

İZOLE DANA KORONER ARTERİNDE MUSKARİNİK AGONİSTLERLE OLUŞAN CEVAPLAR VE BU CEVAPLARIN KALSİYUMLA İLİŞKİSİ

Dr. H. İbrahim KARABACAK*, Dr. Necdet DOĞAN*,

* S.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu in vitro çalışmada, dana koroner arterinde asetilkolin ve karbakol ile oluşan kasılma cevaplarının Ca^{++} ile ilişkisi ve asetilkolinle alınan kasılma cevapları üzerine L-NAME'nin etkileri araştırılmıştır.

Asetilkolin ve karbakol bu dokuda doza bağımlı ve tekrarlanabilir nitelikte kasılma cevapları oluşturmuş ve bu cevaplar atropin ile non-kompetitif tarzda antagonize edilmiştir. Kalsiyumsuz ortamda, 10^{-6} M asetilkolin ve karbakol ile alınan kasılma cevapları kontrol cevapların sırasıyla, % 23.76 ± 3.17 ve 16.27 ± 3.93 'ü oranında olmuş ve ortama artan konsantrasyonlarda kalsiyum ilavesiyle bu iki agonistle alınan cevaplar artmıştır. Kalsiyum ilavesiyle elde edilen bu cevap artışları verapamil (10^{-8} - 10^{-6} M) ile doza bağımlı olarak inhibe edilmiştir. Serotonin ile prekontrakte edilen dokulara kümülatif tarzda uygulanan asetilkolin serotonin cevaplarını % 18.5 ± 1.72 oranında artırmış, buna karşın asetilkolin ilavesinden önce ortama L-NAME (3×10^{-4} M) konulması ile bu artış % 47.7 ± 10.52 oranında gerçekleşmiştir. KCl ile kasılabilirliği tesbit edilen dokuda, kümülatif tarzda uygulanan asetilkolinle KCl cevaplarının % 39.95 ± 10.61 'i oranında bir kasılma cevabı elde edilmiş, buna karşın asetilkolin ilavesinden önce ortama L-NAME konulması ile bu oran % 32.26 ± 10.7 şeklinde olmuştur. Kasılma cevabındaki bu azalma anlamsızdır ($P > 0.05$).

Bu sonuçlar, asetilkolin ve karbakol kasılmalarının doza bağımlı ve tekrarlanabilir nitelikte olduğunu, atropin ile non-kompetitif tarzda antagonize edildiğini, agonistlere bağlı cevaplarda ekstra - ve intraselüler kalsiyumun rol oynadığını ve ayrıca bazal tonusa sahip dokuda asetilkolinle elde edilen kasılma cevaplarının L-NAME'den etkilenmediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Muskarinik agonistler, Atropin, Verapamil, Ca^{++} , L-NAME, dana koroner arteri, in vitro.

SUMMARY

Muscarinic agonists-induced responses of isolated bovine coronary artery and their dependence on Ca^{2+} .

In this in vitro study, the role of Ca^{2+} of the acetylcholine and carbachol induced contractions and the effects of L-NAME on the acetylcholine-induced contractile responses were investigated.

Acetylcholine and carbachol caused dose-dependent and reproducible contractions in this tissue and these responses were non-competitively antagonized with atropin. In Ca^{2+} -free medium, acetylcholine and carbachol-induced contractions were 23.76 ± 3.17 % and 16.27 ± 3.93 % of the control responses, respectively and the responses to both agonists were increased by re-addition of cumulative concentrations of Ca^{2+} . The increased responses obtained with Ca^{2+} re-addition were inhibited with verapamil (10^{-8} - 10^{-6} M) in a dose-dependent manner. In serotonin pre-contracted tissues, cumulative addition of acetylcholine caused the increase in serotonin responses. This augmented responses was found to be as 18.57 ± 1.72 % of initial serotonin contraction. Pre-incubation with L-NAME significantly augmented this additional contractions. In the tissue that contractility by KCl was detected acetylcholine-induced contraction was 39.95 ± 10.61 % of the KCl responses, in spite of this by the addition of L-NAME to the medium before acetylcholine-addition, this ratio was 32.26 ± 10.7 %. The decreasing of the contractile responses was insignificant ($p > 0.05$).

The results suggest that the contractions with acetylcholine and carbachol were dose-dependent and reproducible and antagonized in a non-competitive manner by atropin and both extra- and intracellular Ca^{2+} had a role in agonists-induced responses. In the resting tension, the acetylcholine-induced contractions were not effected by L-NAME.

Key Words: Muscarinic agoists, atropin, verapamil, Ca^{2+} , L-NAME, bovine coronary artery, in vitro.

GİRİŞ

Muskarinik reseptörler nöro-nöronal aşırım, düz kaslarda kasılma ve endokrin fonksiyonlar gibi birçok fizyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar (1). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda muskarinik reseptörlerin farklı hücrelerde beş ayrı sup- tipinin (M_{1-5}) varlığı gösterilmiştir (2,3). Vasküler yataklarda muskarinik agonistlerle elde edilen cevapların memeli türüne ve hatta aynı türde çalışılan dokuya göre farklılıklar gösterdiği dikkati çekmektedir. Bilindiği gibi asetilkolin in vivo şartlarda güçlü vazodilatatör etki gösterir. Ancak in vitro ortamda elde edilen cevapların şekli birçok faktöre bağlıdır. Asetilkolin düşük konsantrasyonlarda sığır koroner arter striplerinde gevşemeye neden olurken, yüksek konsantrasyonlarda kasılma yapmaktadır (4). Ayrıca asetilkolin ve diğer muskarinik agonistlerle elde edilen cevabın niteliği çalışılan dokuda mevcut olan muskarinik reseptör alt-tipine ve bunların yoğunluğuna bağlıdır. Örneğin, sığır ve domuz koroner arterlerinde kasılma cevapları M_3 -tipi muskarinik reseptörlerce sağlanırken, tavşan aortasında M_2 -tipi muskarinik reseptörlerce sağlanmaktadır. Damar yataklarında asetilkoline bağlı gevşemenin görülebilmesi için endotelin sağlam olması gerekir. Ancak, bu genel kuralın aksine, asetilkolinin endoteli sağlam insan, kobay ve koyun koroner arterlerinde gevşeme yerine sıklıkla kasılma yaptığı bildirilmiştir (5) Farklı dokularda muskarinik agonistlerle elde edilen cevaplar oldukça farklı olmasına rağmen, bu ilaçların koroner yataklarda endotelde lokaliz olan M_3 -tipi muskarinik reseptörleri aktive ederek buradan nitrik oksit (NO) salıverilmesine ve böylece gevşemeye neden olduklarını, buna karşın düz kasta bulunan aynı tip reseptörleri uyarmak suretiyle de kasılma oluşturdıklarını söylemek mümkündür (6). Bir non-selektif muskarinik reseptör antagonisti olan atropinle yapılan çalışmalar bu ilacın aktive edilen muskarinik reseptör tipinden bağımsız bir şekilde tüm cevapları inhibe ettiğini göstermektedir. Örneğin, $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen maymun izole koroner arterinde asetilkoline bağlı gevşeme cevapları atropinle inhibe edildiği gibi, in vivo şartlarda da aynı hayvanın koroner arteri içerisine

injekte edilen asetilkolinle oluşan bifazik cevaplarda yine atropinle ortadan kaldırılabilmektedir (7,8). Kuzu koroner arterinde yapılan bir çalışmada da atropinin asetilkolinle elde edilen cevapları kompetitif olarak antagonize ettiği gösterilmiştir (9).

Asetilkolin ve karbakol ile sitimule edilmiş sitozolik kalsiyum artışı hücrelere ekstraselüler ortamdaki kalsiyum girişini takiben intraselüler depolardan kalsiyum salıverilmesine bağlıdır. Ekstraselüler kalsiyum girişi L-tipi kalsiyum kanalları ile olmaktadır (10) Kalsiyum kanal blokleri verapamil L-tipi kalsiyum kanallarının alfa suptipine duyarlıdır (11).

Birçok ajanla endotel hücrelerinden nitrik oksit sentetaz enzimi aracılığı ile nitrik oksit (NO) sentezlenmektedir. Sentezlenen NO vasküler düz kas hücrelerinde solubl guanilat siklaz enzimini aktive ederek c-GMP'yi artırmaktadır. c-GMP artışı düz kaslarda gevşemeye neden olmaktadır (12). Endotelde, nöronlarda ve düz kas hücreleri gibi çeşitli hücrelerde bulunan nitrik oksit sentetaz enzimi N^G -nitro L-arginin metil ester (L-NAME), N-nitro L-arginin (L-NA), N^G -monometil L-arginin (L-NNMA) ve diğer L-arginin alkil esterleriyle inhibe olmaktadır (13).

İzole dana koroner arterinde yapılan bu in vitro çalışmada, asetilkolin ve karbakol ile oluşan cevapların atropin ve verapamil ile inhibe edilebilirliği ve elde edilen cevaplarda ekstraselüler kalsiyumun rolü araştırılmıştır. Çalışmada ayrıca sadece asetilkolinle elde edilen cevaplar ile, serotonin ile prekontrakte edilen dokularada asetilkolinle oluşan ilave cevaplar üzerine L-NAME'nin etkileri çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmamda Konya Et ve Balık Kurumundan alınan dana kalpleri kullanıldı. Kalpler soğuk Krebs-Henseleit solusyonu içerisinde laboratuara getirildi ve sol koroner arterlerin interventriküler dalı izole edildi. Bağ dokusundan temizlenen arterler, 2-3 mm genişliğinde ve 10-15 mm boyunda spiral kesi ile şeritler halinde kesildi. $37^{\circ}C$ 'de ısıtılan ve normal Krebs-Henseleit solusyonu içeren 25 ml'lik organ banyosuna alınan preparatlar % 95 O_2 ve % 5 CO_2 karışımı ile sürekli olarak gazlandırıldı. Arter şeritlerine 1.5 g dinlenme gerilimi uygulandı.

Doku 15 dakika ara ile besleyici solusyonla yıkanarak 1 saat süreyle dinlenmeye bırakıldı. İlaçlara verilen cevaplar izometrik olarak osilografla yazdırıldı.

Çalışma beş ayrı bölüm olarak yapıldı: Birinci bölümde; dinlenme periyodu bitiminde dokular önce 10^{-6} M asetilkolinle kasıldılar. Yıkamayı müteakip ortama kümülatif konsantrasyonda asetilkolin ilave edilerek kontrol konsantrasyon-cevap eğrileri alındı. Dokular gevşetildikten sonra ortama sırasıyla iki farklı konsantrasyonda atropin (10^{-10} , 10^{-8} M) koyarak, 20 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra tekrar asetilkolinle konsantrasyon-cevap eğrileri alındı.

İkinci bölümde; 10^{-6} M asetilkolinle maksimum kasılma elde edildikten sonra yıkanan dokular, 0.1 mM EGTA (Etilen glikol bis (β - amino etil eter) N-N'-N'- tetra asetik asit) içeren kalsiyumsuz ortama alınıp 15 dakika arayla bu solusyonla yıkanarak 1 saat dinlendirildi. Sonra 10^{-6} M asetilkolinle tekrar kasıldı. Bu işlemler kalsiyumsuz-EGTA'lı ortamlar yerine, 0.312 mM, 0.625 mM ve 1.25 mM'lık kalsiyum konsantrasyonlarında hazırlanan solusyonlarla farklı dokularda tekrar edildi.

Üçüncü bölümde, normal solusyonda 10^{-6} M asetilkolinle maksimum kasılma elde edildikten sonra, dokular yıkanıp, kalsiyumsuz-EGTA'lı solusyona alınarak her 15 dakikada bir yıkanmak suretiyle 1 saat dinlendirildi. Bunu takiben 10^{-6} M asetilkolinle dokular tekrar kasılarak kalsiyumsuz ortamda elde edilen cevaplar belirlendi. Kasılmanın kararlı olduğu noktada ortama kümülatif konsantrasyonda kalsiyum (10^{-4} - 3×10^{-3} M) ilave edilerek kasılma cevabına bakıldı. Bu işlemler bir diğer doku grubunda, ortama kümülatif konsantrasyonda kalsiyum ilave edilmeden önce üç farklı konsantrasyonda verapamil (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) konulmak suretiyle tekrarlandı. Verapamil ile preparatlar 20 dakika inkübe edildi.

Birinci, ikinci ve üçüncü bölümlerde yapılan tüm işlemler asetilkolin yerine aynı konsantrasyonda karbakol kullanılarak tekrarlandı.

Çalışmanın dördüncü bölümünde, 20 mM KCl ile stabil bir kasılma elde edildikten sonra, dinlenen dokuya kümülatif konsantrasyonda asetilkolin

uygulanarak tekrar kasıldı. Doku yıkanıp dinlendirildi. Ortama 3×10^{-4} M L-NAME ilave edilerek, 20 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra tekrar kümülatif konsantrasyonda uygulanan asetilkolinle kasılma cevapları alındı.

Son bölümde ise, 3×10^{-5} M serotonin ile prekontrakte edilen dokularda maksimum kararlı duruma ulaşıldıktan sonra ortama kümülatif konsantrasyonda ilave edilen asetilkolinle cevaplar alındı. Paralel çalışılan bir diğer dokuda ise, asetilkolin cevapları alınmadan önce ortama 3×10^{-4} M L-NAME ilave edilip, 20 dakika inkübasyon yapıldı. Bu sürenin sonunda kümülatif asetilkolin uygulanarak cevaplara bakıldı.

Çalışmada kullanılan Krebs-Heseleit solusyonunun içeriği mM olarak şöyledir: NaCl 119.0, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, CaCl_2 25.0, MgSO_4 1.5, NaHCO_3 25, glukoz 11.0. Çalışmada kullanılan yüksek K^+ (20mM)'lu solusyon ekimolar miktarda NaCl çıkartılıp yerine KCl konularak hazırlandı.

Çalışmada şu agonist ve antagonistler kullanılmıştır: Asetilkolin klorid, karbakol, atropin sülfat, verapamil HCl, serotonin, L-NAME. Tüm ilaçlar Sigma'dan temin edilmiş olup, kullanılmadan önce distile suda eritildi ve konsantrasyonları baz üzerinden hesaplanarak her doz banyoya 0.1 ml hacim içerisinde ilave edildi.

Agonist ilacın maksimum kasılma cevabının % 50'sini sağlayan konsantrasyonlar (ED_{50}) bulunarak pD_2 ($-\log \text{ED}_{50}$) şeklinde ifade edilmiştir.

Çalışmada elde edilen değerler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiş olup, ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılık derecesi student'in "t" testi ile saptanmıştır. Grup içi analizlerde eşleştirilmiş ve gruplar arası analizlerde ise eşleştirilmemiş test uygulanmıştır. p değerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

İzole dana koroner arterinde asetilkolin ve karbakol konsantrasyonuna bağımlı ve tekrarlanabilir tarzda kasılma cevapları oluşturdu. Ortama iki farklı konsantrasyonda ilave edilen atropin (10^{-10} , 10^{-8} M) asetilkolin ve karbakolle

Tablo 1. Atropin- Asetilkolin ve atropin-karbakol etkileşmelerinde elde edilen pD_2 değerleri.

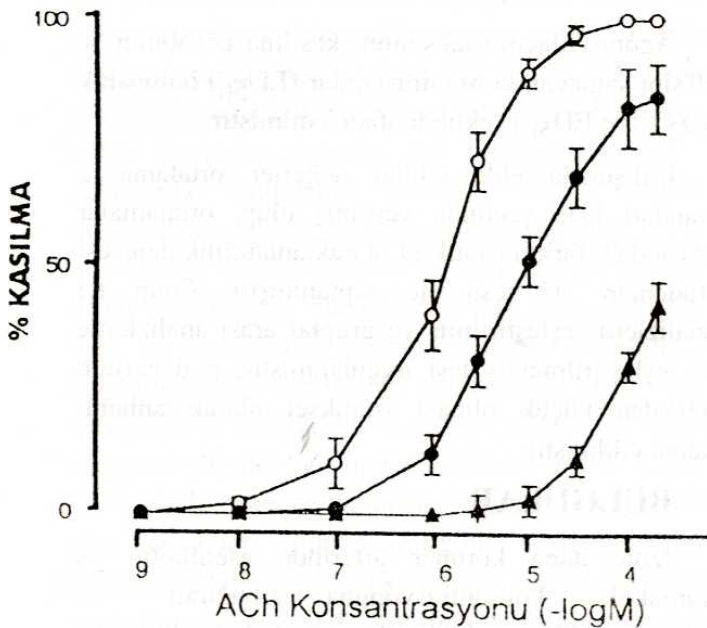
AGONİST	pD_2			n
	KONTROL	ATROPİN		
		($10^{-10}M$)	($10^{-8}M$)	
Asetilkolin	6.15 ± 0.256	$5.10 \pm 0.103^*$	-	7
Karbakol	6.05 ± 0.101	$4.76 \pm 0.201^*$	-	7

(*) $p < 0.05$ Kontrol değerlere göre.

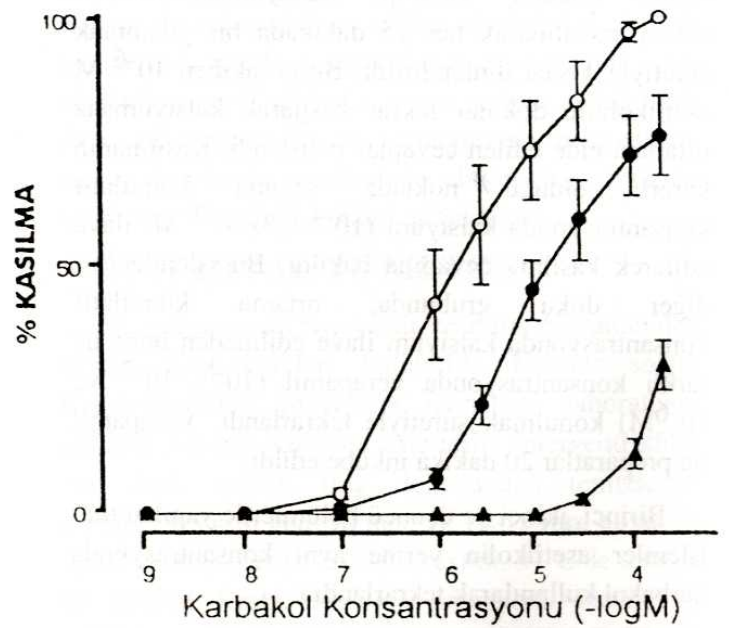
Tablo 2. Asetilkolin ve karbakole bağlı maksimum kasılma cevaplarının atropin ile % inhibisyonu

AGONİST	ATROPİN		n
	($10^{-10}M$)	($10^{-8}M$)	
Asetilkolin	16.4 ± 7.3	58.4 ± 4.64	7
Karbakol	24.1 ± 8.49	70.65 ± 5.3	7

elde edilen kontrol konsantrasyon-cevap eğrilerini doza bağımlı ve anlamlı bir şekilde sağa kaydırıldı. Ayrıca atropin kullanılan her iki konsantrasyonda da bu agonistlere bağlı maksimum kasılma cevaplarını anlamlı olarak inhibe ettiği görüldü (Şekil 1,2), (Tablo 1,2)



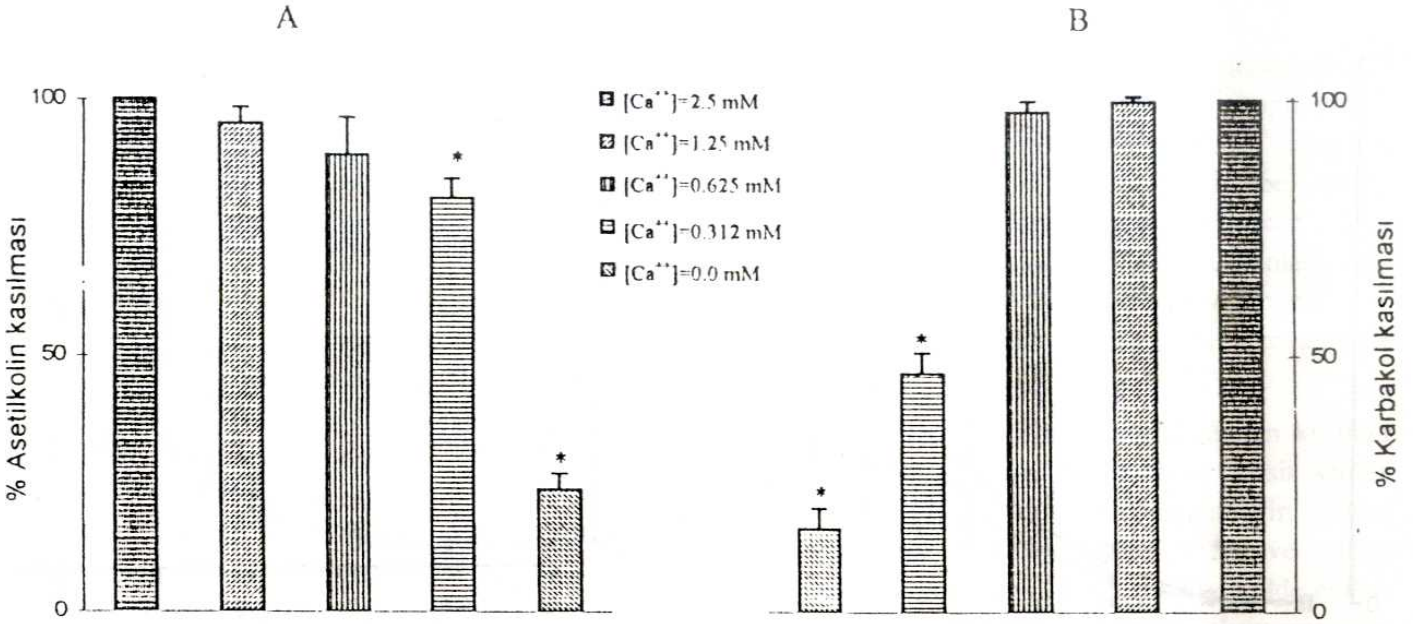
Şekil 1. Dana koroner arterinde asetilkolin ile elde edilen cevapların atropin ile inhibisyonu. ACh Kontrol (○-○). Atropin $10^{-10}M$ (●-●). Atropin $10^{-8}M$ (▲-▲)



Şekil 2. Dana koroner arterinde karbakol ile elde edilen cevapların atropin ile inhibisyonu. Karbakol Kontrol (○-○). Atropin $10^{-10}M$ (●-●). Atropin $10^{-8}M$ (▲-▲)

$10^{-6}M$ asetilkolin ve karbakol ile kalsiyumsuz-EGTA'lı ortamda, normal solusyonda elde edilen cevabın, sırasıyla % 23.76 ± 3.17 'si ve 16.27 ± 3.93 'ü elde edildi. Şekil 3a ve 3b'de görüldüğü gibi ortamın kalsiyum konsantrasyonunun artışına paralel olarak bu iki agonistede verilen kasılma cevapları artmıştır.

Kalsiyumsuz-EGTA'lı ortamda $10^{-6}M$ asetilkolinle elde edilen % 23.76 ± 3.17 'lik kasılma cevapları, ortama ilave edilen kümülatif konsantrasyonda kalsiyum ($10^{-4} - 3 \times 10^{-3}M$) ile % 89.8 ± 13.3 'lük bir orana erişmektedir. Ortama 10^{-8} , 10^{-7} ve $10^{-6}M$ verapamil konulmasıyla cevapların verapamil konsantrasyonuna bağımlı bir şekilde ve anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($P < 0.05$) (Şekil 4).



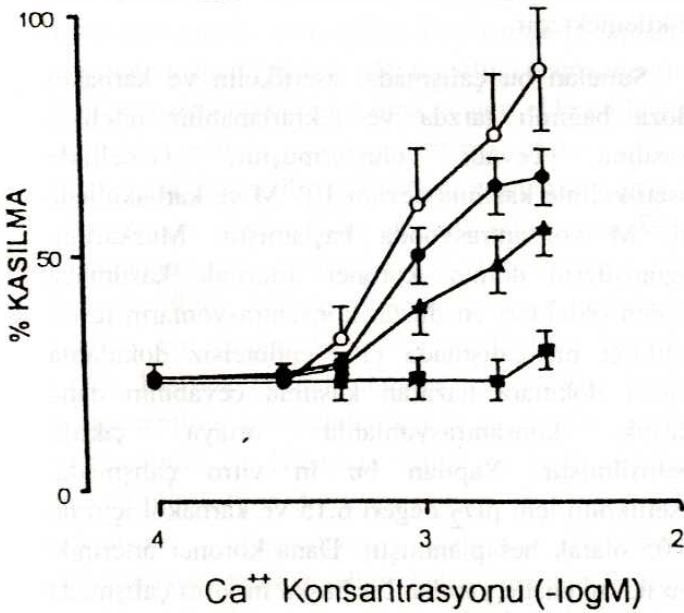
Şekil 3: Ortamın kalsiyum konsantrasyonuna göre asetilkolin ve karbakol cevaplarının değişimi.

(*) $p < 0.05$: 2.5 mM kalsiyum içeren ortamda alınan cevaplara göre.

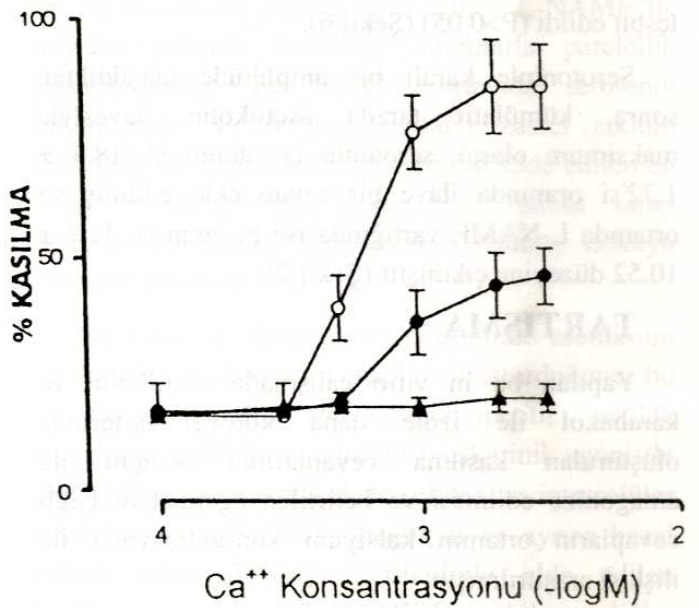
Karbakol (10^{-6} M) ile yapılan çalışmada ise Kalsiyumsuz-EGTA'lı ortamda % 16.2 ± 3.93 'lük bir kasılma elde edildi. Ortama kümülatif konsantrasyonda kalsiyum ilavesiyle % 87 ± 9.02 'lik bir kasılma cevabı alındı. 10^{-8} ve 10^{-7} M verapamil bu cevapları konsantrasyona bağımlı bir tarzda ve

anlamlı olarak inhibe etti ($P < 0.05$) (Şekil 5).

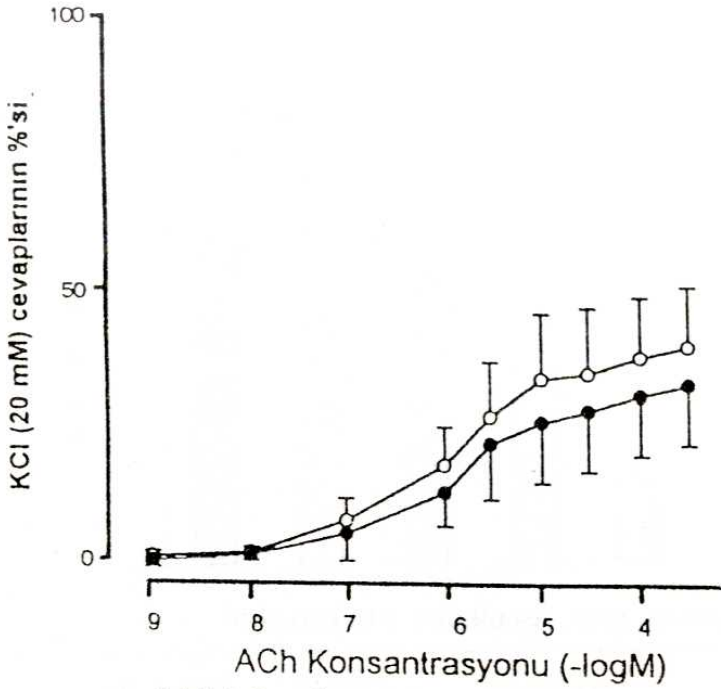
20 mM KCl ile elde edilen maksimum kasılma cevabı % 100 kabul edildiğinde, kümülatif tarzda uygulanan asetilkolinle (10^{-9} - 3×10^{-4} M) maksimum olarak % 39.95 ± 10.61 'lik bir kasılma cevabı elde edilirken, ortama 3×10^{-4} M L-NAME



Şekil 4. Dana koroner arterinde asetilkolin cevaplarının verapamil ile inhibisyonu. Kontrol (○-○), Verapamil 10^{-8} M (●-●), Verapamil 10^{-7} M (▲-▲), Verapamil 10^{-6} M (■-■)



Şekil 5. Dana koroner arterinde karbakol cevaplarının verapamil ile inhibisyonu. Kontrol (○-○), Verapamil 10^{-8} M (●-●), Verapamil 10^{-7} M (▲-▲)



Şekil 6. Dana koroner arterinde asetilkolin ile elde edilen cevaplarda L-NAME'in etkisi.
Kontrol (O—O), L-NAME varlığında (●—●)

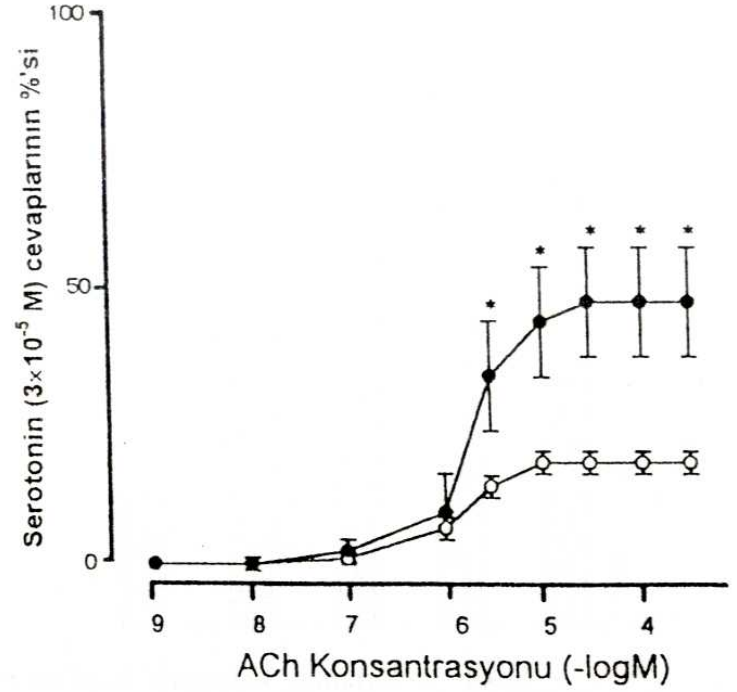
ilavesinden sonra % 32.26 ± 10.7 'lik bir cevap alınmaktadır (Şekil 6). Asetilkolinin herbir konsantrasyonu için L-NAME varlığında veya yokluğunda alınan kasılma cevapları kıyaslandığında aradaki farkın anlamlı olmadığı tesbit edildi ($P > 0.05$) (Şekil 6).

Serotoninle karalı bir amplitüde ulaşıldıktan sonra, kümülatif tarzda asetilkolin ilavesiyle maksimum olarak serotonin cevabının % 18.5 ± 1.72 'si oranında ilave bir cevap elde edilmiş ve ortamda L-NAME varlığında ise bu oran % 47.7 ± 10.52 düzeyine çıkmıştır (Şekil 7).

TARTIŞMA

Yapılan bu in vitro çalışmada asetilkolin ve karbakol ile izole dana koroner arterinde oluşturulan kasılma cevaplarının atropin ile antagonize edilmesi ve belirtilen agonistlere bağlı cevapların ortamın kalsiyum konsantrasyonu ile ilişkisi araştırılmıştır.

Ekstabil yapılarda birçok ajanla in vivo ve in vitro ortamlarda farklı cevapların alındığı bilinmektedir (6). Muskarinik reseptörler vasküler dokularda yoğun olarak bulunmakta ve reseptör



Şekil 7. Serotonin ile prekontrakte edilen dokularda asetilkolin cevapları ve bu cevaplar üzerine L-NAME'nin etkisi.
Kontrol (O—O), L-NAME varlığında (●—●)
(*) $p < 0.05$: Kontrol değerlere göre.

tipine göre farklı cevaplara neden olmaktadır (14). Ayrıca çalışmada kullanılan memeli türü, damar çapı (15), agonistin konsantrasyonu (5) ve endotel tabakasının intakt ve bozulmuş olması (6) muskarinik agonistlere verilen cevabın şeklini etkilemektedir.

Sunulan bu çalışmada, asetilkolin ve karbakol doza bağımlı tarzda ve tekrarlanabilir nitelikte kasılma cevabı oluşturmuştur. Genellikle asetilkolinle kasılma cevabı 10^{-8} M ve karbakollede 10^{-7} M konsantrasyonda başlamıştır. Muskarinik agonistlerin domuz koroner arterinde kasılmaya neden oldukları en düşük konsantrasyonların tesbit edildiği bir çalışmada (15) endotelsiz dokularda intakt dokulara nazaran kasılma cevabının daha düşük konsantrasyonlarda ortaya çıktığı belirtilmiştir. Yapılan bu in vitro çalışmada, asetilkolin için pD_2 değeri 6.15 ve karbakol için de 6.05 olarak hesaplanmıştır. Dana koroner arterinde bu iki agonistle yapılan bir başka in vitro çalışmada (16) ise asetilkolin ve karbakol için bu değerler sırasıyla 6.21 ve 5.82 olarak bulunmuştur. Bulunan bu değerler sunulan bu çalışmada bulduğumuz değerlere oldukça yakındır.

İzole dana koroner arterinde yapılan bu çalışmada, iki farklı konsantrasyonda kullanılan atropin (10^{-10} , 10^{-8} M) konsantrasyona bağlı olarak asetilkolin ve karbakol cevaplarını non-kompetitif tarzda inhibe etmiştir. Tablo 2'de de görüldüğü gibi bu iki agoniste bağlı cevapların atropinle inhibisyonunda farklılık gözlenmemiştir. Buna karşın, izole kuzu koroner arterinde yapılan bir çalışmada (9) aynı konsantrasyonlarda kullanılan atropin asetilkolinle elde edilen kasılma cevaplarını kompetitif olarak antagonize ederken, domuz koroner arterinde yapılan diğer bir çalışmada (17) ise 10^{-6} M atropin asetilkolin cevaplarını tamamen inhibe etmiştir. Bu bulgulardanda anlaşılacağı gibi, koroner arterlerde muskarinik agonistlerle atropin arasındaki etkileşmeyi çalışılan dokunun türü, agonistin niteliği ve atropin konsantrasyonu gibi birçok faktör değiştirebilmektedir.

Kalsiyum düz kaslı yapılarda depolarizasyondan sorumlu temel katyondur. Eksitasyon -kontraksiyon kenetinin sağlanabilmesi için sitoplazmik kalsiyum düzeyinin artması gerekir (18). Sunulan bu çalışmada, kalsiyumsuz-EGTA'lı ortamda asetilkolin ve karbakol ile elde edilen kasılma cevapları normal kalsiyumlu ortamda oluşan cevapların sırasıyla % 23.76 ve 16.27'si oranında olmuştur. Kalsiyumsuz ortamda asetilkolin ve karbakol varlığında ortama kümülatif tarzda ilave edilen kalsiyumla cevapların konsantrasyona bağımlı olarak arttığı saptanmıştır. Kalsiyumsuz ortamda kasılma cevabı elde edilmesi ve elde edilen cevabın ortama ilave edilen kalsiyumla artması bu agonistlere verilen cevapların oluşumunda ekstraselüler ve intraselüler kaynaklı kalsiyumun rol oynadığını göstermektedir. Bu konuyla ilgili olarak domuz koroner arterinde yapılan bir çalışmada (19), asetilkolinle bifazik tarzda kasılma cevabı olanmış ve cevabın fazik komponentinin intraselüler kalsiyum rilizine, tonik komponentin ise kalsiyum influx'ına bağlı olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca, yapılan bu in vitro çalışmada kalsiyumsuz ortama kümülatif konsantrasyonda ilave edilen kalsiyumla elde edilen cevabın farklı konsantrasyonlarda kullanılan verapamille doza bağımlı inhibe edilmeside kasılma cevaplarında ekstraselüler kalsiyuma ihtiyaç bulunduğunun önemli bir kanıtıdır. Verapamil ve

diğer kalsiyum kanal blokörlerinin birçok ekstabl dokuda olduğu gibi, vasküler düz kaslı yapılarda da vazokonstriktör ajanlara verilen cevapları ekstraselüler kalsiyum influx'ını inhibe etmek suretiyle azalttığı bilinmektedir. Nitekim dana koroner arterinde yapılan bir in vitro çalışmada (20) kalsiyum kanal blokörlerinden verapamil ve nitrendipinin serotonine bağlı kasılma cevaplarını azalttığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada asetilkolinle elde edilen kasılma cevapları ortama ilave edilen nitrik oksit sentez inhibitörü L-NAME'den etkilenmemiştir. Buna karşın domuz koroner arteri (15) ve sıçan anococcygeus kasında (21) asetilkolinle elde edilen kasılma cevaplarının nitrik oksit sentez inhibitörleriyle arttığı ve bu artışın nitrik oksit donörü L-arginin ile önlediği ileri sürülmüştür. Elde edilen bu bulguların sunulan bu çalışmadaki bulgularla çelişkili olduğu görülmektedir. Bu çelişkili durum, doku farklılığına bağlı olabileceği gibi, Buxton ve ark. (13) tarafından öne sürülen ve nitrik oksit sentez inhibitörlerinin muskarinik antagonistler gibi davranabileceği görüşüyle açıklanabilir.

Serotoninle prekontrakte edilen dokulardada asetilkolinle ilave kasılma cevaplarının elde edilmesi ve bu cevapların ortama ilave edilen L-NAME ile artması yukarıda belirtilen bulgularla paralellik göstermektedir. Bu farklılık ortamda serotonin bulunmasına ve serotonine bağlı kasıcı etkinin L-NAME ile artmasına bağlı olabilir. Elde edilen bu bulgular asetilkolinin hem bazal tonusa sahip dokuyu ve hemde prekontrakte edilmiş dokuyu kastığını göstermektedir.

Bu sonuçlar, dana koroner arterinde asetilkolin ve karbakolün kasılma cevapları oluşturduğunu, bu cevapların atropin ile non-kompetitif şekilde antagonize edildiğini ve bu iki muskarinik agonistle elde edilen cevaplarda ekstraselüler ve intraselüler kalsiyumun birlikte rol oynadığını ve ayrıca bazal tonusa sahip dokuda asetilkolinle elde edilen kasılma cevaplarının L-NAME'den etkilenmediğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Mutschler E, Feifel R, Moser U, Tacke R, Wess J, Lambrecht G. Muscarinic receptor subtypes. Lectures 1990; 13: 117-9.
2. Kerlevage AR, Fraser CM, Venter JC. Muscarinic cholinergic receptor structure: molecular biological support for subtypes. Trends Pharmacol Sci 1987; 8: 426-31.
3. Bonner TI, Young AC, Brand MR, Buckley NJ. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. Neuron 1988; 1: 403-10.
4. Holzmann S. Endothelium -induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary artery strips. J Cycl Nucl Res 1992; 8: 409.
5. Brunner F, Kühberger E, Groschner K, Poch G, Kukovetz WR. Characterization of muscarinic receptors mediating endothelium-dependent relaxation of bovine coronary artery. Eur J Pharmacol 1991; 200: 25-33.
6. Ren LM, Nakane T, Chiba S. Muscarinic receptor subtypes mediating vasodilatation and vasoconstriction in isolated, perfused simian coronary arteries. J Cardiovascular Pharmacol 1993; 22: 841-46.
7. Toda N. Isolated human coronary arteries in response to vasoconstrictor substance. Am J Physiol 1983; 245: 937-41.
8. Sakai K. Vasoconstriction produced by intracoronary cholinomimetic drugs in isolated donor-perfused hearts of rhesus monkeys, comparison with pig, dog and rabbit hearts. J Card Pharmacol 1981; 3: 500-9.
9. Simonsen U, Prieto D, Rivera L, Hernandez M, Mulvany MS, Garcia-Sacristan A. Heterogeneity of muscarinic receptors in lamb isolated coronary resistance arteries. Br J Pharmacol 1993; 190: 998-1007.
10. Yang CM, Yo YL, Wang YY. Intracellular calcium in canine cultured tracheal smooth muscle cells is regulated by M3 muscarinic receptors. Br J Pharmacol 1993; 110: 953-88.
11. Striessnig J, Catterall WA. Identification of a phenyl alkylamine binding region with in the alfa1 subunit of skeletal muscle Ca2+-channels. Biophys 1991; 59: 879.
12. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxations in rat thoracic aorta may be mediated through c-GMP. Circ Res 1983; 52: 352-57.
13. Buxton ILO, Cheek DJ, Eckman D, Westfall DP, Sanders KM, Keef KD. NG-nitro L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. Circ Res 1993; 72 (2): 387-95.
14. Eglén RM, Whiting RL. Heterogeneity of vascular muscarinic receptors. J Auton Pharmacol 1990; 19: 233-45.
15. Hashimoto M, Ishida Y, Sakuma I, Tanaka Y, Masura S. Notes on the acetylcholine-induced relaxation of porcine coronary arteries. Life Sci 1994; 54: 525-31.
16. Duckles SP. Vascular muscarinic receptors: pharmacological characterization in the bovine coronary artery. J Pharmacol Exp Ther 1988; 246 (3): 929-34.
17. Yamanue T, Brum JM, Estafanous FG, Khairallah PA, Ferrario ICM. Fentanyl attenuates porcine coronary arterial contraction through M3 muscarinic antagonism. Anesth Analg 1993; 76 (2): 382-90.
18. Tsien RW, Hess P, Mc Cleskey EW and Rosenberg RL. Calcium channels: Mechanism of selectivity permeation and block. Ann Rev Piophys Chem 1987; 1b: 265-90.
19. Ito Y, Kitamura K, Kuriyama H. Effects of acetylcholine and catecholamines on the smooth muscle cell of the porcine coronary artery. J Physiol 1979; 294: 595-611.
20. Şahin AS. Koroner arterde serotonin bağı kasilmalarda verapamil ve nitrendipinin inhibitör etkisi. (Yüksek Lisans Tezi). Konya: S.Ü. Tıp Fakültesi, 1989.
21. Rand MJ, Li CG. Modulation of acetylcholine-induced contractions of the rat anococcygeus muscle by action of nitrgic nerves. Br J Pharmacol 1993; 110: 1479-82.