

TAVŞAN TORASİK AORTASINDA ACh, ATP ve NA'E BAĞLI CEVAPLARA L-NAME'İN ETKİSİ

Dr. Ekrem ÇİÇEK*, Dr. H. İbrahim KARABACAK*, Dr. K. Esra ATALIK*, Dr. Hülagu BARIŞKANER*

* S.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Sunulan bu *in vitro* çalışmada, endotelli ve endotelsiz tavşan torasik aortasında noradrenalin (NA) ile oluşan cevapların asetilkolin (ACh) ve adenozin 5- trifosfat (ATP) ile inhibisyonuna ve NA'e bağlı kasılma üzerine nitrik oksit (NO) sentez inhibitörü N^G - nitro L-arjinin metil ester (L-NAME)'in etkisi araştırılmıştır. 10^{-5} M NA, endotelli ve endotelsiz dokuda kasılma cevapları oluşturmuş, endotelli dokuda 10^{-6} M indometasin varlığında bu cevaplar, kümülatif konsantrasyonda (10^{-9} - 10^{-4} M) uygulanan ACh ile % 77.42 ± 6.29 , aynı konsantrasyonda ATP tarafından da % 65.76 ± 8.06 oranında inhibe edilmiştir. Ortamda L-NAME varlığında ise, söz konusu ajanlara bağlı inhibisyon sırasıyla % 28.37 ± 2.50 ve % 21.56 ± 2.55 oranında bulunmuştur. Endotelsiz dokuda ACh'e bağlı inhibisyon meydana gelmezken, ATP NA cevaplarını % 23.17 ± 2.61 oranında inhibe etmiş ve ortama L-NAME ilavesi bu cevabı değiştirmemiştir. Bir başka bölümde kümülatif konsantrasyonda (10^{-9} - 10^{-4} M) uygulanan NA'e bağlı kasılma cevapları endotelli dokuda 10^{-6} L-NAME varlığında % 131.56 ± 8.43 oranında bulunurken, endotelsiz dokuda L-NAME'e bağlı bir etki görülmemiştir. Çalışmada ayrıca L-NAME'in bazal gerilim üzerine etkisiz olduğu da saptanmıştır.

Elde edilen sonuçlar; kullanılan dokuda NA ile oluşan kasılmaların ACh ile inhibisyonunda endotel tabakasının sağlam olmasının gerektiğini, buna karşın ATP gevşemelerinin endotelden bağımsız olarak da gerçekleşebileceğini, ayrıca L-NAME'in endotelli dokuda her iki ajana bağlı NO aracılı gevşemeleri inhibe ettiğini ve NA'e bağlı kasılmaları da artırdığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Asetilkolin, adenozin 5-trifosfat, N^G - nitro L-arjinin metil ester, aorta, *in vitro*

SUMMARY

The Effect Of L-NAME On Responses Due To ACh, ATP And NA In Rabbit Thoracic Aorta.

In the present study, the effects of N^G -nitro L-arginin methyl ester (L-NAME), a nitric oxide (NO) synthesis inhibitor, on the contraction due to noradrenaline (NA) and on the inhibition of the NA-induced contractile responses by acetylcholine (ACh) and adenosine 5-triphosphat (ATP) have been investigated in rabbit thoracic aorta with or without endothelium. 10^{-5} M NA-induced contractile responses in tissues with or without endothelium and in the tissue with endothelium, the inhibition of these contraction was found 77.42 ± 6.29 % and 65.76 ± 8.06 %, respectively by addition of cumulative concentration (10^{-9} - 10^{-4} M) of ACh and ATP. In the presence of L-NAME, the inhibition due to of these agents was found as 28.37 ± 2.5 % and 21.56 ± 2.55 % respectively. While any inhibition due to ACh does not occur in the tissue without endothelium ATP inhibited the reponses of NA at the rate of 23.17 ± 2.61 % and addition of L-NAME to the medium did not change the responses. In another part, in the tissue with endothelium the NA (10^{-9} - 10^{-4} M) induced contractile responses was found 131.56 ± 8.43 % in the presence of L-NAME (10^{-6} M) Whereas there's no effect due to L-NAME in the tissue without endothelium. It has also been reported that L-NAME has no effects on the basal tension, in this study.

The results suggested that, an intact endothelium is essential for the inhibition of the muscle contraction with ACh in tissues used. Moreover it's also found that ATP-relaxations were free from endothelium, in addition that L-NAME inhibits NO-mediated relaxations due to both agents in endothelial tissues and increased the contractions due to NA, too.

Key Words: ACh, Adenozin 5-triphosphat, N^G -Nitro L-arginin methyl ester, Aorta.

GİRİŞ

Vasküler düz kaslı yapıların mekanik cevapları, endotel hücrelerinden salıverilen "endotele bağlı gevşetici faktör" (EDRF, EDNO), endotelin, PGI₂, tromboksan A₂ ve "endotele bağlı hiperlorize edici faktör" (EDHF) gibi gevşetici ve kasıcı maddeler tarafından regüle edilmektedir. EDRF'nin kimyasal yapısının NO veya ona çok benzeyen bir madde olduğunu gösteren birçok önemli deneysel kanıtlar ortaya konmuştur. NO, endotel hücrelerinde L-arjinin guanido nitrojenin kalsiyuma bağımlı NO sentetaz enzimi aracılığı ile oksitlenmesi sonucu sentez edilmektedir (1,2). Rees ve arkadaşları (3), bu olayın N^G-monometil - L-arjinin (L-NMMA) ve L-NAME tarafından selektif olarak inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

ACh ve ATP gibi birçok nörohümmoral ajan endotelden EDRF salıverilmesini stimüle etmektedir (4,5). Li ve Kuriyama (6), yaptıkları bir çalışmada, NA ile kasılan tavşan torasik aortasında kümülatif konsantrasyonda uygulanan ACh'in gevşemeye neden olduğunu ve N^G-nitro - L-arjinin (L-NNA)'in bu cevapları inhibe ettiğini göstermişlerdir. Sıçan mezenterik arterinde yapılan benzer bir çalışmada da endotelli dokuda, L-NAME ve L-NMMA'in ACh'e verilen gevşeme cevabını inhibe ettiği ortaya konmuştur (7). Yapılan birçok çalışmada ATP'in damar yatağında hem endotel hücreleri aracılığı hem de düz kasları üzerinden gevşeme yaptığı gösterilmiştir (8,9). Nitekim, yapılan bir çalışmada, endotelsiz tavşan torasik aortasında ATP'a bağlı gevşemenin endotelli dokuya göre daha az oranda meydana geldiği (10), başka bir çalışmada ise, izole kobay koroner damarlarında ATP ve diğer purinerjik ajanlara bağlı etkinin L-NAME tarafından inhibe edildiği gözlenmiştir (11).

Damar yatağında kasıcı ajanlar ile meydana gelen maksimum kasılmanın endotelsiz yada nitrik oksit sentez inhibitörü ajan varlığında endotelli

dokuda, endoteli sağlam dokuya göre daha fazla olduğu yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur. Trezise ve arkadaşları (12), Tavşan baziler arterinde yaptıkları bir çalışmada, endotelsiz dokuda serotonine verilen cevapta artış meydana geldiğini, endotelli dokuda bu ajana bağlı kasıcı etkiyi deprese eden bir faktörün salıverildiğini, bunun da EDRF olduğunu belirterek, aynı zamanda benzer cevabın nitrik oksit sentez inhibitörü L-N^G-nitro-arjinin (L-NOARG) varlığında da oluştuğunu göstermişlerdir.

Yapılan bu in vitro çalışmada, NA ile kasılan endotelli ve endotelsiz tavşan torasik aortasında, ACh ve ATP'a bağlı gevşeme cevapları ile NA'e verilen kasılmalar üzerine nitrik oksit sentez inhibitörü L-NAME'in etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Cinsiyet farkı gözetmeksizin seçilen erişkin New-Zeland türü tavşanlar (2-2.5 kg), karotis arterleri kesilerek öldürüldü. Göğüs açılarak torasik aorta özenle çıkarıldı. Krebs-Henseleit solüsyonu içerisine alınan arterler, çevre dokulardan temizlenerek 2-3 mm kalınlığında ringler haline getirildi. Her defasında hazırlanan iki preparattan birinin endotel tabakası, pamuk iplik yardımıyla lümeni hafifce sürtmek suretiyle mekanik yolla tahrip edildi. Hazırlanan preparatlar 25 ml Krebs-Henseleit solüsyonu içeren, 37°C'da ısıtılan ve % 95 O₂-% 5 CO₂ karışımı ile sürekli gazlandırılan organ banyosuna alındılar. 1.5 g gerilim uygulanarak 90 dakika süreyle dinlenmeye bırakıldı. Bu süre içerisinde dokular her 15 dakikada bir yıkandı. İlaçlara verilen cevaplar, bir transduser (Harvard) aracılığıyla izometrik olarak kaydedildi.

Çalışmanın birinci bölümünde, endoteli sağlam dokular, 20 dakika süreyle inkübe edilen 10⁻⁶M indometasin varlığında 10⁻⁵M NA ile kasıldı. Maksimum cevaba ulaşıldığında ortama kümülatif konsantrasyonda (10⁻⁹ - 10⁻⁴M) ACh veya ATP ilave edilip, oluşan gevşeme cevapları gözlemlendi.

Dokular yıkanıp dinlendirildi. Tekrar aynı konsantrasyonda NA ile kasıldı ve ortama 10^{-6} M L-NAME ilave edilerek 25 dakika süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda yukarıda belirtilen işlemler tekrarlandı. Aynı prosedür endoteli uzaklaştırılan dokularda da denendi. Son olarak aynı uygulama endotelli dokuda banyoya indometasin solventi ilave edilerek yapıldı.

Çalışmanın ikinci bölümünde, 10^{-6} M indometasin varlığında endotelli ve endotelsiz dokular kümülatif konsantrasyonda (10^{-9} - 10^{-4} M) NA ilavesiyle kasıldı. Maksimum cevap elde edildikten sonra, dokular yıkanarak bazal düzeye inildi. Ortama 10^{-6} M L-NAME ilave edilerek 25 dakika süreyle inkübe edildi. Bu süre sonunda aynı şekilde NA uygulanarak oluşan cevaplar gözlemlendi.

NA'e bağlı kasılmalar 100 olarak kabul edilip, ACh, ATP ve L-NAME varlığında NA ile meydana gelen cevaplar bunun %'si olarak değerlendirildi.. Elde edilen değerler ortalama±standart hata şeklinde belirlendi. Ortalamalar arasındaki fark Student'in 't' testi ile hesaplandı (13) ve p değerinin 0.05'den küçük olması halinde ortalamalar arasındaki fark anlamlı kabul edildi.

Deneylerde kullanılan Krebs-Henseleit solüsyonunun içeriği mM olarak şöyledir: NaCl 118.00, KCl 4.70, CaCl₂ 2.5, MgSO₄, 1.20, NaHCO₃, 24.90, KH₂PO₄ 1.20, Glukoz 11.20. Kullanılan İlaçlar: Noradrenalin HCl (Sigma), asetilkolin (Sigma), ATP (Sigma), L-NAME (Sigma), indometasin (Sigma). İndometasin (10^{-5} M) stok solüsyonu etanol ile hazırlandı.

BULGULAR

Endotelli ve endotelsiz tavşan torasik aortasında 10^{-5} M konsantrasyonda uygulanan NA,

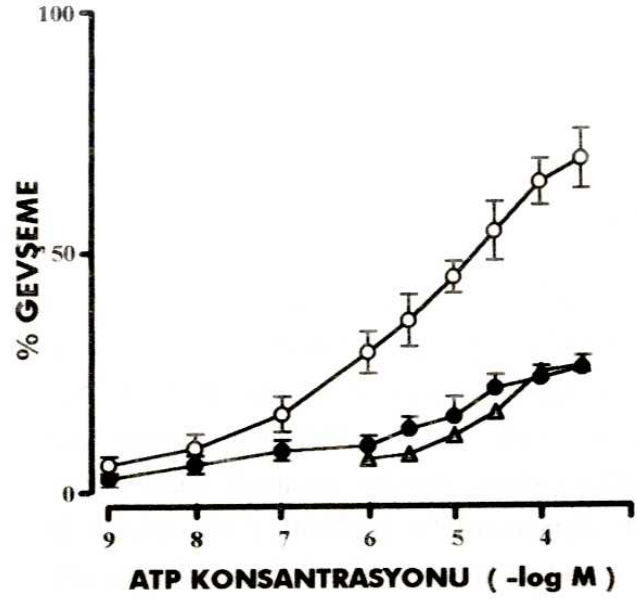
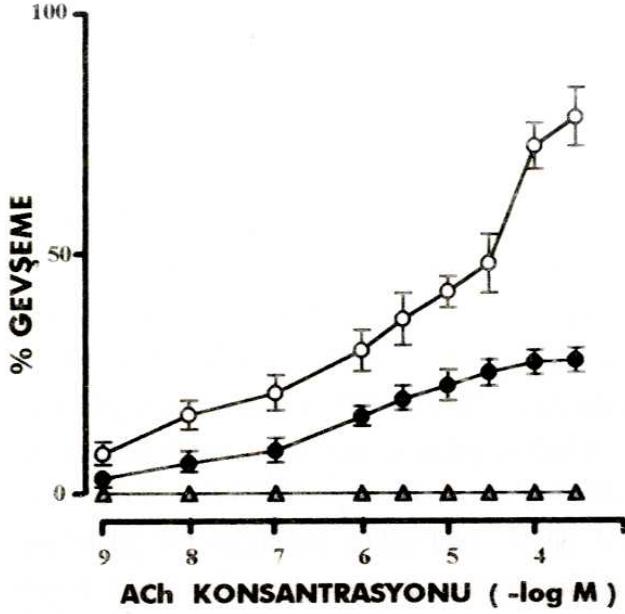
tekrarlanabilir nitelikte ve zamana bağlı değişme göstermeyen kasılmalar meydana getirdi. Ortama kümülatif konsantrasyonda (10^{-9} - 10^{-4} M) uygulanan ACh, bu kasılmaları endotelli dokuda % 77.42 ± 6.29 inhibe etti. Bu inhibisyon 10^{-6} M L-NAME varlığında % 28.37 ± 2.50 oranında bulundu. Endotelsiz dokuda ise, ACh'e bağlı bir inhibisyon görülmedi (Şekil 1).

Diğer bir dokuya kümülatif konsantrasyonda uygulanan ATP, endotelli dokuda NA'e bağlı kasılmaları % 65.76 ± 8.06 oranında inhibe ederken, L-NAME varlığında söz konusu inhibisyon, % 21.56 ± 2.55 oranında oluştu. Endotelsiz dokuda ise, ATP ile % 23.17 ± 2.61 oranında bir inhibisyon gözlemlendi (Şekil 2) ve L-NAME bu cevabı değiştirmedi. İndometasin solventi ile yapılan kontrollerde solvente bağlı bir etki oluşmadı.

Çalışmanın başka bir bölümünde kümülatif konsantrasyonda uygulanan NA, doza bağımlı bir şekilde kasılmaya neden oldu. Ortamda 10^{-6} M L-NAME varlığında bu kasılma endotelli dokuda kontrol cevaba göre, % 131.56 ± 8.43 oranında meydana geldi (Şekil 3) ve bu söz konusu kasılmalara ait EC₅₀ değerleri arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 1). Ayrıca endotelli dokuda bazal gerilim üzerine L-NAME ve indometasinin, endotelsiz dokuda ise, L-NAME'in NA'e bağlı cevaplar üzerine bir etkisi gözlemlenmedi.

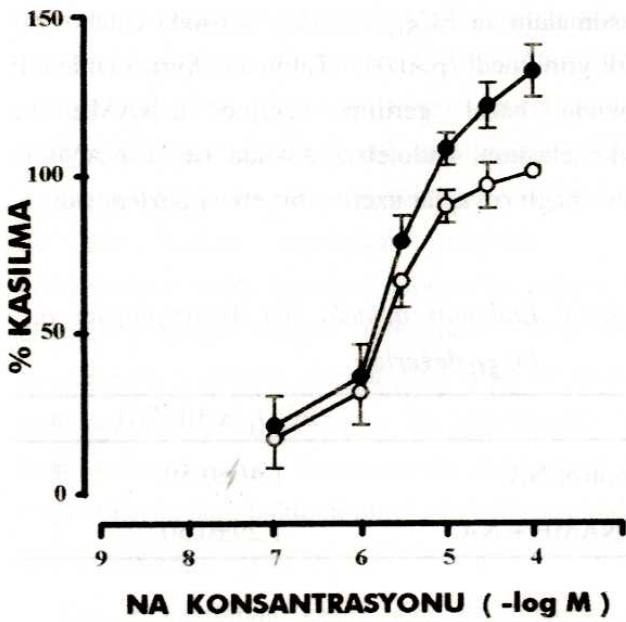
Tablo 1. Endotelli dokuda NA kasılmalarına ait EC₅₀ değerleri.

	EC ₅₀ (x 10^{-6} M)	n
Kontrol NA	1.46 ± 0.59	7
L-NAME + NA	1.29 ± 0.50	7



Şekil 1-2. NA ile kasılan dokuda ACh (Şekil 1) ve ATP (Şekil 2)'a verilen cevaplar

O—O: Endotelli dokuda (kontrol), ●—●: endotelli dokuda L-NAME varlığında, ▲—▲ : endotelsiz dokuda



Şekil 3: Endotelli dokuda NA'ye verilen kasılma cevapları

O—O: Kontrol, ●—● : L-NAME varlığında

TARTIŞMA

Tavşan torasik aortasında yapılan bu in vitro çalışmada; NO sentez inhibitörü L-NAME, NA ile kasılan endotelli dokuda ACh ve ATP'a bağlı gevşemeleri inhibe etmiş ve NA'e bağlı kasılmaları ise artırmıştır.

ACh, çeşitli damar yataklarının endotel tabakasında bulunan M₃-tipi muskarinik reseptörleri aktive ederek, Ca²⁺/kalmodulin'e bağımlı NO üretimini artırmaktadır. NO, L-arjininden sentezlenen bir madde olup, düz kasta guanilat siklazı aktive ederek gevşemeye neden olmaktadır (14). NA ile kasılan endotelli tavşan torasik aortası ve sıçan mezenterik arterinde yapılan çalışmalarda, ACh'e bağlı gevşemenin söz konusu reseptörün uyarılması sonucu NO saliverilmesi ile meydana geldiği gösterilmiştir (6,15). Sunulan bu çalışmada, ATP, ACh'den farklı olarak endotelsiz dokuda da konsantrasyona bağlı gevşeme yapmıştır. Bu bulguyu destekler şekilde, Pearson ve Gordon

(8) ATP'in vasküler tonusu, endotelden bağımsız olarak düz kasta da modüle ettiğini ileri sürmüşlerdir. ATP'in farklı analogları kullanılarak yapılan çalışmalarda, iki farklı purinoseptörün, varlığı ortaya konmuştur. Bunlardan P_{2x} 'in damar düz kasında kasılmalardan, P_{2y} 'nin ise endotele bağlı gevşemelerden sorumlu olduğu saptanmıştır (10). Nitekim Chinellato ve arkadaşları (16) tavşan torasik aortasında yaptıkları bir çalışmada, selektif P_{2y} -purinoseptör agonisti 2-metiltiyo-ATP kullanarak ATP'a bağlı gevşemenin, söz konusu purinoseptörün uyarılması ile NO salıverilmesi sonucu meydana geldiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca P_{2y} -purinoseptörün endotel hücrelerinden başka damar düz kası hücrelerinde de bulunduğu saptanmıştır (17) Dolayısıyla bu çalışmada endotelsiz dokuda ATP'a bağlı gevşemenin söz konusu reseptör aracılığı ile meydana geldiği savunulabilir.

Endotelli dokuda, NO sentezinin L-NAME ve benzeri, ajanlar tarafından inhibe olması ACh ve ATP'a bağlı gevşemelerin azalmasına neden olmaktadır. Benzer şekilde, izole sıçan aortası (3) ve mezenterik arterinde (18) ACh ve kobay koroner arterinde ATP (11)'e bağlı gevşemelerin L-NAME ile inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmada elde edilen bulguların, benzer araştırmaların sonuçlarıyla uyumlu olduğu söylenebilir.

Çeşitli agonistlere bağlı kasılma cevaplarının endotel varlığında inhibe olduğu bilinmektedir. Nitekim, Kaneko ve Sunano (19) izole sıçan aortasında NA'e bağlı kasılma üzerine NO'in rolünü araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, bu agoniste bağlı kasılmanın, endotel hücrelerinin mekanik yolla uzaklaştırılmasıyla ya da L-NAME veya L-NMMA varlığında anlamlı olarak arttığını bildirmişlerdir. Cocks ve Angus (20) da bu bulgulara paralel olarak, NA'e bağlı kasılma cevabının endotel varlığında deprese olduğunu belirterek, bunu spontan veya stimüle edilmiş NO salıverilmesinin söz konusu kasılma üzerine inhibitör rolü şeklinde izah etmişlerdir. Bu çalışmada 10^{-6} M L-NAME varlığında NA'e bağlı maksimum kasılma cevabı kontrole göre artmış ancak EC_{50} değerleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Elde edilen bulgular, kullanılan agoniste bağlı kasılmanın bazal NO salıverilmesinden etkilenebileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada; L-NAME'in endotelli dokuda ACh ve ATP'a bağlı NO aracılı gevşemeleri inhibe ettiği, bu inhibisyonun ATP ile endotelsiz dokuda da meydana geldiği, ayrıca NA'e bağlı kasılma cevabında NO'in inhibitör bir rolünün olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Moncada S. and Palmer RMJ. The L-arginine: nitric oxide pathway in the vessel wall. In Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System (Edited by Moncada S and Higgs E.A). Amsterdam: 1990, 19-33.
2. Palme RMJ, Ferrige AG, and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxin factor. Nature.1987; 327: 524-26.
3. Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S: Characteristics of there inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. Br J Pharmacol 1990; 101: 746-52.
4. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of vascular endothelium. New Engl JMed 1990; 323: 27-36.
5. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. Hypertension. 1989; 13: 658-67.
6. Li J Y and Kuriyama H. Comparison of actions of endothelium-derived nitric oxide and sodium nitroprusside on mechanical responses evoked in aorta and mesenteric artery of the rabbit Gen Pharmacol 1993; 24 (2): 377-85.
7. Taylor PD, McCarthy AL, Thomas CR, Paston L. Endothelium - dependent relaxation and noradrenalin sensitivity in mesenteric resistance arteries of streptozotocin - induced diabetic rats. Br J Pharmacol 1992; 107: 393-9.
8. Pearson J.Y. and Gordon JL. P2 purinoceptors in the blood vessel wall. Biochem Pharmac 1989; 38: 4157-163.
9. Chinellato A, Pandolfo L, Ragazzi E, Zamboni M, Frolidi G, De Biassi M, Caparrotta L and Fassina G. Effects of age on rabbit responses to relaxant endothelium-dependent and endothelium-independent agents. Bloodess 1991; 28: 358-65.

10. Chinellato A, Ragazzi E, Pandolfo L, Frolidi G, Caparotta L, and Fassina G. Pharmacological characterization of ATP receptors mediating vasodilation on isolated rabbit aorta. *Gen Pharmacol* 1992; 23: 861 - 5.
11. Vials A, and Burnstock G. Effects of nitric oxide synthase inhibitors, L-NG- nitro arginine and L-NG- nitro arginine methyl ester, on responses to vasodilators of the guinea - pig coronary vasculature *Br J Pharmacol* 1992; 107 : 604 - 9.
12. Trezise DJ, Drew GM, Weston AH. Analysis of the depressant effect of the endothelium on contractions of rabbit isolated basilar artery to 5 - hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 587 - 92.
13. Goldstein A. Biostatics and introductory text the Mc Millan Co., New York, 1971.
14. Brunner F, Kühberger E, Groscher K, Pösch G, Kukovetz WR. Characterization of muscarinic receptors mediating endothelium - dependent relaxation of bovine coronary artery. *Eur J Pharmacol* 1991; 200: 25 - 33.
15. Vuorinen P, Pörsti I, Metsä-Ketela T, Manninen V, Vapaatalo H, Laustiola KE. Endothelium-dependent and independent effects of exogenous ATP, adenosine, GTP and guanosine on vascular tone and cyclic nucleotide accumulation of rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 279-84.
16. Chinellato LA, Ragazzi E, Pandolfo L, Frolidi G, Caparotta L, Fassina G. Pharmacological characterization of a new purinergic receptor site in rabbit aorta. *Gen Pharmacol* 1992; 23 (6): 1067-71.
17. Brizzolara AL and Burnstock G. Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation of the hepatic artery of rabbit. *Br J Pharmacol* 1991; 103: 1206-12.
18. Bennet MA, Watt PAC, Thurston H. Endothelium-dependent modulation of resistance vessel contraction: Studies with N^G-nitro - L-arginin methyl ester and N-nitro - L-arginin. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 616-21.
19. Kaneko K and Sunano S. Involvement of adrenoceptors in the endothelium-dependent depression of noradrenaline-induced contraction in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1993; 210: 195-200.
20. Cocks TM and Angus JA. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature* 1983; 305: 624-30.