

İZOLE KÖPEK SAFEN VENİNDE HİPOTERMİ İLE NORADRENALİN FENİLEFRİN VE SEROTONİN CEVAPLARININ ARTIRILMASI VE BUNUN CA²⁺ İLE İLİŞKİSİ

Dr. Ayşegül CENİK *, Dr. Ekrem ÇİÇEK *, A. Saide ŞAHİN**, Dr. Necdet DOĞAN***

ÖZET

Köpek safen veninden elde edilen spiral şeritler; oksijenlendirilmiş fizyolojik tuz solüsyonu içeren organ banyosuna konulup, noradrenalin, fenilefrin, klonidin ve serotonin ile kasıldı. Kasılmalar izometrik olarak kaydedildi. Banyo ısısının 37°C den 25°C ye düşürülmesiyle bu kasılmalarda artma gözlemlendi. Klonidin ile elde edilen kasılma cevapları hipotermi ile artmadı. 10⁻⁶ M verapamil ilavesinde, bu kasılmaların inhibe edilmediği gözlemlendi. Aynı işlem kalsiyumsuz ortamda tekrarlandığında, her üç agonist ile elde edilen kasılmalar öncekilere göre belirgin olarak küçüldü. Ancak kasılma hipotermi cevaplarında belirgin artışa neden oldu. Klonidin aynı ortamda kasılma oluşturmadı.

Sonuç olarak, köpek safen veninde belirtilen agonistlerle oluşturulan kasılma cevaplarının hipotermi ile artışında hücre içi kalsiyum depolarının önemli rolünün olduğu söylenebilir.

SUMMARY

The Effect of Hypothermia on Noradrenaline Phenylephrine and Serotonin-Induced Contractions of Canine Saphenous Vein and Role of Calcium

Canin saphenous vein strips were suspended in an organ chambers filled with oxygenated physiological salt solution, and isometric contractions were also recorded. Noradrenaline, phenylephrine and serotonin caused dose-dependent contractions which were enhanced by cooling of medium from 37 to 25°C. Clonidine also caused contractions but, these responses weren't enhanced by cooling. Both the contractions induced by these agonists and their augmentations by cooling weren't inhibited by 10⁻⁶ M verapamil. When these procedure were repeated in the Ca²⁺-free solutions, the agonists-induced contractions were smaller than that of obtained in normal medium. However except clonidine-induced contractions, these responses were enhanced by cooling.

These results were suggested that intracellular calcium pools may play a functional role in cooling-induced contractions of canine saphenous vein.

GİRİŞ

Noradrenalin, fenilefrin, klonidin ve serotonin gibi agonistler çeşitli izole damar preparatlarında kasılma meydana getirirler (1). Noradrenalin alfa₁ ve alfa₂, fenilefrin alfa₁ (2), Klonidin alfa₂ (3), serotonin ise hem S₂ tipi serotonerjik hem de alfa₁-adrenerjik reseptörler aracılığı ile kasılma cevapları oluştururlar (4, 5).

Çeşitli agonistlerin, damar düz kası preparatlarında oluşturdukları kasılma cevapları hipotermi ile artırılabilir (6). Yapılan bir çalışmada, köpek kutanöz veninde ekzojen noradrenalin ve serotonin ile oluşturulan kasılmaların, banyo ısısının 37°C den 24°C ye düşürülmesiyle belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (7).

* S.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, Yrd. Doç. Dr.

** S.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi

*** S.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, Prof. Dr.

Bilindiği gibi düz kasda eksitasyon-kontraksiyon kenetinde rol oynayan en önemli endojen madde, kalsiyum (Ca^{+2}) iyonudur. Damar düz kasında postsinaptik alfa₁-adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu, hücre içi depolardan Ca^{2+} salıverilmesini, alfa₂-adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu ise ekstraselüler Ca^{2+} 'un hücre içine girişini artırır (8). Buna karşın, presinaptik alfa₂-adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu ise ekstraselüler Ca^{+2} girişini azaltır (2).

Damar düz kas preparatlarında kalsiyum kanal blokörlerinin inhibitör etkileri kullanılan agoniste ve dokuya göre değişmektedir (9). Bu ilaçlardan biri olan, verapamil'in çeşitli dokularda ekstraselüler Ca^{+2} 'un hücre içine girişini güçlü bir şekilde bloke ettiği bilinmektedir (10).

Literatürde, damar düz kası preparatlarında oluşturulan kasılma cevaplarının hipotermi ile artışında etkin olan Ca^{+2} kaynağı ile ilgili çalışmaların pek fazla olmadığı gözlenmiştir. İzole köpek safen veninde yapılan bu çalışmada, noradrenalin, fenilefrin, klonidin ve serotonin gibi agonistlerle oluşturulan kasılma cevaplarına hipotermimin etkisi ve bu etkiden sorumlu olan Ca^{+2} kaynağının ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

S.Ü. Veteriner fakültesinden temin edilen her iki sekse ait 12-14 kg ağırlıkta Mogreal köpekler pentobarbital (30mg/kg) ile anestezi edildi. Anestezi altında her iki bacdaktan safen ven çıkarıldı. +4°C'deki fizyolojik solüsyon (Krebs-Henseleit) içinde laboratuara getirildi. Çevre dokulardan temizlenen safen ven 3-4 mm eninde ve 10-15 mm boyunda spiral şeritler halinde hazırlandı. Bu şeritler %95 O₂ + %5 CO₂ ile gazlandırılan, ısısı 37°C olan Krebs-Henseleit solüsyonu içeren 25 ml'lik organ banyosuna alındılar. Preparatlara 1 g gerilim uygulandı. Cevaplar izotonik levye aracılığı ile 10 kez büyütülerek isli kağıt üzerine kaydedildi.

Preparatlar 60 dakika süreyle dinlenmeye bırakıldı ve süre içinde belli aralıklarla taze solüsyonla yıkandı.

Dinlenme peryodunun sonunda ortama 10⁻⁶ M konsantrasyonda serotonin ilave edildi. Meydana gelen kasılma stabil hale geldiğinde banyo ısısı hızla 25°C'ye düşürüldü. Aynı işlem hipotermiden önce ortama 10⁻⁶ M konsantrasyonda verapamil ilave edilip 10 dakika süreyle inkübe edilerek tekrarlandı.

Çalışmanın bir diğer bölümünde, serotonin yerine agonist olarak noradrenalin, fenilefrin ve klonidin kullanılıp, yukarıda belirtilen şekilde, hipotermi ve verapamil'in etkisi araştırıldı.

Diğer bir çalışma grubunda ise, hipotermiye bağlı cevaplarda Ca^{+2} 'un rolünü araştırmak amacıyla; dinlenme peryodunun bitiminde preparatlar noradrenalin, fenilefrin, klonidin ve serotonin ile normal solüsyonlu ortamda kasılıp kontrol cevapları alındı. Daha sonra aynı dokular 0.77 mM Na₂EDTA içeren Ca^{+2} 'suz solüsyonla, her 15 dakikada bir yıkanarak, 1.5 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyondan sonra agonistlere ve hipotermiye verilen cevaplar araştırıldı. Agonistler herbiri farklı dokularda denendi.

Deneylerde noradrenalin (Parke-davis), fenilefrin HCl (Sigma), Klonidin HCl (Pfizer), Serotonin kreatinin sülfat (Merck) ve Verapamil (Schering) kullanıldı. Belirtilen konsantrasyonlar baz ağırlıkları üzerinden hesaplandı ve ilaçlar distile suda eritilerek kullanıldı.

Deneylerde kullanılan fizyolojik solüsyonun içeriği mM olarak şöyledir: NaCl 118.00; KCl 4.70; CaCl₂ 1.60; MgSO₄ 1.20; NaHCO₃ 24.90; KH₂PO₄ 1.20; Glukoz 11.10; Askorbik asid 0.28.

Bulgular, ortalama \pm standart hata şeklinde gösterilip ortalamalar arasındaki farkların önem kontrolü Student'in "t" testi ile belirlendi (11). p değerlerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Köpek safen venine 10⁻⁶M konsantrasyonda uygulanan noradrenalin, fenilefrin, klonidin ve serotonin kasılma cevapları oluşturdu. Banyo ısısının 37°C den 25°C ye düşürülmesiyle noradrenalin, fenilefrin ve serotonin'e bağlı kasılma cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar meydana geldi (p<0.05). Buna karşın klonidin hipotermiye bağlı cevap artışı meydana getirmedi. Ortalama ilave edilen 10⁻⁶M konsantrasyondaki verapamil, hipotermiye bağlı olarak artan noradrenalin, fenilefrin, serotonin cevaplarını inhibe etmedi (Tablo I).

TABLO I

Ca²⁺'lu ortamda agonistlere bağlı kasılmaların hipotermi ile artırılması ve verapamil'in etkisi.
CEVAP (%'de kontrol)

AGONİST	HİPOTERMİ	VERAPAMIL+HİPOTERMİ
Noradrenalin.....	87.5 \pm 7.98.....	94.00 \pm 3.4
Fenilefrin.....	48.2 \pm 8.9.....	40.6 \pm 14
Klonidin.....	0.....	0
Serotonin.....	62.7 \pm 7.07.....	74.00 \pm 8.64

Ca²⁺'suz ortamda yapılan çalışmalarda, agonistlerin oluşturduğu kasılmalar, Ca²⁺'lu ortamdakilere oranla anlamlı olarak azaldı. Bu azalma noradrenalin, fenilefrin ve serotonin için sırasıyla (%70 \pm 2.4, 43.1 \pm 4.2, 19.9 \pm 5.6) idi. (p<0.05) Ca²⁺'suz ortamda elde edilen bu kasılmalar hipotermi ile de anlamlı olarak artırılmıştır (p<0.05;Tablo II). Ca²⁺'suz ortamda inkübe edilen dokularda klonidin kasılma oluşturmadı.

TABLO II

Ca²⁺'suz ortamda agonistlerle elde edilen kasılmaların hipotermi ile artırılması.

AGONİST	% CEVAP	HİPOTERMİ
Noradrenalin.....		121.6 \pm 18.2
Fenilefrin.....		143.32 \pm 28.3
Serotonin.....		48.96 \pm 8.3

TARTIŞMA

Alfa-adrenerjik ve serotonerjik reseptör tiplerini bir arada içeren bir doku olan (12,13) köpek safen veninde yapılan bu çalışmanın, normal solüsyonla yürütülen bölümünde; noradrenalin, fenilefrin, klonidin ve serotonin $10^{-6}M$ konsantrasyonlarda tekrarlanabilir nitelikte olan kasılmalara neden olmuştur. Bu kasılmalardan sorumlu olan reseptör tipinin noradrenalinde alfa₁ ve alfa₂, fenilefrinde alfa₁, (14), klonidinde alfa₂ (3), ve 5-HT'de serotonerjik ve alfa₁ reseptörler (4, 5) olduğu bilinmektedir. Noradrenalin, fenilefrin ve 5-HT'ye bağlı kasılma cevapları hipotermi ile anlamlı bir şekilde arttırılmıştır. Bu artan cevaba Ca^{++} iyonunun aracılık ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (16, 17). Sunulan bu çalışmada, ekstraselüler Ca^{++} girişini inhibe ettiği bilinen ve bir Ca^{++} -antagonisti olan verapamil (10, 18) hipotermiye bağlı cevap artışlarını inhibe edememiştir. Alfa₂-adrenerjik reseptörleri aktive ederek oluşan klonidin kasılmaları ise hipotermi ile arttırılmamıştır. Bu durum, ekstraselüler Ca^{++} kaynağını kullanarak kasılma yaptığı bilinen K^{+} 'un (19) hipotermi uygulandığında cevap artışı olmadığını belirten literatür bilgilerine uymaktadır (20, 21).

Verapamil'in hipotermi ile oluşturulan cevap artışlarını inhibe etmemesi ve klonidin'e bağlı kasılmaların hipotermi tarafından arttırılmaması, hipotermiye bağlı kasılmalarda intraselüler Ca^{++} 'un kullanıldığını ortaya koymaktadır. Literatürde de bu bulguyu destekleyen çalışmalar vardır (16, 22).

Na_2EDTA içeren solüsyonun Ca^{++} 'suz ekstraselüler ortam sağladığı ve ayrıca hücre membranına zayıf bir şekilde bağlı bulunan Ca^{++} 'uda uzaklaştırdığı bilinmektedir (23). Ekstraselüler Ca^{++} içermediği kabul edilen bu ortamda yapılan çalışmalarda, noradrenalin, fenilefrin ve 5-HT kasılma oluşturmuş ve bu kasılma hipotermi ile yine anlamlı olarak arttırılmıştır. Bu bulgu yukarıda da belirtildiği gibi hipotermiye verilen cevap artışında rol oynayan fonksiyonel Ca^{++} 'un intraselüler kaynaklı olduğu görüşünü desteklemektedir.

Teşekkür: Çalışmada deney hayvanlarının temininde çok değerli yardımlarını gördüğümüz sayın Prof. Dr. Hümevra Özgen ve Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim üyelerine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- 1.Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W., Murad, F.: Goodman Gilman seventh ed. Mac Millan Publishing company, Newyork, 1985.
- 2.Kayaalp, S.O.: Tıbbi Farmakoloji. 3. Baskı. Ulucan Matbaası Ankara, 1986.
3. Timmermans, P.B.M.W.M., Vanzwieten, P.A.: Mini-Review the Postsynaptic alfa₂-adrenoreceptor. J.Auton. Pharmac. 1,171-183, 1981.
- 4.Vanhoutte, P.M., Cohen, R.A., Van Nueten J.M.: Serotonin and arterial vessels. The Journal of Cardiovascular Pharmacology, 6:2, 421-428, 1984.
5. Van Nueten J.M., Janssens, W.I., Vanhoutte, P.M.: Serotonin and vascular reactivity. Pharmacological Research Communications. 17:7, 585-608, 1985.
- 6.Vanhoutte, P.M.: Physical factors and regulation of vascular smooth muscle function. Bohr. D.F., Somlyo, A.P., Sparks, H. (Ed) Handbook of Physiology. The American Physiological Society, 447, 1980.

7. Van Nueten, J.M., Ridder, W., Vanhoutte, M.P.: Ketanserin and vascular contractions in response to cooling. *European Journal of Pharmacology*. 99, 329-332, 1984.
8. Timmermans, P.B.M.W.M., Chiv, A.T., Thoolan, M.J.M.C.: Calcium Handling in vasoconstriction to stimulation of Alpha₁-and Alpha₂-Adrenoceptors. *Can. J. Physiological Pharmacology*. 65, 1649-1657, 1986.
9. Glusa, E., Markwardt, F.: Effects of calcium channel blockers on the contractile response to dihydroergotamine in isolated human femoral veins. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of pharmacology* 335, 529-533, 1987.
10. Mas-Oliva, J., Mayler W.G.: The effect of verapamil on the Ca⁺⁺-Transporting and Ca⁺⁺-ATPase activity of isolated cardiaca sarcolemmal preparations. *Br. J. Pharmacol.* 70, 617-624, 1980.
11. Goldstein, A.: Biostatistics and introductory text. The McMillan Co., Newyork, 1971.
12. De Mey, J., Vanhoutte, P.M.: Uneven distribution of postjunctional alpha₁ and alpha₂ like adrenoceptors in canine arterial and venous smooth muscle. *Circ. Res.* 48, 875-884, 1981.
13. Constantine, J, W., Lebel, W, Archer, R.: Functional presynaptic alpha₂ but not alpha₁-adrenoceptors in dog Saphenous vein exposed to phenoxybenzamine. *Eur. J., Pharmacol.* 85, 325-329, 1982.
14. Alabaster, V.A., Kein, R, F., Peters, C.J.: Comparison of activity of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in dog and rabbit saphenous vein. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 330-33-36, 1985.
15. Doğan, N., Çiçek, E., Cenik, A., Şingirik, A., Kılıç, M., Özcan, A.: İnsan umbilikal arterinde serotonin'e bağlı kasılmalarda kalsiyumun rolü. *İç Anadolu Tıp Dergisi.* 1:4, 18-22 1989.
16. Sunano, S.: The effects of Ca⁺⁺ antagonists, manganese and lanthanum on cooling-induced contracture of depolarized vas deferens. *Japan J. Pharmacol.* 34, 51-56, 1984.
17. Kurihara, S., Kuriyama, H., Magaribuchi, T.: Effects of rapid cooling on the smooth muscle of the electrical properties of the smooth muscle of the guinea pig urinary bladder, *J. Physiol.* 238, 413. 1974.
18. Leff, P., Morse, J.M.: Resultant pharmacological actions of verapamil; Quantification of competitive 5-hydroxytryptamine antagonism in combination with calcium antagonists. *The Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics.* 240, 284-287, 1986.
19. Anderson, K.E., Edvinsson, L., Mac Kenzie, E, T., Skarby, T., Young, A.R.: Influence of ekstracellular calcium antagonists on contractions induced by potassium and prostaglandin F_{2a} in isolated cerebral and mesenteric arteries of the cat. *Br. J., Pharmacol,* 79, 135-140, 1983.
20. Janssens, W. J., Vanhoutte, P.M.: Instantaneous changes of alpha adrenoceptor affinity caused by moderate cooling in canine cutaneous veins. *AM.J., Physiol.* 234, H330, 1978.
21. Sunano, S., Miyazaki, E.: Effects of temparature and metabolic inhibition on high-K-induced contracture of vas deferens. *J. Physiol. Soc. Japan.* 41, 374, 1979.
22. Ishii, T., Shimo, Y.: Cooling-induced spersensitivity to acetylcholine in the isolated airway smooth muscle of the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 329, 167, 1985.
23. Karaki, H., Weiss, G.B.: Effects of stimulatory agents on mobilization of high and low affinity site 45 Ca⁺⁺ in rabbit aortic smooth muscle. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 213, 450, 1980.