhibition and action of vasoactive intestinal peptide in colonic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; 200: 803-808.

90. Grider JR. Interplay of VIP and nitric oxide in the regulation of the descending relaxation phase of peristalsis. *Am J Physiol.* 1993; 264: G334-340.
91. Schworer H, Clemens A, Katsoulis H, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide is a potent modulator of human colonic motility. *Scand J Gastroenterol.* 1993; 28: 625-632.
92. Grider JR. Interplay of VIP and nitric oxide in regulation of the descending relaxation phase of peristalsis. *Am J Physiol.* 1993; 264: G334-340.
93. Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Herman AG, et al. Involvement of nitric oxide in the inhibitory innervation of the human isolated colon. *Gastroenterol.* 1993; 104: 690-697.
94. Berezin I, Synder SH, Bredt DS, et al. Ultrastructural localization of nitric oxide synthase in canine small intestine and colon. *Am J Physiol.* 1994; 266: C981-9.
95. Keef KD, Shuttleworth CW, Xue C, et al. Relationship between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in enteric inhibitory neurotransmission. *Neuropharmacology.* 1994; 33: 1303-1314.
96. Grider JR, Katsoulis S, Schmidt WE, et al. Regulation of the descending relaxation phase of intestinal peristalsis by PACAP. *J Auton Nerv Syst.* 1994; 50: 151-9.
97. Briejer MR, Akkermans LM, Meulemans AL, et al. 5-HT-induced neurogenic relaxations of the guinea-pig proximal colon: investigation into the role of ATP and VIP in addition to nitric oxide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1995; 351: 126-135.
98. Gaumnitz E, Sweet MA, Sengupta A, et al. Nitroergic and peptidergic innervations and their inter-relationships in human colon. *Neuropeptides.* 1995; 29: 1-9.
99. Keranen U, Vanhatalo S, Kiviluoto T, et al. Co-localization of NADPH diaphorase reactivity and vasoactive intestinal polypeptide in human colon. *J Auton Nerv Syst.* 1995; 54: 177-183.
100. Teng B, Murthy KS, Kuemmerle JF, et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1998; 275: G342-51.
101. Kumano K, Fujimura M, Oshima S, et al. Effects of VIP and NO on the motor activity of vascularly reperfused rat proximal colon. *Peptides.* 2001; 22: 91-98.
102. Rattan S, Chakder S. Role of nitric oxide as a mediator of internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol.* 1992; 262: G107-112.
103. Tottrup A, Glavind EB, Svane D. Involvement of the L-arginine-nitric oxide pathway in internal anal sphincter. *Gastroenterology.* 1992; 102: 409-415.

104. Chakder S, Rattan S. Release of nitric oxide by activation of nonadrenergic noncholinergic neurons of internal anal sphincter. *Am J Physiol.* 1993a; 264: G7-12.
105. Chakder S, Rattan S. Involvement of cAMP and cGMP in relaxation of internal anal sphincter by neural stimulation, VIP, and NO. *Am J Physiol.* 1993b; 264: G702-7.
106. Lynn RB, Sankey SL, Chakder S, et al. Colocalization of NADPH-diaphorase staining and VIP immunoreactivity in neurons in opossum internal anal sphincter. *Dig Dis Sci.* 1995; 40: 781-91.
107. Chakder S, Rattan S. Evidence for VIP-induced increase in NO production in myenteric neurons of opossum internal anal sphincter. *Am J Physiol.* 1996; 270: G492-7.
108. Rattan S, Chakder S. Excitatory and inhibitory actions of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the internal sphincter smooth muscle: sites of action. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283: 722-8.
109. Chakder S, Rattan S. Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in opossum internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol.* 1998; 275: G769-77.

Yazışma adresi:

Yrd.Doç.Dr.Yusuf ERGÜN
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
46100 KAHRAMANMARAŞ

Tel: 0 344 2212337/387-365

Faks: 0 344 2212371

e-posta: yusufergun@ksu.edu.tr; yusufergun@yahoo.com

