

吸入麻酔薬と EDRF/NO Basal Release

唐澤 富士夫*, 足立 裕史*, 太尾田 正彦*
橋本 賢*, 内橋 慶隆*, 佐藤 哲雄*

はじめに

内皮依存性血管弛緩因子 (Endothelium-Derived Relaxing Factor; EDRF) の主体である一酸化窒素 (NO) は, L-arginine のグアニジド基と酸素から NO 合成酵素 (NOS) の作用により生成される (図 1). NO 合成酵素には 3 種類の NOS イソフォーム, すなわち神経型 cNOS, 内皮型 eNOS, マクロファージ型 iNOS が現在までに知られており, その量と活性により NO 産生は制御されると考えられている. マクロファージ型などの誘導型 (inducible) NOS はサイトカインなどにより酵素量自体が大きく変動するのに対し, 神経型や内皮型 NOS は構成的 (constitutive) に存在して通常は酵素量自体はあまり大きくは変動しない. 血流のずり応力 (shear stress) やエストロゲンに応答した発現¹⁾やプロテインキナーゼ A による酵素分子のリン酸化による制御²⁾の報告もあるが, 構成型 NOS の活性制御は主に細胞内 Ca^{2+} による. 内皮型 eNOS はヘム結合部位とともにカルモデュリン (CaM), FMN, FAD, NADPH 結合部位を有しており, その活性は細胞内の Ca^{2+} (Ca^{2+}/CaM) の結合により制御される. 従って, アセチルコリン, ブラジキニン, ヒスタミン, ADP などの刺激因子 (agonist) は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を介して NOS を活性化することにより NO を合成・遊離を調節すると考えられる. 平滑筋に到達した NO は可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble guanylate cyclase) を賦活して弛緩作用を呈するとされる. 以上が NO 産生・遊離—血管弛緩系の概略であり, この系の研究には前

述の刺激因子がしばしば用いられるが, それらが生理的にどの程度意味を持っているかは疑問視されている.

循環制御における NO の生理的な意義はいまだ十分には解明されていないが, 血管内皮に由来した NO は血圧調節や組織血流分配機構に重要な役割を果たすと考えられる. 局所の血流という外来情報を内皮細胞に伝達して NO を産生・遊離するメカニズムとしては, 血流などで生じるずり応力 (shear stress) や伸展刺激 (stretch) により, mechanoceptor である SA チャネル (stretch-activated channel) が活性化されて Ca^{2+} が流入し, 引き続いて Ca-induced Ca-release (CICR) チャネル (リアノジン受容体) を活性化して, 小胞体からの Ca^{2+} 放出を導くとの仮説³⁾が注目されている.

一方, ノルエピネフリンやフェニレフリンを用いて血管を収縮させた場合, 内皮を温存した血管の最大収縮は内皮を除去した血管に比して大きく減弱することが知られている⁴⁾. この機序の一部は α_2 作用を介した agonist-induced NO release にもよる⁵⁾がその作用は弱く, また, 内皮細胞には α_1 受容体が認められていないので NO は血管内皮から自然に遊離して張力を抑制すると考えられる. この NO 遊離は agonist-induced NO release に対して spontaneous NO release または basal NO release と呼ばれる^{6~8)}. 現在までに basal NO release を調節する因子がいくつか知られており, 細胞内 Ca^{2+} やエタノールは agonist-induced NO release と basal NO release の双方を増加するが, ウアバインは basal NO release のみを増加させ, L-glutamate やコレステロール摂取は basal NO release を減少させると報告されている^{9,10)}.

*防衛医科大学校麻酔学教室

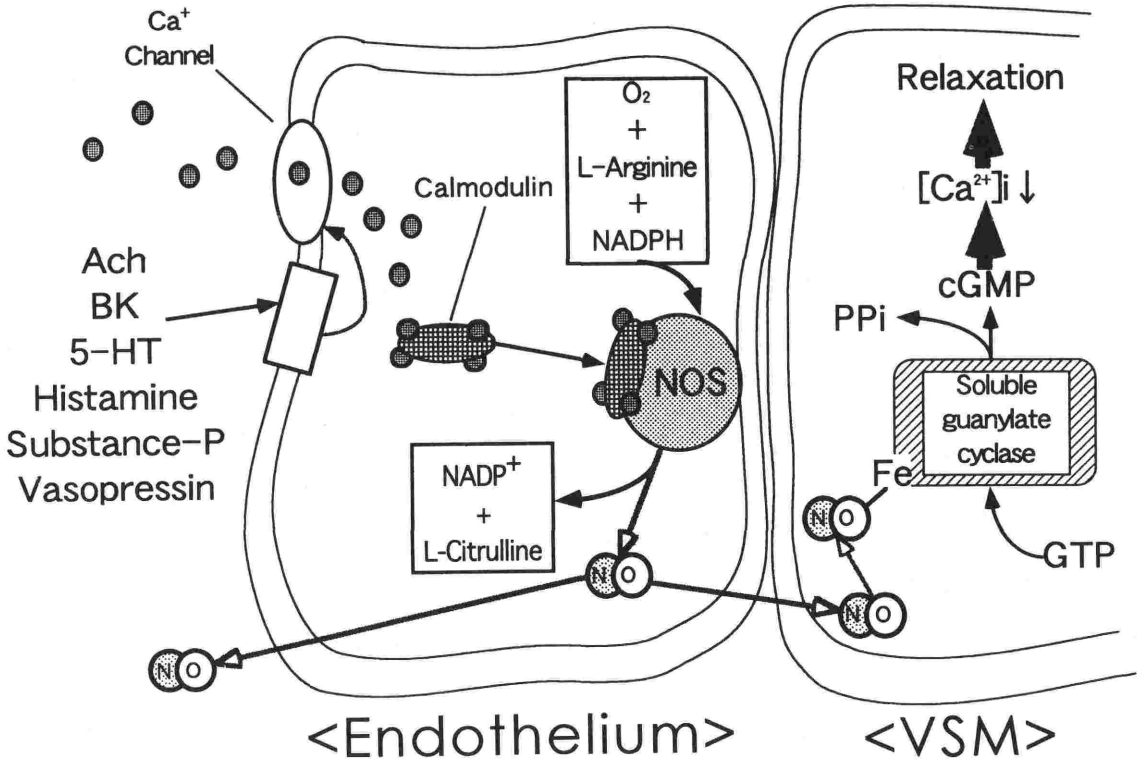


図1 内皮型 cNOS はカルシウム・カルモデュリン (Ca²⁺/CaM) により活性化してL-アルギニンから NO とシトルリンを産生する。血管平滑筋に到達した NO は可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble guanylate cyclase) を賦活し、cGMP を産生して弛緩作用を呈する。

Ach; アセチルコリン BK; プラジキニン 5-HT; セロトニン NOS; NO 合成酵素

麻酔領域では血管内皮細胞による血管張力制御に対する吸入麻酔薬や静脈麻酔薬の関わりについての報告がなされている¹¹⁻¹⁷⁾。特に、吸入麻酔薬はアセチルコリンなどの agonist-induced NO release を介した血管弛緩作用を抑制することが報告されている^{12,18,19)}、局所血流や臓器灌流の調節因子としてその生理的意義が重要と思われる basal NO release に及ぼす麻酔薬の影響については余り知られていない^{20,21)}。本稿では、basal NO release に対する吸入麻酔薬、特にハロタンの作用に関して、1. *in vitro* study 2. 培養内皮細胞を用いた実験 3. *in vivo* study のわれわれの研究結果を中心に概説を試みる。

in vitro study

Stone ら¹¹⁾によれば、低濃度のイソフルランやエンフルランはフェニレフリンで収縮したラットの動脈に対して内皮依存性の収縮増強を示したが、高濃度では収縮抑制を示し、ハロタンでは同

様の傾向を示したものの有意の差はなかった。われわれはハロタンを用いて検討したところ、図2に示すように2.2%までの濃度ではハロタンにおいても有意の収縮増強作用が認められ、より高濃度では収縮抑制作用が認められた。また、フェニレフリンを用いて80 mM KCl の約25%に予め収縮させて2.2%のハロタンを暴露すると持続的な収縮増強作用が見られるが、インドメタシン 10⁻⁵M または L-NAME 10⁻⁴M の前処置は有意の影響を与えなかった。しかし、インドメタシン前処置群は L-NAME 前処置群に比して低値であった(図3)。また、ハロタンによる収縮増強作用が見られた後に L-NAME を投与すると NO 作用が除去されて僅かながら、収縮の増強作用が見られた。しかし、著者らの実験では内皮を除去した血管では一過性の収縮もしくは弱い収縮が一部の血管で認められるもののハロタンの収縮増強作用は有意のものではなく、むしろ濃度依存性に収縮抑制作用が認められた。この結果は Stone ら¹¹⁾がイ

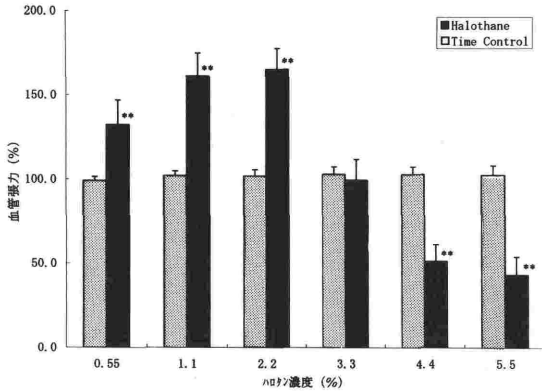


図2 ラットの大動脈をフェニレフリンで収縮してハロタンを暴露すると、内皮を温存した場合は2.2%までのハロタンは収縮増強作用を示し、より高濃度では収縮抑制作用を示す。
Mean ± SEM. **; significant versus time control group.

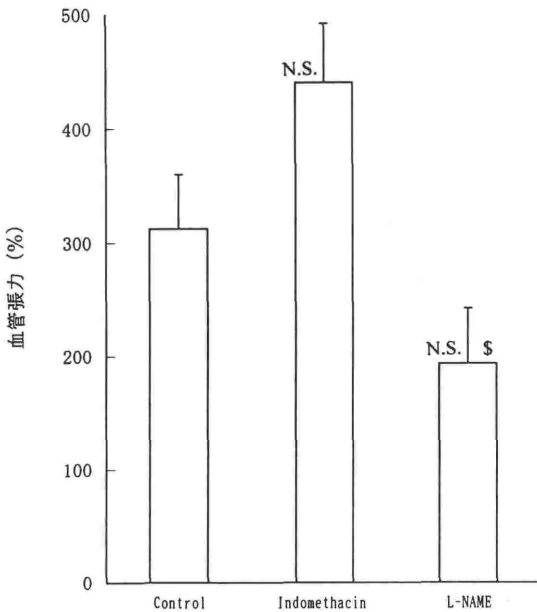


図3 ハロタンの内皮依存性収縮増強作用。インドメタシン 10^{-5} MまたはL-NAME 10^{-4} Mを前処置し、フェニレフリンの収縮に及ぼすハロタン2.2%の作用を比較した。
Mean ± SEM. N.S.; versus control group, \$; significant versus Indomethacin group.

ソフルランやエンフルランで認めたものと同様であった。

また、L-NMMAを前処置するとイソフルランは収縮抑制作用を示すが、前処置にL-arginine (Arg)を加えるとイソフルランは収縮増強に転ずる(表1)。

表1 イソフルランの血管張力(g)に及ぼす作用

前処置	コントロール	イソフルラン2.3%
NMMA	1.94±0.13	1.45±0.16 \$
NMMA+Arg	0.45±0.09	0.59±0.09\$

Mean ± S.D. \$; significant versus control

従って、フェニレフリンで収縮したラットの大動脈に対するハロタンやイソフルランやエンフルランの収縮増強作用は内皮の存在により修飾され、少なくとも内皮の存在により顕性化し持続すると考えられる。その機序の一部として basal NO release に対する吸入麻酔薬の抑制作用が示唆される。Agonis-tinduced NOが吸入麻酔薬の阻害作用を受けることは多く報告されており^{18,19,22)}、それ故に basal NO release, もしくはその作用が吸入麻酔薬の阻害を受ける可能性があると思われる。NOの合成・遊離には Ca^{2+} が必要であることは知られており、おそらくは内皮細胞内の Ca^{2+} 動態を介する作用ではないかと推察される。

しかしながら、ノルエピネフリンで収縮した家兎の大動脈²³⁾やイヌの大腿動脈¹²⁾では、ハロタンは収縮抑制作用を示す一方で、内皮には依存しない血管平滑筋収縮増強作用があると報告されている。また、イヌの腸間膜動脈ではハロタンやエンフルランは細胞内 Ca^{2+} 貯蔵から Ca^{2+} を放出して一過性の収縮を起こすが、イソフルランには収縮作用がない²⁴⁾。ラットの動脈ではKCL収縮に対して一過性の収縮を起こすが、ノルエピネフリンの収縮ではその様な収縮作用は見られず、イソフルランにはいずれの収縮においても増強作用はないとの報告^{25,26)}がある。赤田ら^{27,28)}によれば、腸間膜の抵抗血管においてもKCL収縮に対してはハロタン、エンフルラン、イソフルランは一過性の収縮作用を示したが、ノルエピネフリンの収縮に対してはイソフルラン、エンフルラン、セボフルランは収縮作用を示さなかった。この様に、吸入麻酔薬の血管平滑筋の収縮力に及ぼす作用に

については実験に用いた吸入麻酔薬や収縮薬の種類により結果は一定せず、内皮の関与についても内皮に依存しない収縮作用があるものの一過性の収縮作用の報告が多く、持続的収縮の報告は少ない²³⁾。また、吸入麻酔薬の血管平滑筋に対する直接作用として抑制作用のみを報告したものも多い^{13-15,30-32)}。いずれにしても実験に用いた血管、吸入麻酔薬および収縮薬の種類などの違いにより吸入麻酔薬の効果が異なることは良く知られているが、吸入麻酔薬の持続的な収縮増強作用には内皮の関与があるものと考えられる。

培養細胞を用いた実験

前述の様に吸入麻酔薬自体が血管平滑筋に対して直接作用を持つため、血管張力を指標にした EDRF-血管弛緩系に及ぼす吸入麻酔薬の作用点の研究にはしばしば困難を伴う。そこで我々は、培養内皮細胞を NO の doner として用いてハロタンが血管平滑筋内で NO の作用に影響を与えるかどうかを検討した。

ウシの胸部大動脈の内皮細胞を Type 1 collagenase (125 単位・ ml^{-1}) 用いて分離採取して、ウシの胎児血清 10% (V/V) をメディアウム RPMI

1640 に加えて 5 世代まで経代培養し³³⁾、 10^6 個の細胞に分けて液体窒素に凍結保存して実験に用いた。内皮細胞であることの確認は、蛍光色素をラベルした LDL (low density lipoprotein) が細胞表面で発光すること、および、培養した内皮細胞が一層に敷石状に並ぶことで行った³⁴⁾。培養細胞と microbeads (Cytodex 3, Pharmacia, Sweden) とをフラスコ内で 10 rpm で揺り動かしながら培養して microbeads 上に confluence とし (図 4)、これを約 0.5 ml、細胞数にして 2×10^7 個をカラム (C10 & JC10, Pharmacia, Sweden) に入れて NO の doner とした³⁵⁾。カラムの灌流液流速は一定 ($2.05 \pm 0.02 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) として、下流に当たる部分に内皮を除去したラットの大動脈を置き、その張力を測定することで NO を bioassay した。灌流液にはフェニレフリン 10^{-7} M を入れてラットの大動脈を予め収縮させた。ハロタンは気化器 (Fluotec 3, Cyprane Ltd., England) を用いて灌流液を bubbling し、本実験では、平滑筋の部分のハロタン濃度を 0, 1.1, 2.2% に変化させた。灌流液中のハロタン濃度はガスクロマトグラフィー (GC-14A, 島津製作所) を用いて測定した。また、bioassay の血管平滑筋をさらに下流に設け

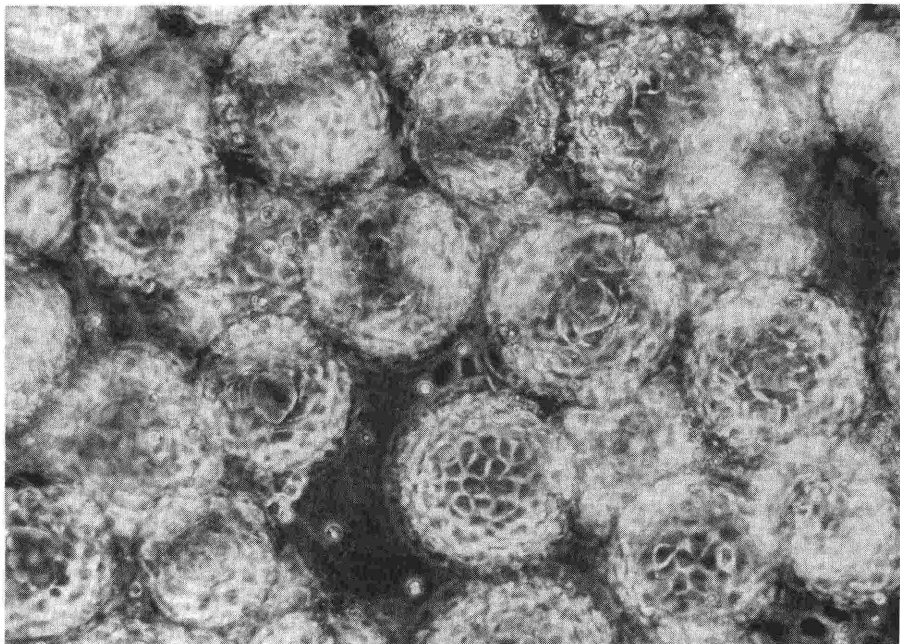


図 4 Microbeads (Cytodex 3TM, Pharmacia, Sweden) 上に培養したウシの大動脈内皮細胞。

て半減期の短い NO の作用減弱を確認した³⁶⁾。

カラム内の培養内皮細胞を ADP 60 μ M で繰り返し刺激して、bioassay の血管張力を測定したところ (図 5), 平滑筋レベルのハロタン濃度を 0, 1.1, 2.2 % と変化させても血管平滑筋の弛緩の程度には有意の変化は見られなかった。8 秒の lag time を設定した下流の bioassay ではニトロプルシドの弛緩作用はほとんど減衰しなかったが、ADP を用いて誘発した弛緩反応は明らかに減弱しており、この弛緩反応はその半減期の短さから主に NO によるものと思われる。

従って、ハロタンは平滑筋内では NO の作用に影響を与えてはならず、NO の遊離、若しくは拡散における活性に影響する可能性が示唆された。

また、同時に行った実験では、ADP やブラジキニンによる培養細胞からの NO release に対してハロタンは影響を与えなかった。

in vivo study

無麻酔の動物の血圧は NOS 阻害薬により上昇することが報告されており³⁷⁾, basal NO release が何らかの役割を果たしていることが示唆されている。さらに、ハロタンやイソフルラン麻酔が NOS 阻害薬による循環動態の変動を減弱または消失することがラットやヒツジを用いた実験で確かめられており^{38~40)}, これらの吸入麻酔薬が NO を介した全身及び臓器の循環調節機構を阻害する可能性がある。しかし、図 6 に示すように、ハロタン麻酔下の家兎では L-NAME 3 mg/kg 静注は腎交感神経活動の亢進作用があるので、in vivo における NO 合成酵素阻害薬の作用は血管系への直接作用以外にも中枢を介したものや自律神経反射の関与があるものと考えられる⁴¹⁾。

そこで、交感神経中枢の関与を排除するために脊髄を破壊した pithed rats に NOS 阻害薬の一つである L-NAME 3 mg/kg を投与したところ、血圧上昇作用はハロタン 1.1 %, 2.2 % 投与により量依存的に減弱した (表 2)。さらに、アンギオテンシン II およびバゾプレッシン阻害薬の前処置により L-NAME の昇圧作用は減弱されるので、L-NAME の昇圧作用には少なくともこれらの内因性血管作動物質が関与していると考えられる。しかし、インドメタシンの前処置により NG-nitro-L-arginine の昇圧作用が消失したとの報告

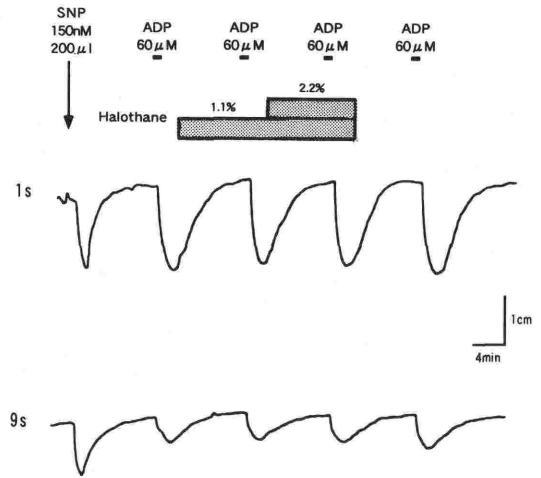


図 5 培養内皮細胞を ADP で刺激して発生した EDRF を血管張力を指標に bioassay した。平滑筋のハロタン濃度を 0, 1.1, 2.2% と変化させたが弛緩の強さは有意には変化しなかった。本文参照。

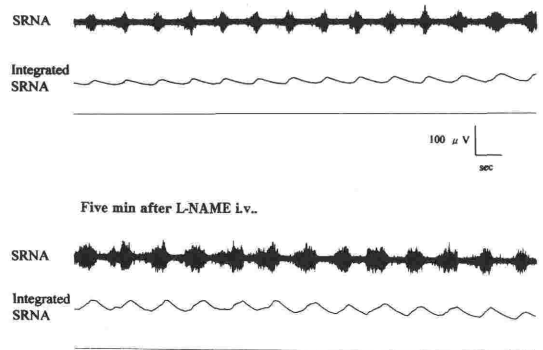


図 6 腎交感神経活動 (SRNA) に及ぼす NOS 阻害薬 (L-NAME) の作用。ハロタン麻酔下の家兎の腎交感神経活動は、L-NAME 3 mg/kg 静注後直ちに亢進した。

表 2 L-NAME 昇圧作用に対するハロタンの抑制作用
脊髄を破壊したラット (pithed rats) にハロタン 0 %, 1.1 %, 2.2% を吸入して L-NAME 3mg/kg を静注した。

	対照群	ハロタン 1.1% 群	ハロタン 2.2% 群
平均血圧 (Δ mmHg)	59.7	30.3	13.6
S.D.	27.9	8.8	11.8

も見られる⁴²⁾。

以上より、*in vivo* では basal NO release に伴う循環調節機構が存在し、ハロタンは濃度依存性に NO を介した血圧調節の関与を低下させるが、その機序には自律神経中枢を介するものとそれ以外のものがあることがわかった。

ま と め

ラットの摘出大動脈を用いた著者らの実験より、ハロタンは収縮増強作用を示し、内皮の存在により収縮増強はより著明に、かつ、持続的になり、この機序に血管内皮からの basal NO release が関与することが示唆された。また、*in vivo* においては L-NAME の昇圧作用をハロタンは量依存的に抑制した。従って、血管張力調節機構における NO の関与をハロタンは濃度依存性に減弱させているものと考えられた。

以上、*in vitro* におけるハロタンの収縮増強作用と *in vivo* における L-NAME の昇圧作用に basal NO release が関与する可能性を中心に述べたが、NO の半減期が短く、また、その測定が困難であることなどにより NO release に関する研究は十分とは言えず、今後の研究に待つところが少なくない。

文 献

- 1) Nishida K, Harrison DG, Navas JP, et al : Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 90 : 2092-2096, 1992
- 2) Mitchel T, Li GK, Busconi L : Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90 : 6252-6256, 1993
- 3) Naruse K, Sokabe M : Involvement of stretch-activated ion channels in Ca²⁺ mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *Am J Physiol* 264 : C1037-C1044, 1993
- 4) Cooks TM, Angus JA : Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature* 305 (5935) : 627-630, 1983
- 5) Rajanayagam MA, Rand MJ : Differential activation of adrenoceptor subtypes by noradrenaline applied from the intimal or adventitial surfaces of rat isolated tail artery. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 20 : 793-799, 1993
- 6) Martin W, Furchgott RF, Villani GM, et al : Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 237 : 529-538, 1986
- 7) Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, et al : Diminished basal

- nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res* 72 : 403-412, 1993
- 8) Ward ME, Hussain SN : Regulation of baseline vascular resistance in the canine diaphragm by nitric oxide. *Brit J Pharmacol* 112 : 65-70, 1994
- 9) Greeberg SS, Xie J, Wang Y, et al : Ethanol relaxes pulmonary artery by release of prostaglandin and nitric oxide. *Alcohol* 10 : 21-29, 1993
- 10) Xie J, Wang Y, Summer WR, et al : Ouabain enhances basal release of nitric oxide from carotid artery. *Am J Med Sci* 305 : 157-163, 1993
- 11) Stone DJ, Johns RA : Endothelium-dependent effects of halothane, enflurane, and isoflurane on isolated rat aortic rings. *Anesthesiology* 71 : 126-132, 1989
- 12) Muldoon SM, Hart JL, Bowen KA, et al : Attenuation of endothelium-mediated vasodilation by halothane. *Anesthesiology* 68 : 31-37, 1988
- 13) Flynn NM, Buljubasic N, Bosnjak ZJ, et al : Isoflurane produces endothelium-independent relaxation in canine middle cerebral arteries. *Anesthesiology* 76 : 461-467, 1992
- 14) Brendel JK, Johns RA : Isoflurane does not vasodilate rat thoracic aortic rings by endothelium-derived relaxing factor or other cyclic GMP-mediated mechanisms. *Anesthesiology* 77 : 126-131, 1992
- 15) Jensen NF, Todd MM, Kramer DJ, et al : A comparison of the vasodilating effects of halothane and isoflurane on the isolated rabbit basilar artery with and without intact endothelium. *Anesthesiology* 76 : 624-634, 1992
- 16) Karasawa F, Iwanov V, Moulds RFW : Effects of fentanyl on the rat aorta are mediated by alpha-adrenoceptors rather than by the endothelium. *Br J Anaesthesia* 71 : 877-880, 1993
- 17) Karasawa F, Iwanov V, Moulds RFW : Sufentanil and alfentanil cause vasorelaxation by mechanisms independent of the endothelium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 20 : 705-711, 1993
- 18) Toda H, Nakamura K, Hatano Y, et al : Halothane and isoflurane inhibit endothelium-dependent relaxation elicited by acetylcholine. *Anesth Analg* 75 : 198-203, 1992
- 19) Uggeri MJ, Proctor GJ, Johns RA : Halothane, enflurane, and isoflurane attenuate both receptor-mediated and non-receptor-mediated EDRF production in rat thoracic aorta. *Anesthesiology* 76 : 1012-1017, 1992
- 20) Myer J, Lents CW, Herndon DN, et al : Effects of halothane anesthesia on vasoconstrictor response to N^G-nitro-L-arginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis, in sheep. *Anesth Analg* 77 : 1215-1221, 1993
- 21) Blaise G, To Q, Parent M, et al : Does halothane interfere with the release, action, or stability of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide? *Anesthesiology* 80 : 417-426, 1994
- 22) Nakamura K, Terasako K, Toda H, et al : Mechanisms of inhibition of endothelium-dependent relaxation by halothane, isoflurane, and sevoflurane. *Can J Anaesth* 41 : 340-346, 1993
- 23) Su JY, Zhang CC : Intracellular mechanisms of halothane's effect on isolated aortic strips of the rab-

- bit. *Anesthesiology* 71: 409-417, 1989
- 24) Kakuyama M, Hatano Y, Nakamura K, et al : Halothane and enflurane constrict canine mesenteric arteries by releasing Ca^{2+} from intracellular Ca^{2+} stores. *Anesthesiology* 80: 1120-1127, 1994
 - 25) Tsuchida H, Namba H, Yamakage M, et al : Effects of halothane and isoflurane on cytosolic calcium ion concentrations and contraction in the vascular smooth muscle of the rat aorta. *Anesthesiology* 78 : 531-540, 1993
 - 26) Tsuchida H, Namba H, Kesi S, et al : Role of Intracellular Ca^{2+} pools in the effects of halothane and isoflurane on vascular smooth muscle contraction. *Anesth Analg* 78 : 1067-1076, 1994
 - 28) Akata T, Nakashima M, Kodama K, et al : Effects of volatile anesthetics on acetylcholine-induced relaxation in the rabbit mesenteric resistance artery. *Anesthesiology* 82 : 188-204, 1995
 - 29) Akata T, Boyle III WA : Volatile anesthetic actions on contractile proteins in membrane-permeabilized small mesenteric arteries. *Anesthesiology* 82 : 700-712, 1995
 - 30) Ozhan M, Sill JC, Atagunduz P, et al : Volatile anesthetics and agonist-induced contractions in porcine coronary artery smooth muscle and Ca^{2+} mobilization in cultured immortalized vascular smooth muscle cells. *Anesthesiology* 80 : 1102-1113, 1994
 - 31) Eskinder H, Hillard CJ, Flynn N, et al : Role of guanylate cyclase-cGMP systems in halothane-induced vasodilation in canine cerebral arteries. *Anesthesiology* 77 : 482-487, 1992
 - 32) Hart JL, Bina MJ, Freas W, et al : Effects of halothane on EDRF/cGMP-mediated vascular smooth muscle relaxations. *Anesthesiology* 79 : 323-331, 1993
 - 33) Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al : Culture of human endothelial cells : identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52 : 2745-2756, 1973
 - 34) Stein O, Stein Y : Bovine aortic endothelial cells display macrophage-like properties towards acetylated ^{125}I -labelled low density lipoprotein. *Biochem Biophys Acta* 620 : 631-635, 1980
 - 35) Busch C, Cancilla PA, DeBault LE, et al : Methods in laboratory investigation : Use of endothelium cultured on microcarriers as a model for the microcirculation. *Lab Invest* 47 : 498-504, 1985
 - 36) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 (6122) : 524-526, 1987
 - 37) Thiernemann C, Mustafa M, Mester PA, et al : Inhibition of the release of endothelium-derived relaxing factor in vitro and in vivo by dipeptides containing N^G -nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol* 104 : 31-38, 1991
 - 38) Wang Y, Zhou T, Chua C, et al : Effects of inhalation and intravenous anaesthetic agents on pressure response to N^G -nitro-L-arginine. *Eur J Pharmacol* 198 : 183-188, 1991
 - 39) Grenblatt EP, Loeb AL, Lingnecker DE : Endothelium-dependent circulatory control-mechanism for the differing peripheral vascular effects on isoflurane versus halothane. *Anesthesiology* 77 : 1178-1185, 1992
 - 40) Sigmon DH, Florentino-Pineda I, Van Dyke RA, et al : Halothane impairs the hemodynamic influence of endothelium-derived nitric oxide. *Anesthesiology* 82 : 135-143, 1995
 - 41) Sakuma H, Yoshioka M, Saito H, et al : N^G -methyl-L-arginin, an inhibitor of L-arginine-derived oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo; a role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? *Circ Res* 70 : 607-611, 1992
 - 42) Klabunde RE, Ritger RC, Helgren MC : Cardiovascular actions of inhibitors of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) formation/release in anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol* 199 : 51-59, 1991