

Hidrojen peroksidin dana koroner arter düz kasında gevşetici etki mekanizmaları

Hasan B. ULUSOY, Ayşe S. ŞAHİN, Necdet DOĞAN

S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD.KONYA

ÖZET

Bu in vitro çalışmada, reaktif oksijen türlerinden H₂O₂'nin dana koroner arterindeki etkileri ve bu etkilerde K⁺ kanalları ile siklooksijenaz, nitrik oksid sentaz ve Na⁺/K⁺-ATPaz enzimlerinin rolleri araştırılmıştır. Arterlerden elde edilen şeritler %95 O₂ -%5 CO₂ karışımı ile gazlandırılan, 37 °C'de Krebs-Henseleit solüsyonu içeren, 25 ml hacmindeki organ banyosu içine alındı. Endotelli ve endotelsiz dokularda H₂O₂'nin bazal tonus üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmanın diğer bir bölümünde dokular U46619 (3x10⁻⁷M) ile kasıldı ve banyolara kümülatif tarzda H₂O₂ (10⁻⁷ - 10⁻²M) ilave edildi. Bu prosedür H₂O₂ ilavesinden önce apamin (10⁻⁶M), karibdotoksin (10⁻⁷M), TEA (10⁻⁴M), glibenklamid (10⁻⁶M), indometazin (10⁻⁵M), L-NAME (10⁻⁴M) ve uvabain (10⁻⁵M) ile inkübe edilen dokularda tekrarlandı. Her bir gruba bu ajanlardan yalnız biri uygulandı. H₂O₂ endotelli ve endotelsiz dokuların bazal tonusunu değiştirmede. U46619 ile kasılan dokularda ise doza bağımlı tarzda gevşeme cevapları oluşturdu. Endotel tabakası sağlam olan ve apamin, karibdotoksin ve TEA ile inkübe edilen dokularda H₂O₂ için hesaplanan E_{max} ve pIC₅₀ değerleri ile endotelsiz (kontrol) dokulardan alınan değerler arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Glibenklamid, indometazin, L-NAME ve uvabain ile inkübe edilen dokulardaki değerler ise endotelsiz dokulardan alınan değerlere göre anlamlı olarak farklı idi. Bu sonuçlar H₂O₂'nin dana koroner arter düz kasında oluşturduğu gevşeme cevaplarında K_{ATP} tipi K⁺ kanalları ile siklooksijenaz, nitrik oksid sentaz ve Na⁺/K⁺-ATPaz enzimlerinin aktivasyonunun rol oynadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hidrojen Peroksid, Koroner Arter, Potasyum Kanalı, Siklooksijenaz, Nitrik Oksid

SUMMARY

Mechanisms of relaxing effect of hydrogen peroxide on bovine coronary artery

In this in vitro study, the effects of H₂O₂ on bovine coronary artery and roles of K⁺ channels and cyclooxygenase, nitric oxide synthase and Na⁺/K⁺-ATPase enzymes for these effects were investigated. Strips from arteries were mounted in 25 ml organ baths containing Krebs-Henseleit Solution at 37 °C aerated with %95 O₂ and %5 CO₂. Effects of H₂O₂ on basal tone of tissues with and without endothelium were investigated. In the second part of study, tissues were contracted with U46619 (3x10⁻⁷ M) and H₂O₂ (10⁻⁷-10⁻²M) was added to the organ baths, cumulatively. This procedure was repeated on tissues incubated with apamin (10⁻⁶M), charybdotoxin (10⁻⁷M), tetraethylammonium (TEA, 10⁻⁴M), glibenclamide (10⁻⁶M), indomethacin (10⁻⁵M), N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10⁻⁴M) and ouabaine (10⁻⁵ M). Each group of tissue was incubated with only one of these agents. H₂O₂ did not affect basal tone of tissues with and without endothelium but relaxed tissues contracted with U46619 in concentration dependent manner. In tissues with endothelium and in tissues incubated with apamine, charybdotoxine and tetraethylammonium, E_{max} values and pIC₅₀ values of H₂O₂ were not different significantly from values obtained from tissues without endothelium (control tissues). However values obtained from tissues incubated with glibenclamide, indomethacin, L-NAME and ouabaine were different significantly from values obtained from tissues without endothelium. These results indicate that ATP-sensitive potassium channels and cyclooxygenase, nitric oxide synthase and Na⁺/K⁺-ATPase enzymes play role in the relaxant effects of H₂O₂ on bovine coronary artery smooth muscle.

Key Words: Hydrogen Peroxide, Coronary Artery, Potassium Channel, Cyclooxygenase, Nitric Oxide

Bir reaktif oksijen türü (ROT) olan H_2O_2 , hipertansiyon, kalp yetmezliği, iskemi-reperfüzyon hasarı, ateroskleroz gibi çeşitli patolojik olaylarda rol oynamaktadır (1,2). Hücrelerin normal metabolizma ürünleri olarak sürekli oluşan bu ROT'lar, belirli bir düzeyde kaldıkları sürece organizmanın yabancı maddeler ve infeksiyon ajanlarına karşı korunmasında önemli savunma molekülleridir (3). Ancak hiperoksi, iskemi-reperfüzyon, ksenobiyotiklere maruz kalma gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak aşırı miktarda ROT'un oluşumu hücrelerde lipid peroksidasyonu, membran permeabilitesinin artması, proteolitik enzimlerin aktivasyonu ve DNA yapısının bozulması ve kırılması gibi hasarlara neden olmaktadır (4). H_2O_2 'nin bu gibi etkilerinin yanında çeşitli hücre içi olayları indüklediği ve metabolik bir sinyal olarak vasküler düz kasların tonusunun düzenlenmesinde rol oynadığı öne sürülmüştür (5,6).

H_2O_2 'nin vasküler düz kaslardaki kasıcı ve gevşetici etkileri dokuya, türe ve deneysel koşullara bağlı olarak değişmektedir. In vitro, insan umbilikal arteri (7) ve tavşan pulmoner arterinde (8) kasılma cevapları oluşturduğu, ön kasıcı ajan uygulanan dana pulmoner arteri (9) ve kedi serebral arterinde (10) ise gevşemeye neden olduğu bildirilmiştir.

Farklı dokularda yapılan bu çalışmalarda, endojen üretilen veya eksojen olarak uygulanan H_2O_2 'ye bağlı kasılma ve gevşeme cevaplarında damar düz kas hücreleri veya endotel hücrelerinde farklı mekanizmaların etkili olduğu öne sürülmüştür (7-10). Diğer damar yataklarında olduğu gibi koroner arterlerin tonusu da endotel ya da düz kas hücrelerinden salıverilen vazoaaktif maddeler veya iyon değişim mekanizmaları ile kontrol edilmektedir. Literatürde H_2O_2 'nin koroner arter tonusu üzerindeki etkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunduğu ve dana koroner arterinde ise daha önce çalışılmadığı görülmektedir. Yapılan bu çalışmada H_2O_2 'nin dana koroner arterindeki etkileri ve bu etkilerin K^+ kanallarının aktivasyonu, prostaglandin ve nitrik oksid oluşumu ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivasyonu gibi çeşitli hücre içi olaylarla ilişkisi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Konya Et ve Balık Kurumundan alınan dana kalpleri kullanıldı. Kalpler soğuk Krebs-Henseleit solüsyonu içerisinde laboratuvara getirildi

ve sol koroner arter izole edildi. Bağ dokusundan temizlenen arterler spiral kesi ile 2-3 mm genişliğinde ve 10-15 mm boyunda şeritler haline getirildi. Dokular $37^\circ C$ de Krebs-Henseleit solüsyonu ($NaCl$ 119; KCl 4.7; $MgSO_4$ 1.5; KH_2PO_4 1.2; $CaCl_2$ 2.5; $NaHCO_3$ 25; glukoz 11) içeren ve %95 O_2 - %5 CO_2 karışımı ile sürekli olarak gazlandırılan 25 ml hacmindeki organ banyosu içine alındı ve 1 g istirahat gerilimi uygulanarak 90 dakika süreyle dinlendirildi. Bu süre içinde dokular her 15 dakikada bir besleyici solüsyon ile yıkandı.

Çalışmada endotelli ve endotelsiz koroner arter şeritleri kullanıldı. Endotelsiz preparatları hazırlamak amacıyla çalışılan dokuların endotel tabakası pamukla hafifçe sürtülerek mekanik yolla tahrip edildi. Bu şekilde hazırlanan preparatlarda kasıcı ajan uygulanmasından sonra asetilkolin (10^{-6} M) gevşeme oluşturmadı.

Uygulanan ajanlara verilen cevaplar Grass FT 03 gerim transdüseri aracılığıyla Grass Model 7 Poligraf'ta yazdırıldı.

İlk çalışma grubunda, H_2O_2 'nin endotelli ve endotelsiz dana koroner arter şeritlerinin bazal tonusu üzerine olan etkileri araştırıldı. Bu amaçla dinlenme periyodunun sonunda banyoya kümülatif tarzda H_2O_2 (10^{-7} - 10^{-2} M) ilave edilerek konsantrasyon-cevap eğrileri alındı.

Diğer bir grupta endotelli ve endotelsiz dokular submaksimal konsantrasyonda uygulanan U46619 ($9,11$ -dideoksi- $11\alpha,9\alpha$ -epoksimetano-prostaglandin $F2\alpha$, 3×10^{-7} M) ile kasıldı. Kasılma cevapları maksimum kararlı amplitüde ulaştığında kümülatif tarzda H_2O_2 (10^{-7} - 10^{-2} M) uygulanarak gevşeme cevapları elde edildi.

U46619 ile kasılan endotelli ve endotelsiz koroner arter şeritlerinde H_2O_2 ile alınan gevşeme cevapları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü. Bu nedenle H_2O_2 'ye bağlı gevşeme cevaplarının mekanizmasının araştırıldığı diğer gruplarda endotelsiz koroner arter şeritleri kullanıldı. Çalışmanın bu bölümünde U46619 (3×10^{-7} M) ile kasılan dokular, apamin (10^{-6} M), karibdotoksin (10^{-7} M), tetraetilamonyum (TEA, 10^{-4} M), glibenklamid (10^{-6} M), indometazin (10^{-5} M), N^G -nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME, 10^{-4} M) ve uvabain (10^{-5} M) ile 20 dakika süreyle inkübe edildi ve daha sonra

banyolara kümülatif olarak H_2O_2 (10^{-7} - 10^{-2} M) uygulandı. Her bir gruba bu ajanlardan yalnız biri uygulandı.

Bazı dokularda ise kasıcı ajan olarak 80 mM K^+ solüsyonu ($NaCl$ 43.5; KCl 80; $MgSO_4$ 1.5; KH_2PO_4 1.2; $CaCl_2$ 2.5; $NaHCO_3$ 25; glukoz 11) kullanıldı. Maksimum kararlı amplitüde ulaşıldıktan sonra kümülatif olarak H_2O_2 (10^{-7} - 10^{-2} M) uygulanarak konsantrasyon-cevap eğrileri alındı.

Endotelsiz koroner arter şeritlerinde yapılan çalışmalar kontrol grubu olarak kabul edildi ve deneme grubuna paralel olarak yürütüldü.

İlaçlar:

H_2O_2 Merck (Darmstadt Almanya) ten; U46619, Apamin, Karibdotoksin, TEA, Glibenklamid, İndometazin, L-NAME ve Uvabain Sigma (St. Louis, MO, ABD) dan alındı. Glibenklamidin (10^{-4} M) gereken miktarı tartıldı ve 5 ml DMSO (dimetil sülfoksit) da çözüldü. Bu çözelti distile su ile dilüe edilerek 10^{-6} M glibenklamid çözeltisi elde edildi. Ön denemelerde glibenklamid için belirtilen bu solvent karışımının etkisiz olduğu saptandı. Diğer ilaçlar ise distile su ile hazırlandı.

İstatistiksel Yöntemler:

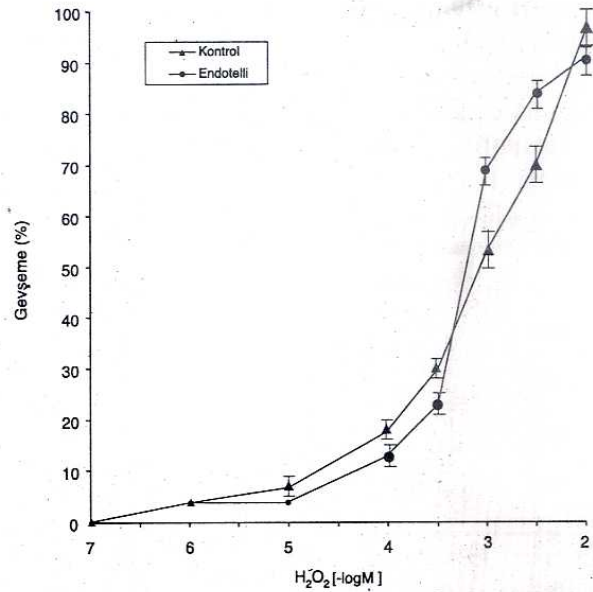
Çalışmada H_2O_2 ile elde edilen gevşeme cevapları 3×10^{-7} M U46619 ile alınan maksimum kasılma cevabının %'si şeklinde değerlendirildi. Her bir grupta H_2O_2 için pIC_{50} (%50 oranında gevşeme oluşturan konsantrasyonun negatif logaritması) ve E_{max} (% maksimum gevşeme) değerleri hesaplandı.

Bulgular ortalama \pm standart hata (SH) şeklinde belirtildi ve ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel analizi için Student'in t testi kullanıldı. $P < 0.05$ olması durumunda ortalamalar arasındaki fark anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Dinlenme periyodunun bitiminde kümülatif tarzda banyoya ilave edilen H_2O_2 (10^{-7} - 10^{-2} M) endotelli veya endotelsiz dana koroner arter şeritlerinin bazal tonusunu etkilemedi.

U46619 (3×10^{-7} M) ile kasılan endotelli ve endotelsiz koroner arter şeritleri banyoya kümülatif tarzda H_2O_2 (10^{-7} - 10^{-2} M) ilavesiyle doza bağımlı bir şekilde gevşedi (Şekil 1). Endotelli koroner arter şeritlerinde E_{max} : $90,8 \pm 4,2$; pIC_{50} : $3,07 \pm 0,08$,



Şekil 1. Endotelli ve endotelsiz dana koroner arter şeritlerinde H_2O_2 ile elde edilen gevşeme cevapları: H_2O_2 ile elde edilen gevşeme cevapları 3×10^{-7} M U46619 ile alınan kasılma cevaplarının %'si olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar ortalama \pm SH şeklinde gösterilmiştir (n = 8).

endotelsiz şeritlerde ise E_{max} : $94,2 \pm 3$; pIC_{50} : $3,21 \pm 0,10$ olarak hesaplandı (Tablo 1). Bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı. Bundan sonraki çalışmalarda endotelsiz koroner arter şeritleri kullanıldı.

Tablo 1. H_2O_2 (10^{-7} - 10^{-2} M) nin çeşitli çalışma gruplarındaki E_{max} ve pIC_{50} değerleri

	E_{max}	pIC_{50}
Endotelsiz (Kontrol)	$94,2 \pm 3$	$3,21 \pm 0,10$
Endotelli	$90,8 \pm 4$	$3,07 \pm 0,08$
İndometazin	$52,9 \pm 3^*$	$2,15 \pm 0,08^*$
Apamin	$90,3 \pm 3$	$3,06 \pm 0,12$
Karibdotoksin	$84,7 \pm 4$	$3,04 \pm 0,10$
TEA	$87,4 \pm 3$	$3,38 \pm 0,13$
Glibenklamid	$54,5 \pm 2^*$	$2,35 \pm 0,09^*$
L-NAME	$41,4 \pm 3^*$	-----#
Uvabain	$39,8 \pm 3^*$	-----#

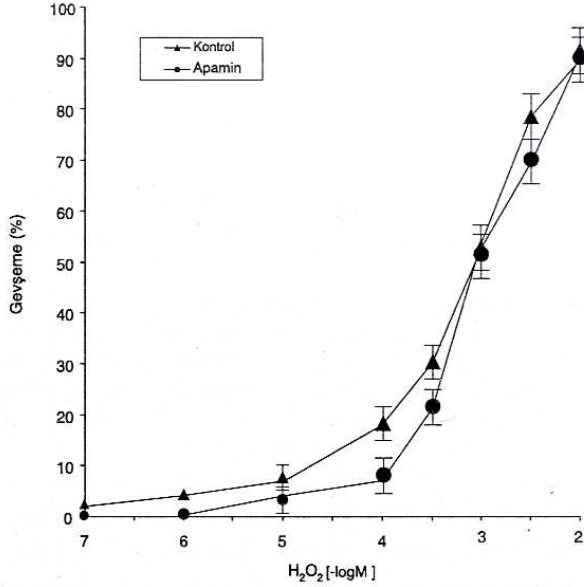
* $p < 0.05$ (Kontrol değerlere göre), # H_2O_2 'nin L-NAME ve uvabain'in denendiği gruplardaki E_{max} değerleri 50'den az olduğu için bu gruplarda pIC_{50} değerleri hesaplanamamıştır.

Apamin (Şekil 2), karibdotoksin (Şekil 3) ve TEA (Şekil 4) ile inkübe edilen dokularda, H_2O_2 ile elde edilen kümülatif konsantrasyon-cevap eğrileri ile kontrol eğriler arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Bu ajanların varlığında H_2O_2 için bulunan E_{max} ve pIC_{50} değerleri Tablo 1' de gösterilmiştir.

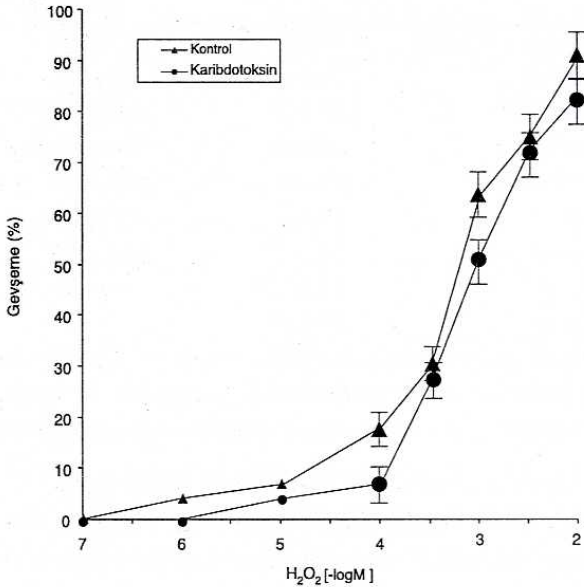
Buna karşın 10^{-6} M glibenklamid ile inkübe edilen dokularda maksimum gevşeme cevapları ve pIC_{50}

değerleri kontrol değerlere göre anlamlı olarak azaldı (Tablo 1, Şekil 5). Kasıcı ajan olarak 80 mM K⁺ solüsyonunun kullanıldığı çalışmalarda H₂O₂ gevşeme oluşturmadı.

Dokuların indometazin (10⁻⁵ M) ile inkübe edilmesi H₂O₂'nin maksimum gevşetici etkisini anlamlı olarak azalttı (Tablo 1, Şekil 6). Benzer şekilde indometazin varlığında H₂O₂ için hesaplanan pIC₅₀ değerleri de kontrol değerlerden anlamlı



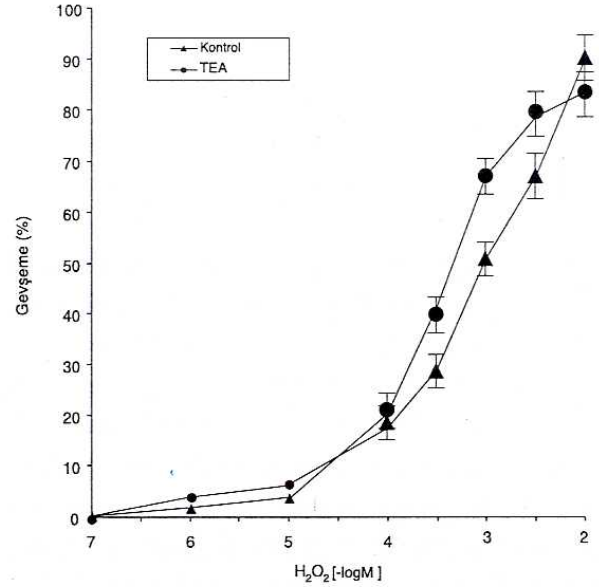
Şekil 2. Dana koroner arter düz kasında H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları üzerine apaminin etkisi: H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları 3x10⁻⁷ M U46619 ile alınan kasılma cevaplarının %'si olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar ortalama ± SH şeklinde gösterilmiştir (n = 8).



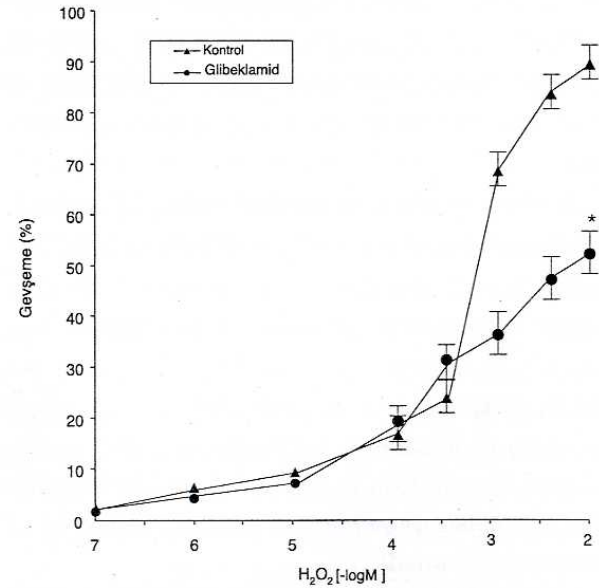
Şekil 3. Dana koroner arter düz kasında H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları üzerine karibdotoksinin etkisi: H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları 3x10⁻⁷ M U46619 ile alınan kasılma cevaplarının %'si olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar ortalama ± SH şeklinde gösterilmiştir (n = 8).

olarak farklı bulundu (Tablo 1).

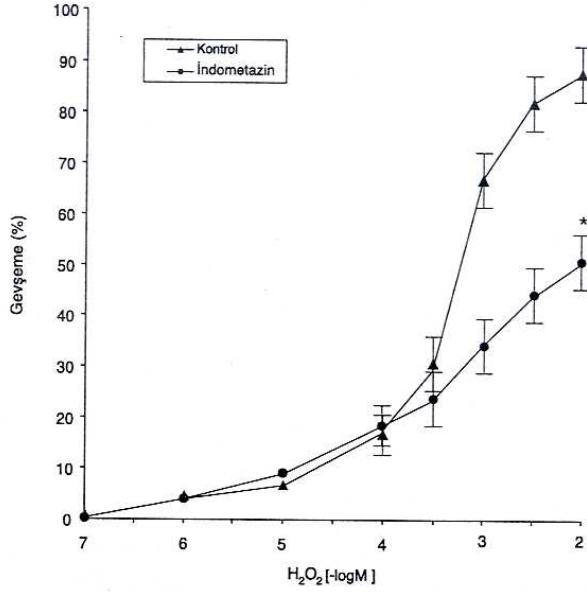
L-NAME (10⁻⁴ M) ve uvabain (10⁻⁵ M) ile inkübe edilen dokularda ise H₂O₂ ile oluşan maksimum gevşeme cevapları kontrol değerlere göre anlamlı olarak azaldı. H₂O₂'nin bu gruplardaki Emax değerleri 50 den az olduğu için bu gruplarda pIC₅₀ değerleri hesaplanamamıştır (Tablo 1, Şekil 7 ve 8).



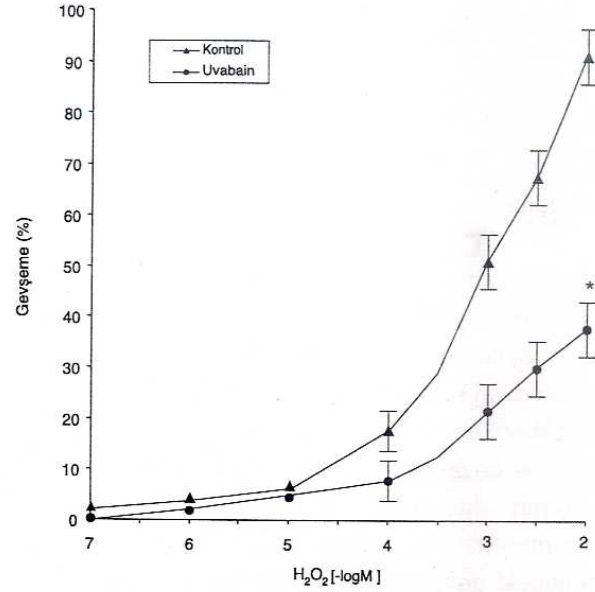
Şekil 4. Dana koroner arter düz kasında H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları üzerine TEA'nın etkisi: H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları 3x10⁻⁷ M U46619 ile alınan kasılma cevaplarının %'si olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar ortalama ± SH şeklinde gösterilmiştir (n = 8).



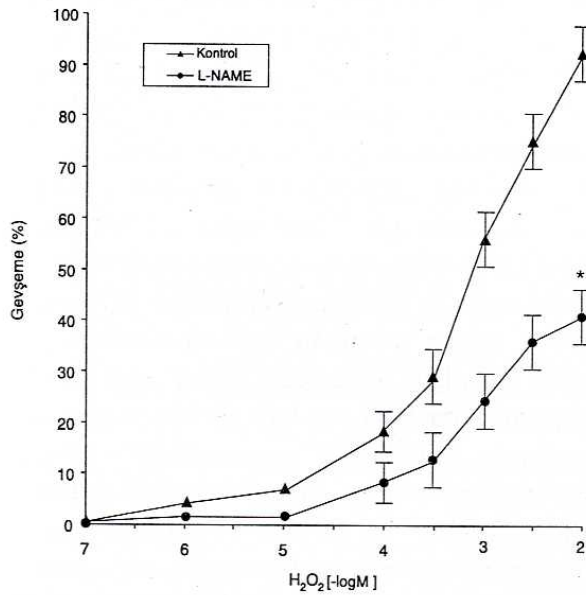
Şekil 5. Dana koroner arter düz kasında H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları üzerine glibeklamidin etkisi: H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları 3x10⁻⁷ M U46619 ile alınan kasılma cevaplarının %'si olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar ortalama ± SH şeklinde gösterilmiştir (n = 8). *p<0.05 (kontrol dokularına göre).



Şekil 6. Dana Koroner arter düz kasında H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları üzerine indometazin etkisi: H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları 3x10⁻⁷ M U46619 ile alınan kasılma cevaplarının %'si olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar ortalama ±SH şeklinde gösterilmiştir (n=8). *p<0.05 (kontrol dokularına göre)



Şekil 8. Dana koroner arter düz kasında H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları üzerine uvabainin etkisi: H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları 3x10⁻⁷ M U46619 ile alınan kasılma cevaplarının %'si olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar ortalama ±SH şeklinde gösterilmiştir (n = 8). *p<0.05 (kontrol dokularına göre)



Şekil 7. Dana koroner arter düz kasında H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları üzerine L-NAME'nin etkisi: H₂O₂ ile elde edilen gevşeme cevapları 3x10⁻⁷ M U46619 ile alınan kasılma cevaplarının %'si olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar ortalama ± SH şeklinde gösterilmiştir (n = 8). *p<0.05 (kontrol dokularına göre)

TARTIŞMA

Dana koroner arterinde yapılan bu in vitro çalışmada ROT'lardan H₂O₂ bazal tonusu etkilememiş ve U46619 ile kasılmış dokularda kümülatif olarak H₂O₂ uygulanması doza bağımlı bir şekilde gevşeme cevapları oluşturmuştur.

Vasküler yapılarda endotel hücrelerinden salıverilen nitrik oksid (NO), prostaglandin I₂ ve endotelden türeyen hiperpolarizan faktör (EDHF) gibi maddelerin vazodilatasyon; endotelin gibi maddelerin de vazokonstriksiyon oluşturduğu bilinmektedir (11). H₂O₂ ile vasküler yapılarda elde edilen kasılma ya da gevşeme cevaplarında endotel tabakasından kaynaklanan vazoaktif ajanların rolü olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada, endotelli ve endotelsiz dana koroner arter şeritlerinde H₂O₂'ye bağlı gevşeme cevapları arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Benzer şekilde domuz koroner arterinde (12) ve tavşan mezenterik arterinde (13) yapılan çalışmalarda da H₂O₂'ye bağlı gevşeme cevaplarında endotel tabakasının rolü olmadığı bildirilmiştir.

Hücre membranında bulunan farklı tiplerdeki K⁺ kanallarının aktive edilmesiyle bu iyonun hücre içine girişinin artması sonucu hiperpolarizasyon oluşmakta ve düz kaslı yapılarda gevşeme cevapları ortaya çıkmaktadır. Koroner arterlerde, hem endotel hem de

düz kas tabakasında çeşitli tiplerde K^+ kanallarının bulunduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda H_2O_2 'nin piramidal nöronlarda (14), renal epitel hücrelerinde (15) ve sıçan miyositlerinde (16) K^+ kanallarını aktive ettiği gösterilmiştir. Apamin (17), karibdotoksin (17) ve TEA (18) nin farklı tiplerdeki kalsiyum ile aktive edilen K^+ kanalları (K_{Ca}) nın blokörleri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada endotelsiz dokuların bu ajanlarla inkübe edilmesi H_2O_2 'ye bağlı gevşeme cevaplarını etkilememiştir. ATP ile aktive edilen K^+ kanalları (K_{ATP}) nı bloke ettiği bilinen (18) glibenklamid ise H_2O_2 ile elde edilen maksimum gevşeme cevaplarını anlamlı olarak inhibe etmiş ve H_2O_2 'nin kümülatif doz-cevap eğrisini sağa kaydırmıştır. Bu bulgu H_2O_2 'nin dana koroner arterindeki gevşetici etkilerinde K_{ATP} kanallarının rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca 80 mM K^+ içeren solüsyonla kasılan dokularda H_2O_2 'nin gevşeme yapmaması da bu bulguyu desteklemektedir. Benzer yorum Jansen ve arkadaşlarının köpek trakeasında yaptıkları çalışmada da öne sürülmüştür (19).

Hücre membranında bulunan Na^+/K^+ -ATPaz enziminin aktive edilmesi de hücrede hiperpolarizasyon oluşturmaktadır. H_2O_2 'nin tip II alveol hücrelerinde (20) ve pulmoner arter endotel hücre kültürlerinde (21) Na^+/K^+ -ATPaz enzimini aktive ettiği gösterilmiştir. Dana koroner arterinde yapılan bu çalışmada ortama Na^+/K^+ -ATPaz enzimini inhibe ettiği bilinen (22) uvabainin ilave edilmesi H_2O_2 'ye bağlı gevşeme cevaplarını anlamlı olarak azaltmıştır. Nitekim daha önce yaptığımız bir çalışmada da dana koroner arterinde önemli bir Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi olduğu gösterilmiştir (22). Bulgularımızla uyumlu olarak Pompesiello ve arkadaşlarının domuz koroner arterinde yaptıkları bir çalışmada da uvabain ilavesiyle H_2O_2 ile oluşan gevşeme cevapları ortadan kaldırılmış ve H_2O_2 'nin Na^+/K^+ -ATPaz enzimini aktive edebildiği öne sürülmüştür (23).

Düz kaslar ve/veya onlarla komşu olan endotel ya da epitel tabakasında sentezlenen araşidonik asid metabolitlerinin düz kas tonusunun düzenlenmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Ancak H_2O_2 'nin araşidonik asid metabolitleri aracılığıyla düz kaslar üzerine olan etkileri türe, dokuya ve deneysel koşullara bağlı olarak değişmektedir. Tavşan trakeasında yapılan bir çalışmada H_2O_2 'nin epitel ve düz kas tabakasından sentezlenen prostaglandinler aracılığı ile gevşeme oluşturduğu gösterilmiştir (24). Rhoden ve arkadaşlarının domuz trakeasında yaptığı bir

çalışmada ise H_2O_2 hem epitel hem de düz kas tabakasından saliverilen prostaglandinler aracılığı ile kasılma oluşturmuştur (25). Köpek trakeasında yapılan diğer bir çalışmada ise düz kas tabakasından sentezlenen prostaglandin E_2 ve prostaglandin I_2 nin H_2O_2 'ye bağlı gevşeme cevaplarında rol oynadığı bildirilmiştir (26). H_2O_2 'nin vasküler yapılarıdaki kasıcı veya gevşetici etkilerinde de araşidonik asid metabolitleri rol oynamaktadır. Domuz koroner arterinde yapılan bir çalışmada H_2O_2 'nin araşidonik asidin lipooksijenaz ürünleri aracılığı ile K_{Ca} tipi kanalları aktive ederek gevşeme oluşturduğu gösterilmiştir (27). Aynı dokuda yapılan başka bir çalışmada ise H_2O_2 'nin araşidonik asidin siklooksijenaz ürünleri aracılığıyla kasılma yaptığı yayınlanmıştır (12). Sunulan bu çalışmada siklooksijenaz enzimini inhibe eden (12) indometazin H_2O_2 'ye bağlı gevşeme cevaplarını anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Bu bulgu dana koroner arterinde H_2O_2 'nin gevşetici etkilerinde düz kas tabakasında sentezlenen siklooksijenaz ürünlerinin rolü olduğunu göstermektedir. Bulgularımızla uyumlu olarak endotel tabakası zedelenmiş tavşan mezenterik arterinde yapılan bir çalışmada H_2O_2 'ye bağlı gevşeme cevaplarında düz kastaki araşidonik asid metabolitlerinin rol oynadığı saptanmıştır (13).

Vasküler endotelde, L-arjinine nitrik oksid sentaz (NOS) enziminin etkimesiyle NO oluştuğu ve oldukça lipofilik olan bu maddenin düz kas tabakasında guanilat siklaz ve / veya K^+ kanallarını aktive ederek hiperpolarizasyona neden olduğu bilinmektedir (5,11). Fare mezenterik arterinde yapılan bir çalışmada endotel tabakasında bulunan NOS enziminin aktivasyonu sonucu superoksid anyonlarının üretimini arttırdığı yayınlanmıştır. Araştırmacılar bu anyonların superoksid dismutaz ile H_2O_2 'ye dönüştüğünü ve düz kasta bulunan K^+ kanallarını etkileyerek hiperpolarizasyona neden olduğunu öne sürmüşlerdir (6). Tavşan üretral ve kavernoza dokularında yapılan çalışmalarda da H_2O_2 'nin NO ile oluşan gevşeme cevaplarını artırdığı yayınlanmıştır. Ancak araştırmacılar mekanizma konusuna açıklık getirememişlerdir (28,29). Ho Koh ve arkadaşlarının sıçan aorta düz kas hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada da NO'nun glutatyon peroksidaz enzimini inhibe ederek H_2O_2 birikimine neden olduğu öne sürülmüştür (30). Sunulan bu çalışmada da; ortama NOS inhibitörü (18) L-NAME ilave edilmesi endotelsiz dana koroner arter düz kasında H_2O_2 ile oluşan maksimum

gevşeme cevaplarını anlamlı olarak inhibe etmiştir. Literatürde koroner arter vasküler düz kas hücrelerinde NOS ile H_2O_2 arasındaki etkileşmeyi inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak sunulan bu çalışmadaki bulgular, yukarıda sözü edilen diğer çalışmalara benzer bir şekilde dana koroner arter düz kas hücrelerinde de H_2O_2 ile NO arasında, sentez veya etkinliğin artırılması yönünde bir etkileşmenin olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, dana koroner arter düz kasında yapılan bu in vitro çalışmada, kümülatif tarzda uygulanan H_2O_2 dokuların bazal tonusunu etkilememiş, U46619 ile kasılmış dokularda ise gevşeme cevapları oluşturmuştur. Dokuların endotel tabakasının sağlam

olması ya da ortama apamin, karibdotoksin ve TEA'dan herhangi birinin ilave edilmesi H_2O_2 'ye bağlı gevşeme cevaplarını etkilememiştir. Glibenklamid, indometazin, L-NAME ve uvabain inkübasyonlarında ise H_2O_2 cevapları belirgin bir şekilde inhibe olmuştur. Bu sonuçlar H_2O_2 'nin dana koroner arter düz kasında oluşturduğu gevşeme cevaplarında K_{ATP} tipi K^+ kanallarının ve ayrıca Na^+/K^+ -ATPaz, siklooksijenaz ve NOS enzimlerinin aktivasyonunun rol oynadığını göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Dana kalbini temin ettiğimiz Konya Et Balık Kurumu ilgililerine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Jolly S.R., Kane W.J., Bailie M.B., Abrams G.D., Lucchesi B.R. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ. Res.* 24. 1984; 54: 277-285.
- Prasad K., Kalra J. Experimental atherosclerosis and oxygen free radicals. *Angiology* 1989; 40: 835-843.
- Fantone J. C., Ward P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. Heart J.* 1982; 107: 397-417.
- S.Oğuz Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 9.Baskı, Hacettepe- Taş 2000:718.
- Wolin M.S., Davidson C.A., Kaminski P.M., Fayngersh R.P., Mohazzab K.M. Oxidant-nitric oxide signalling mechanisms in vascular tissue. *Biokimiya* 1998; 63: 802-810.
- Matoba T., Shimokawa H., Nakashima M., Hirakava Y., Mukai Y., Hirano K., Kanaide H., Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: 1521-1530.
- Okatani Y, Watanabe K, Sagara Y. Effect of nitric oxide, prostacyclin, and thromboxane on the vasospastic action of hydrogen peroxide on human umbilical artery. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1997; 76: 515-520.
- Sheehan D.W., Giese E.C., Gugino S.F., Russel J.A. Characterization and mechanisms of H_2O_2 -induced contractions of pulmonary arteries. *Am. J. Physiol.* 1993; 264: H1542-H1547.
- Iesaki T., Gupte S.A., Kaminski P.M., Wolin M.S. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H_2O_2 . *Am. J. Physiol.* 1999; 277: H978-85.
- Fraile M.L., Conge M.V., Sanz L., Moreno M.J., Marco E.J., Lopez De Pablo A.L. Different influence of superoxide anions and hydrogen peroxide on endothelial function of isolated cat cerebral and pulmonary arteries. *Gen. Pharmacol.* 1994; 25: 1197-1205.
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. *Pharmacology* 4th Edition, Churchill Livingstone, 1999: 188-197, 280.
- Barlow R.S., White R.E. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKca channel activity. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* 1998; 44:H 1283-1289.
- Fujimoto S., Asao T., Sakai M., Sakurai K., Takagi D., Yoshimoto N., Itoh T. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced relaxation in rabbit mesenteric small artery. *European Journal of Pharmacology* 2001; 412: 291-300.
- Seutin V., Scuvee-Moreau J., Massotte L., Dresse A. Hydrogen peroxide hyperpolarizes rat CA1 pyramidal neurons by inducing an increase in potassium conductance. *Brain Res.* 1995; 683:275-278.
- Filipovic D. M., Reewes W.B. Hydrogen peroxide activates glibenclamide sensitive K^+ channels in LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol.* 1997; 272 (Cell Physiol. 41): C737-C743.
- Miyawaki H., Wang Y., Ashraf M. Oxidant stress with hydrogen peroxide attenuates calcium paradox injury: role of protein kinase C and ATP-sensitive potassium channel. *Cardiovascular Research* 1998; 37:691-699.
- Vanhoutte P.M. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *The Journal of Clinical Investigation* 2001; 107: 23-25.
- Sahin A.S., Atalik K.E., Gunel E., Dogan N. Nonadrenergic, noncholinergic responses of the human colon smooth muscle and the role of K^+ channels in these responses. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2001; 23(1):13-17.
- Jansen L.K., Netherton S.J, Walters D.K. Ca^{+2} dependent K^+ channels and Na^+ - K^+ -ATPase mediate H_2O_2 - and superoxide-induced relaxations in canine trachealis. *J. Appl. Physiol.* 2000; 88: 745-752.
- Flecha B.G., Evelson P., Ridge K., Sznajder J.I. Hydrogen peroxide increases Na^+ - K^+ -ATPase function in alveolar type II cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1290: 46-52.
- Meharg J.V., McGovan-Jordan J., Charles A., Parmelee J.T., Cutaia M.V., Rounds S. Hydrogen peroxide stimulates sodium-potassium pump activity in cultured pulmonary arterial endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: L613-21.
- Şahin A.S., Atalık K.E., Ulusoy H.B., Doğan N. Dana koroner arterinde 5-HT, Karbakol, KCl ve $CaCl_2$ ile oluşan kasılmalar üzerine membranın Na^+ iyonuna geçirgenliğini değiştiren maddelerin etkisi. *T. Klin. Tıp Bilimleri* 2000; 20:334-340.

23. Pompesiello S., Rhaleb N.E., Alva M., Carretero O.A. Reactive oxygen species: role in the relaxation induced by bradykinin or arachidonic acid via EDHF in isolated porcine coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 34(4): 567-74.
24. Prasad K., Gupta J.B. Relaxant effect of oxygen free radicals on rabbit tracheal smooth muscle. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 2002; 15: 375-384.
25. Rhoden K.J., Barnes P.J. Effect of hydrogen peroxide on guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro: role of cyclo-oxygenase and airway epithelium. *Br. J. Pharmacol.* 1989; 98:325-330.
26. Gao Y., Vanhoutte P.M. Effects of hydrogen peroxide on the responsiveness of isolated canine bronchi: role of prostaglandin E₂ and I₂. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: L402-8.
27. Barlow R.S, El-Mowafy A., White R.E. H₂O₂ opens BKca channels via PLA₂-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *Am J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* 2000; 279: H475-483.
28. Naseem K., Mumtaz F., Thompson C., Sullivan M., Khan M.A., Morgan R., Mikhailidis D., Bruchdorfer K.R. Relaxation of rabbit lower urinary tract smooth muscle by nitric oxide and carbon monoxide: modulation by hydrogen peroxide. *European Journal of Pharmacology* 2000; 387: 329-335.
29. Mumtaz F.H., Naseem K.M., Thompson C.S, Sullivan M.E., Morgan R.J., Bruckdorfer K.R. Nitric oxide and carbon monoxide-induced smooth muscle relaxation is enhanced by hydrogen peroxide in the rabbit lower urinary tract. *Journal of Physiology* 1998; 507-523.
30. Ho Koh Y., Suzuki K. Che W., Park Y.S., Miyamoto Y., Higashiyama S., Taniguchi N. Inactivation of glutathione peroxidase by NO leads to accumulation of H₂O₂ and the induction of HB-EGF via c-Jun NH₂-terminal kinase in rat aortic smooth muscle cells. *The FASEB Journal* 2001; 15: 1472-1474.