

İNHİBİTÖR FAKTÖR

İclal ÇAKICI (*)
Nurettin ABACIOĞLU (**)

İlker KANZIK (*)
Hakan ZENGİL (**)

ÖZET:

Endotelden salıverilen bir gevşetici faktör ya da faktörlerin damar tonusunun, epitelden salıverilen bir inhibitör faktörün ise solunum yolu düz kaslarının tonusunun düzenlenmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir.

Bu derlemede bazı damar dışı düz kaslar ve dokulardan ekstre edilebilen ve yapı ve işlev açısından yukarıda söz edilen endojen aktif maddelerle benzerlikler taşıyan bir inhibitör faktör ile ilgili bilgiler özetlenmektedir.

INHIBITOR FACTOR

SUMMARY:

It has been known that an endothelium - derived relaxing factor or factors and an epithelium - derived relaxing factor modulate the reactivity of vascular smooth muscle and airway smooth muscle, respectively.

This review summarizes the knowledge about an inhibitor factor which is extractable from some nonvascular smooth muscle and tissues. It has some similarities with the endogen active substances which was described above in terms of its structure and function.

GİRİŞ

Asetilkolin gibi bazı aktif maddelerin damar düz kasları üzerindeki gevşetici etkilerini endotel kökenli gevşetici faktörler aracılığı ile gösterdikleri bilinmektedir (1). Diğer bir endojen düz kas gevşetici madde ise sığır retraktör penis kası ve sığır anokoksigeus kasından ekstre edilen inhibitör faktördür (2). Bu faktör her iki kasta da gevşeme oluşturmaktadır.

1) Sığır Anokoksigeus Kasının İnhibitör İnnervasyonu ve Sorumlu Mediyatör

Bu kasta bir inhibitör mekanizmanın varlığı ilk kez, adrenerjik nöron bloke edi-

ci bir madde olan guanetidin etkilerinin incelenmesi sırasında ortaya çıkartılmıştır. Guanetidin, 3×10^{-5} M konsantrasyonda, sığır anokoksigeus kasının tonüsünde artışa neden olmakta ve bu sırada elektriksel alan stimülasyonu uygulandığında, normalde kontraksiyon şeklinde verilen cevaplar gevşemeye dönüşmektedir. Guanetidin ile ortaya çıkarılan inhibisyon şeklindeki bu cevap, hegzametonyumdan etkilenmemekte, fakat düşük konsantrasyonda tetradotoksin ile ortadan kalkmaktadır. Bu durum gevşemenin, bir sinir yolağının stimülasyonuna bağlı olduğunu

(*) Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara

(**) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Ankara

göstermektedir (3). Daha sonra yapılan çalışmalarla inhibitör sinir yolağının omurilikten köken aldığı gösterilmiştir (4,5).

Burnstock ve arkadaşları sıçan anokoksigeus kasının inhibitör innervasyonundan pürinerjik sinirlerin sorumlu olabileceğinin öne sürmüşlerdir (6). Pürinerjik mediyatör olan ATP, bu kasta doğrudan kasılma oluştururken, adenozin ve bazı adenozin türevlerinin karbakol ile önceden kastrılmış dokuda her hangi bir gevşeme oluşturmadıkları gösterilmiştir (7,8).

Sığır retraktor penis kasının da tıpkı sıçan anokoksigeus kası gibi, mediyatörü bilinmeyen bir inhibitör innervasyonu vardır. Bu kaslardan elde edilen ekstraleler, gerek retraktor penis ve gerekse anokoksigeus kaslarını inhibe etmektedir. Bu bulgular ekstralelerin bir inhibitör mediyatör veya inhibitör mekanizmaya katılan bir madde içerebileceğini düşündürmektedir. Bu ekstralelerin adenozin ve pürin nükleotidlerinden arınmasını sağlayan bir yöntem geliştirilmiş ve bu yöntem uygulandıktan sonra gevşetici etkilerinde değişiklik olmadığı gözlenmiştir (9).

2) İnhibitör Faktörün Ekstraksiyonu

Sığır retraktor penis kasının asit ekstralelerinin, dayanıksız, eterde çözünmeyen ve bu kası inhibe eden bir madde içerdiği bulunduktan sonra aynı yöntemle sıçan anokoksigeus kasından da bir inhibitör materyal ekstre edilmiş ve bu maddenin yalnızca bradikinin ve nitritler tarafından gevşetilebilen sıçan anokoksigeus kasının yanı sıra sığır retraktor penis kasını da gevşettiği saptanmıştır (2,10).

Bu inhibitör materyalin hangi dokulardan ne ölçüde ekstre edilebileceği incelenmiş ve bu amaçla iskelet kası, kalp kası, uterus, insan umbilikal arteri ve karaciğer ekstraleleri yapıldığında bu dokuların tümünden ekstre edilebilmiştir. Ancak uterus ve umbilikal arterden (umbilikal arter, innervasyonu olmayan bir düz kas olduğu için seçilmiştir) ekstre edilebilen miktar değişkendir. Bazı işlemlerde umbilikal arterden hiç inhibitör materyal elde edilememiştir (2).

3) İnhibitör Faktörün Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

a) Çözünürlüğü: Suyun yanı sıra üç solvan incelenmiştir; metanol, eter, aseton. Distile suda yapılan ekstrede inhibitör aktivite korunmuş, eterli ve asetonlu ekstrede ise hiçbir aktivite bulunmamıştır. Metanol ile alınan sonuçlar ise karmaşıktır. Anhidroz metanolün inhibitör faktörü parçaladığı ve bu etkinin, ortamda %20-30 oranında su bulunmasıyla ortadan kalktığı görülmüştür (10).

b) İyon Değiştiricilere Bağlanma: Eğer inhibitör faktör yüklü bir molekül ise, iyon değiştirici reçnelere bağlanması gerektiği idüştürülerek güçlü anyon ve katyon reçneleri kullanılmıştır. Anyonik kolonda inhibitör faktörün tutulduğu görülmüştür. Katyonik kolonda ise tam tersine kolondan ayrılan ekstrede aktivite bulunmuştur (10).

c) Molekül Ağırlığı: İnhibitör faktörün molekül ağırlığını belirlemek için yapılan çalışmalar sırasında muhtemelen bir inaktif prekürsörü bulunduğu ve asitle aktive edildiği yolunda bulgular elde edilmiş, molekül ağırlığının ise yaklaşık 500 olduğu saptanmıştır (10).

d) Kimyasal Özellikleri: İnhibitör faktörün ATP olmadığına pH=9.0 da alüminyum kolonlarda tutulmaması ile karar verilmiştir (9). Diğer bir olasılık polipeptit yapıda olmasıdır. Bu nedenle bir grup non-spesifik proteaz (tripsin, subtilisin ve pepsin) ile peptidazlar, piroglutamat, aminopeptidaz, lösin aminopeptidaz ve karboksipeptidazın inhibitör aktiviteyi ortadan kaldırma yeteneği incelenmiş. İncelenen proteazların veya aminopeptidazların hiçbirinin inhibitör aktivite üzerinde etkisi bulunmamıştır. Karboksipeptidaz aktiviteyi azaltmıştır. Ancak kaynatılmış enzimler ile inkübasyonun eşit derecede etkin olması, inaktivasyonunun enzim etkisine bağlı olmadığını, aksine, uygulanan kaynatma işlemine bağlı olduğunu göstermektedir. İnhibitör materyalin galaktosidaz ve kollajenaz ile inkübasyonu da inhibitör aktiviteyi değiştirmemektedir

(10).

Başka bir yaklaşım ise, doku proteaz- larını inhibe ederek inhibitör eksterinin veya inhibitör sinir stimülasyonun etkisini araştırmaktır. İzole organ bonyosundaki fizyolojik çözeltiye aprotinin (kallikrein inhibitörü) eklenmesi, ne sığır retraktor penis kasının, ne de sıçan anokoksigeus kasının inhibitör sinir stimülasyonuna cevabını etkilememiş, ayrıca sığır retraktor penis kasında yapılan ekstrelerin inhibitör aktivitesini değiştirmemiştir. Spesifik bradikinin/anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü olarak kullanılan SQ 20881 ile de benzer sonuçlar alınmıştır (10).

Ekstrelerin inhibitör aktivitesini değiştiren üç kimyasal madde olduğu görülmüştür. Bunlar, sodyum periyodat veya periyodik asit, piridin ve sodyum borohidrittir. Ancak borohidrit, ekstrelerinin asitle aktivasyonundan önce (yaklaşık pH=9.0 da) ilave edildiğinde etkin bulunmamıştır. Borohidritten sonra, ekstre asitle işleme konulduğunda, inhibitör aktivite hemen hemen tamamen geri kazanılmıştır. Ancak borohidrit, asitle aktivasyondan sonra (pH=2) ilave edildiğinde inhibitör aktivite yok olmuştur (10).

Tüm bu fiziksel ve kimyasal özellikler inhibitör faktörün bir peptid veya lipid olmayacağını, fakat asitle aktivasyondan sonra bileşiğe biyolojik aktivitesini sağlayan bir eleman içerebileceğini göstermektedir.

4) İnhibitör Faktörün Kardiyovasküler Sistem üzerindeki Etkileri:

İnhibitör ekstre, kullanılan en yüksek hacimde bile anesteziye sıçanların kan basıncı ve kalp hızı üzerinde etkisiz bulunmuştur. İzole sıçan ventrikül şeritlerinde ve izole sağ ve sol atrium preparatlarında kontraktileti etkilememekte, fakat büyük hacimde kullanıldığında atriumda hafif negatif kronotrop etki yapmaktadır (11).

Sığır penil arteri, sığır koroner arteri, kedi, tavşan ve sıçan aortu, kedi ve tavşan renal arterlerinden hazırlanan spiral şeritlerde ise küçük hacimlerde ekstre, doza bağlı olarak güçlü gevşemeler

oluşturmaktadır. Bu gevşemelerin sığır retraktor penis kasında oluşmaları aynen taklit ettiği, deneyler sırasında hem incelenen arter şeridine hem de sığır retraktor penis kasına eşzamanlı olarak ekstreinin uygulanmasıyla saptanmıştır (11). Bu çalışmalar sırasında oda sıcaklığında 60 dakika beklemekle ekstreinin %80 civarında aktivite kaybettiği ancak, asitle işlem gördükten sonra aktivitesini tamamen geri kazandığı da görülmüştür.

İzole venler üzerinde etkisi arterlerde olduğu gibi geniş ölçüde çalışmamıştır. Ancak, tavşan ve kedi portal venini izole segmentlerinde spontan kasılmaları inhibe etmekte, tonüsü noradenalin veya baryum ile arttırılmış tavşan juguler ven şeritlerinde de gevşemeye neden olmaktadır (11).

Ekstreinin birçok izole arter şeridinde gevşeme oluşturmakla beraber, kan basıncını etkilememesi, inhibitör faktörün büyük çaplı arterlerde etkili, rezistans damarlarında ise etkisiz olduğunu düşündürmüştür. Bu nedenle ekstreinin perfüze sıçan arka bacağındaki ve superior mezenterik arter aracılığı ile perfüze edilen izole mezenterik damarlar üzerindeki etkileri incelenmiştir. Her iki preparatta da belirgin bir vazodilatasyon oluşturmaktadır (11). İntakt vasküler yatakta güçlü vazodilatör etkili olmasına karşın, in vivo etkisinin görülmemesi akciğerlerden ilk geçişinde hızla parçalandığı izlenimini verdiğinden, ekstreinin anesteziye sıçanların sol atriumuna doğrudan injeksiyonu denenmiştir. Bu deneylerde asetilkolin ve ATP de, karşılaştırma yapabilmek için aynı yoldan kullanılmıştır. Ancak ekstreinin herhangi bir etkisi saptanamadığından bu olasılık ortadan kalkmıştır. Diğer bir olasılık kanla teması halinde inaktive olmasıdır. Gerçekten de plazma ile değil fakat tam kan ile inkübasyonu sonucu hızla aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir (11). Bowman ve Gillespie, kanla teması sonucu inhibitör eksterinin aktivite kaybının saptanmasından sonra, aynı tür bir etkinin sığır retraktor penis kasında inhibitör sinir stimülasyonuna verilen cevabı nasıl etkilediğini incelemişlerdir. Düz kasta belirli inhibitör mekanizmaları bloke ettiği bilinen

bir polipeptid olan apamin (yılan venomundan elde edilen bir toksin), sıçan kanı ile karşılaştırma yapabilmek üzere bu çalışmada kullanılmıştır (12). Apaminin kobay taenia caeci'de inhibitör sinir stimülasyonuna verilen cevapları bloke ettiği fakat sığır retraktör penis ve sıçan anokoksigeus kasındaki inhibitör cevapları etkilemediği gözlenmiştir. Sıçan kanımından hazırlanan hemolizat ise tam tersine kobay taenia caeci'de cevapları etkilememekle birlikte, sıçan anokoksigeus ve sığır retraktör penis kasındaki non - kolinerjik, non - adrenerjik sinir stimülasyonuna cevap olarak ortaya çıkan gevşemeleri tamamen bloke etmiştir. Bu sonuçlar hemolizattaki aktif maddenin apamininden farklı bir antagonizma spektrumuna sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca sığır retraktör penis kası ve sıçan anokoksigeus kasının aynı inhibitör mediyatörü taşıdıkları ve bu mediyatörün sığır retraktör penis kasından hazırlanan ekstrelerin içerdiği inhibitör faktör ile benzer olduğu görülmektedir. Bu çalışmada saptanan başka bir olgu da tavşan aort şeritlerinde sığır retraktör penis kasından hazırlanan ekstrelerin oluşturduğu gevşemelerin sıçan kanından hazırlanan hemolizat ile antagonez edilebilmesidir (12).

Sığır penil arterlerinin de retraktör penis kası gibi mediyatörü saptanmamış bir non-kolinerjik, non-adrenerjik innervasyonu olduğu bilinmektedir. Bowman ve Gillespie başka bir çalışmalarında, sığır penil arterlerindeki nörojenik vazodilatasyonun, retraktör penis kasından hazırlanan ekstreler ile taklit edilebildiğini göstermiştir. Referans olarak kullanılan vazokatif intestinal polipeptid ve ATP ile alınan sonuçlar ise, her ikisi de çeşitli düz kaslarda güçlü gevşetici etkiye sahip olan bu iki maddenin de, gevşemeden sorumlu mediyatör olmayacağını göstermektedir. (13).

5) Sığır Retraktör Penis Kasının Nörojenik Gevşemelerinde Siklik Guanozin Monofostatin (sGMP) Rolü:

Sığır retraktör penis kasında non-adrenerjik, non-kolinerjik sinir stimülasyonu sırasında siklik nükleotid

içeriğindeki değişiklikler incelenmiştir. Henüz ölçülebilir bir gevşeme oluşmadan bile doku sGMP düzeylerinin yükseldiği, guanilat siklazı bloke eden hemoglobinin ve N-metilhidroksilamin gibi maddelerin sGMP düzeyini yükselten diğer agonistlere ve alan stimülasyonuna verilen cevapları da bloke ettiği, selektif bir sGMP- fosfodiesterez inhibitörü olan MB 22948'in retraktör penis kasını gevşettiği, sinir stimülasyonuna verilen cevabı potansiyalize ettiği ve dokunun sGMP içeriğinde artışa yol açtığı saptanmıştır. Alınan sonuçlar non-adrenerjik, non-kolinerjik sinir stimülasyonunun sGMP düzeyinde selektif bir artış ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Yine bu hipotez ile uyumlu olarak, sGMP düzeyinde artışa neden olmayan agonistlerin gevşetici etkisi hemoglobin veya N, metilhidroksilamin ile bloke edilememektedir (14).

6) İnhibitör Faktör, EDRF ve Nitrik Oksit'in Bazı Özellikleri Açısından Karşılaştırılması

Sığır retraktör penis kası ve sıçan anokoksigeus kasının non-adrenerjik, non-kolinerjik bir inhibitör innervasyonu vardır ve bu innervasyonunun sorumlu mediyatörü olduğu sanılan bir inhibitör faktör bu dokulardan ekstre edilerek bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri saptanmıştır (3,10). Ayrıca bu faktörün birçok izole ar-terde güçlü gevşetici etkisi olduğu bilinmektedir (11,13).

Arter düz kaslarının çeşitli farmakolojik maddelerle gevşetilmesi yalnızca düz kas üzerindeki direkt etkilerine değil, endotel varlığına bağlıdır (19). EDRF denilen ve yapısının nitrik oksit olduğu sanılan bir madde veya maddeler gevşemelere aracılık etmektedir. Ayrıca EDRF'ye bağımlı gevşemeler guanilat siklaz aracılığı ile gerçekleşmektedir (20). Sığır retraktör penis kasından ekstre edilen inhibitör faktörün etkisine de EDRF'nin aracılık edebilme olasılığı incelenmiştir. Ancak tavşan aortunda, endotel tahribinin inhibitör faktör tarafından oluşturulan gevşemeyi azaltmadığı, aksine hafifçe arttırdığı görülmüştür.

Ancak, metilen mavisi ile belirli bi

konsantrasyonda hem inhibitör faktörün oluşturduğu gevşemelerin, hem de karbakol tarafından oluşturulan EDRF aracılığıyla gevşemelerin inhibe edilebilmesi nedeniyle ikisinin de benzer bir etki mekanizmasına (sGMP'ye bağımlı) sahip oldukları anlaşılmaktadır (15). EDRF ile inhibitör faktörün benzer olduğu diğer noktalar her ikisinin de son derece dayanaksız, anyonik, hidrofilik ve borohidrite duyarlı maddeler olmalarıdır (10,21). Her ikisinin de oluşturduğu gevşemeler ve sGMP düzeylerindeki artış, hemoglobin ile bloke edilir, sGMP fosfodiesterazının selektif inhibitörü MB 22948 ile potansiyalize edilir (10,14,20). EDRF'nin nitrik oksit olduğu, inhibitör faktörün inaktif şeklinin inorganik nitrik, asitle aktive olmuş şeklinin ise, nitrik oksit olduğu öne sürülmüştür (18). Gillespie ve arkadaşları aktive edilmemiş sığır retraktor penis kası ekstrelerinin nitrit içerdiğini ve asitle aktivasyon sonucu nitrit kaybı olduğunu göstermişlerdir. Ancak nitrit çözeltilerinin asitlendirilmesi ile sığır retraktor penis kası ekstrelerinin gösterdiğinden daha zayıf vazodilatör aktivite saptanmıştır. Ayrıca sığır retraktor penis kası ekstrelerinin etkisi daha kısa sürmektedir. Asitli nitrit çözeltisi nötralize edildiğinde aktivitesi hemen yok olmakta, oysa inhibitör ekstrenin aktivitesi nötralizasyondan sonra buzda saklanırsa kaybolmamaktadır (16).

Ancak tüm bu farklılıklar inhibitör faktörün inaktif şeklinin inhibitör ekstrenin anyonik bir bileşeni tarafından dayanıklılığı artırılan bir nitrit olduğu şeklinde açıklanmıştır.(16).

Eğer EDRF ve inhibitör faktör, nitrik oksit üzerinden etkiyorsa farklı düz kasların bu üç uyarana duyarlılığı da benzer olacaktır ve nitrik oksitin etkilerini değiştiren faktörler, EDRF ve inhibitör faktörün etkilerini de benzer şekilde etkileyeceklerdir. Gillespie ve Hong Sheng bu amaçla EDRF, inhibitör faktör, nitrik oksit ve sodyum nitroprusidin dört ayrı vasküler ve nonvasküler kastaki gevşetici etkilerini incelemişlerdir. Bunlar, tavşan aort şeritleri, sığır retraktor penis kası, sıçan anokoksigeus kası ve kobay trakeasıdır.

EDRF, inhibitör faktör ve NO'ya duyarlılık her üçünün de NO olabileceğini gösterecek şekilde benzerdir. Sodyum nitroprusiyat ise sıçan anokoksigeus kasında düşük dozlarda tam bir gevşeme oluşturmuştur. Her üçünün de gevşetici etkisi hemoglobin ile ortadan kaldırılabilmektedir. Kullanılan hemoglobin konsantrasyonuna eşdeğer miktarda eritrosit süpansiyonları EDRF veya NO'nun gevşetici etkilerini antagonize etmiş, fakat aktive edilmiş inhibitör faktöre karşı etkin olamamıştır (17). Bu durum inhibitör faktörün NO olamayacağı veya eritrosit membranlarından diffüze olmasını önleyecek şekilde membrana bağlanabileceği şeklinde açıklanmıştır (17).

Sonuç olarak bazı vasküler ve non vasküler düz kasların ne kolinerjik ne de adrenerjik olmayan bir inhibitör innervasyonu olduğu ve bu innervasyonun pürinerjik sistem mediyatörleri olan ATP ve adenozinin farklı yapıda bir mediyatöre sahip olduğu görülmektedir. Bu mediyatör yapıcı EDRF'ye, diğer bir deyişle nitrik oksite benzemekle beraber, daha farklı özellikleri olan ve muhtemelen inaktif bir prekürsörden türeyen bir maddedir.

KAYNAKLAR:

1. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376, 1980.
2. Gillespie, J.S., Martin, W.A. smooth muscle inhibitory material extracted from the bovine retraktor penis and rat anococcygeus muscles *J. Physiol.* 280:45P - 46P, 1978.
3. Gillespie, J.S. The rat anococcygeus muscle and its response to nerve stimulation and to some drugs. *Br. Pharmac.* 45:404-416, 1972.
4. Gillespie, J.S., McGrath, J.C. The origin of the inhibitory nerve pathway to the rat anococcygeus muscle. *J.Physiol.* 224:44P- 45P, 1972.
5. Gillespie, J.S., McGrath, J.C. The spinal origin of the motor and inhibitory innervation of the rat anococcy

- geus muscles. *J.Physiol.* 230:659-672, 1973.
6. Burnstock, G., Cocks, T., Crowe, R. Evidence for purinergic innervation of the anococcygeus muscle. *Br.J.Pharmac.* 64:13-20, 1978.
 7. Chadwick, M.A., Nicholson, J., Weetman, D.F. The response of the superfused rat anococcygeus to adenosine 5'-triphosphate: An effect involving more than one mechanism. *Br. J. Pharmac.* 77: 473 P, 1982.
 8. Stone, T.W. Effects of adenosine derivatives on the rat anococcygeus muscle in vitro. *Br.J.Pharmac.* 78:150P, 1983.
 9. Bowman, A., Gillespie, J.S., Martin, W. The inhibitory material in extracts from the bovine retractor penis muscle is not an adenine nucleotide. *Br. J. pharmac.* 67:327-328, 1979.
 10. Gillespie, J.S., Hunter, J.C., Martin, W. Some physical and chemical properties of the smooth muscle inhibitory factor in extracts of the bovine retractor penis muscle. *J. Physiol.* 315:111-125, 1981.
 11. Bowman, A., Gillespie, J.S., Martin, W. Actions on the cardiovascular system of an inhibitory material extracted from the bovine retractor penis. *Br. J.Pharmac.* 72:365-372, 1981.
 12. Bowman, A., Gillespie, J.S. Block of some non-adrenergic inhibitory responses of smooth muscle by a substance from hemolysed erythrocytes. *J. Physiol.* 328:11-25, 1982.
 13. Bowman, A., Gillespie, J.S. Neurogenic vasodilatation in isolated bovine and canine penile arteries. *J. Physiol.* 341:603-616, 1983.
 14. Bowman, A., Drummond, A.H. Cyclic GMP mediates neurogenic relaxation in the bovine retractor penis muscle. *Br. J.Pharmac.* 81:665-674, 1984.
 15. Bowman, A., Gillespie, J.S. Soares-de Silva, P.a. comparison of the action of the endothelium-derived relaxant factor and the inhibitory factor from the bovine retractor penis on rabbit aortic smooth muscle. *Br. J. Pharmac.* 87:175-181, 1986.
 16. Martin, W., Smith, J.A., Lewis, M.J., Henderson, A.H. Evidence that inhibitory factor extracted from bovine retractor penis is nitrite, whose acid activated derivative is stabilized nitric oxide. *Br. J.Pharmac.* 93:579-586, 1988.
 17. Gillespie, J.S., Sheng, H. influence of hemoglobin and erythrocytes on the effects of EDRF, a smooth muscle inhibitory factor, and nitric oxide on vascular and nonvascular smooth muscle. *Br. J. Pharmac.* 95:1151-1156, 1988.
 18. Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327:524-526, 1987.
 19. Vanhoutte, P.M., Rubahyi, G.M., Miller, V.M., Houston, D.S., Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Am. Rev. Physiol.* 48:307-20, 1986.
 20. Griffith, T.M., Edwards, D.H., Lewis, M.J., Henderson, A.H. Evidence that cyclic guanosine monophosphate (cGMP) mediates endothelium-dependent relaxation. *Eur.J.Pharmacol.* 112: 195-202, 1985.
 21. Griffith, T.M., Edlards, D.H., Lewis, M.J., Newby, A.C., Henderson, A.H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature*, 308:645-657, 1984.